



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
**Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas**



FERNANDA MANSANO CARBINATTO

**COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM AMIOLOSE: OBTENÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO COMO SISTEMAS DE
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.**

Araraquara
2014

FERNANDA MANSANO CARBINATTO

Complexos de inclusão com amilose: obtenção, caracterização e avaliação como sistemas de liberação controlada de fármacos.

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury

Araraquara

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C263c Carbinatto, Fernanda Mansano
Complexos de inclusão com amilose: obtenção, caracterização e avaliação como sistemas de liberação controlada de fármacos/ Fernanda Mansano Carbinatto. – Araraquara, 2014.
151 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos. Orientadora: Beatriz Stringhetti Ferreira Cury.

1. Complexos de inclusão. 2. Alta amilose. 3. Nimesulida. 4. Praziquantel. 5. Liberação controla. I. Cury, Beatriz Stringhetti Ferreira, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

Fernanda Mansano Carbinatto

Complexos de inclusão com amilose: obtenção, caracterização e avaliação como sistemas de liberação controlada de fármacos.

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Data de aprovação: 31/01/2014

Titulação: Doutorado em Ciências Farmacêuticas

Componentes da banca examinadora da defesa pública:

Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury (presidente)

Profª. Dra. Ana Doris de Castro (examinador)

Prof. Dra Maria Palmira Daflon Gremião (examinador)

Profª. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari (examinador)

Profª. Dra. Flávia Chiva Carvalho (examinador)

Araraquara, 31 de janeiro de 2014

Agradecimentos

Primeiramente, a **Deus** por estar sempre presente na minha vida,

Aos meus pais, **Maria Cristina** e **Antonio** e em as minhas irmãs, **Isabela** e **Gabriela** pelo incentivo e força em todas as horas, além de serem grandes exemplos na minha vida,

Ao meu namorado **Luís Fernando G. Falleiros** pelo companheirismo e dedicação em todos os momentos,

Ao meu querido orientador **Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista**, uma pessoa especial, um exemplo de sabedoria, carácter e ética profissional, que infelizmente não está mais conosco, agradeço pela amizade, confiança, pela ajuda no meu crescimento pessoal e profissional durante todo tempo que trabalhamos,

À minha co-orientadora que posteriormente passou a ser minha orientadora **Dr^a. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury**, por estar ao meu lado, pelas orientações e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional,

Aos amigos que conheci durante esse tempo que permaneci na UNESP e que se tornaram muito especiais na minha vida: **Fabiana A. Arena, Andréia B. Meneguim, Marcia Oyafuso, Fernanda K. dos Santos, Ana Luiza Ribeiro de Souza, Charlene Kill, Bruno Fonseca-Santos, Flávio Campos, Andresa Fujimura, Valéria M. Cardoso, Aline Martins dos Santos, Lilian Barbassa, Leiliane K. de Souza e Daniela C. M. Vieira**, agradeço por todos os momentos junto com vocês,

Aos amigos **Dr^a Carla Riccardi** e ao **Dr. Márcio Santos**, pela amizade, além da colaboração indispensável,

Aos meus amigos, **Carolina Silvatti, Hellen Cruz, Giovanna B. R. Maffei, Mariana Prantera Hitty-Ko Kamimura** e **Camila Amorin** pela ajuda, incentivo e amizade,

A **todos** os alunos de graduação, pós-graduandos, funcionários e professores do laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, pelas conversas e colaborações,

À **Prof^a. Dr^a. Tatiana Ribeiro** da UFSCAR-Araras, SP, pela amizade, paciência, incentivo e pelo auxílio na discussão das medidas de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do estado sólido,

À **EMBRAPA** de São Carlos pela disponibilidade de utilização do equipamento de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do estado sólido,

Às **Prof^a. Dr^a. Ana Dóris de Castro** e **Prof^a. Dr^a. Maria Palmira Daflon Gremião** pela amizade, confiança e contribuição para o aperfeiçoamento do trabalho,

Ao **Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro**, pelo auxílio e sugestões principalmente no exame geral de qualificação,

As técnicas do Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, **Margarete e Natalia** pelo incentivo e amizade,

À **Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado** e à **Prof^a. Dr^a. Maria Virgínia Scarpa** pela colaboração quanto ao uso de equipamentos do Laboratório de Controle de Qualidade,

À **Seção de pós-graduação**, em especial à Cláudia e a Joyce, pela atenção e apoio,

Aos **funcionários** da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, **Moacir, Max, Irani** e **Cristina** pela ajuda,

Ao **prof. Dr. João Aristeu da Rosa** pela colaboração com o uso do analisador de imagens,

Ao **LMA-IQ** e ao técnico **Tarek** pelo auxílio e pela disponibilidade da utilização do microscópio eletrônico de varredura,

Ao **GFQM-IQ** e ao técnico **Ricardo**, pelas medidas de Difração de Raios X,

Ao **CNPq** pelo suporte financeiro.

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

RESUMO

A alta amilose, um amido modificado com alto teor de amilose (70%), que demonstrou em diversos estudos ser um material promissor para o controle da liberação de diferentes fármacos. A habilidade da alta amilose em formar complexos de inclusão e a elevada resistência enzimática foi explorada para a obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos com intuito vetorizar a liberação do fármaco no intestino, através da digestão pela enzima pancreatina. Diferentes complexos foram produzidos e a influencia da proporção fármaco: polímero, temperatura, e a presença de ácido palmítico foram avaliados através da caracterização dos complexos pelas análises de DSC, difração de Raios-X, distribuição granulométrica, RMN e determinação da capacidade de absorção de líquido. O desempenho como sistemas de liberação controlada de fármacos foi avaliado através da determinação da liberação *in vitro* dos fármacos nimesulida (NMS) e praziquantel (PZQ) em diferentes meios, simulando as diferentes regiões do trato gastrintestinal (TGI). A metodologia para a obtenção dos complexos mostrou-se eficiente com rendimento superior a 57% e teor de fármaco complexado de até 68,16%. Os dados de DSC, difração de Raios-X e RMN relevaram a interação entre fármaco e polímero, bem como a formação dos complexos de inclusão com estruturas semi-cristalinas associadas a formação de complexos do tipo II, de elevada resistência enzimática. A maior cristalinidade e a presença de fármacos próximos à superfície dos complexos promoveram redução da capacidade de absorção de líquido. A inclusão dos fármacos nos complexos permitiu a redução de suas taxas de liberação nos meios sem enzima (ácido, pH 1,2 e tampão fosfato pH 6,9). A adição da enzima pancreatina promoveu significativa aceleração das taxas de liberação dos fármacos (NMS e PZQ) demonstrando a degradabilidade desses complexos. A maior cristalinidade do complexo PZQ 1:30AG60°C promoveu a maior resistência enzimática, proporcionando uma liberação constante do PZQ por 240min, enquanto os complexos com NMS e o complexo PZQ 1:5AG90°C a liberação se completou em 60min. Para os meios sem enzima os dados de liberação apresentaram melhor correlação com o modelo de Weibull, indicando que a liberação dos fármacos ocorreu por mecanismos complexos de liberação que envolve a difusão, o intumescimento e a erosão. No meio contendo pancreatina apenas o complexo PZQ 1:30AG60°C seguiu o modelo de Weibull, enquanto os demais complexos apresentaram melhor correlação com o modelo de Primeira Ordem, evidenciando que a aceleração das taxas de liberação dos fármacos foi devido à erosão do polímero.

Palavras-chaves: Complexos de inclusão, alta amilose, nimesulida, praziquantel, liberação controlada.

ABSTRACT

High amylose, one modified starch with high content of amylose (70%) is a promising material for controlling the delivery of different drugs. The ability of the high amylose to form inclusion complexes with high enzymatic resistance was exploited for obtaining controlled drugs delivery systems for targeting the drug release in the intestine by digestion with pancreatin enzyme. Different complexes were produced and the influence of the ratio drug: polymer, temperature and the presence of palmitic acid were evaluated through the characterization of the complexes by DSC, X-ray diffraction, particle size distribution, NMR and liquid uptake analysis.

The performance of these complexes as controlled drug delivery systems was evaluated by determining the *in vitro* release of nimesulide (NMS) and praziquantel (PZQ) in different media, simulating the different regions of the gastrointestinal (GI) tract.

The methodology to obtain the complex has been successful with a yield over 57% and the content of drug complexation until 68.16%. The DSC, diffraction of X-rays and NMR data showed the interaction between drug and polymer as well as the formation of inclusion complexes with semi-crystalline structures which were related to the formation of type II complexes with high enzymatic resistance. The higher crystallinity and the presence of drugs near to the complexes surface promoted the reduction of liquid uptake ability. The inclusion of drugs in complex allowed the reduction of their rates of release in the acid media (pH 1.2) and phosphate buffer (pH 6.9). The addition of pancreatin enzyme caused a significant acceleration of the rate of release of drugs (NMS and PZQ) showing the degradability of these complexes. The higher crystallinity of PZQ1:30AG60°C complex showed its highest enzymatic resistance providing the release of PZQ during 240min, while the complexes with NMS and PZQ 1:5AG90°C complex released the drug in 60min. The release data in media without enzymes showed better correlation with the Weibull model, indicating that the release of drugs occurred by complex release mechanisms involving diffusion, swelling and erosion. In media containing pancreatin only the complex PZQ 1:30 AG60°C followed the Weibull model, while the other complexes showed better correlation with the First Order model, showing that the acceleration of the release rates of drugs was due to erosion of polymer.

Keywords: Inclusion complexes, high amylose, nimesulide, praziquantel, controlled release

LISTA DE FIGURAS ¹

Figura 1: Estrutura da alta amilose (a) e amilopectina (b) (TESTER, KARKALAS, 2004).....	29
Figura 2: Representação esquemática da estrutura tridimensional das CD's (BRITTO et al., 2004).....	31
Figura 3: Estrutura dos três diferentes tipos de CD's (VENTURINI et al., 2008.)	32
Figura 4: Conformação espacial da amilose.....	33
Figura 5: Complexo de inclusão: amilose com ligante hidrofóbico (PUTSEYS et al., 2010).....	33
Figura 6: Fórmula estrutural da NMS	36
Figura 7: Fórmula estrutural do PZQ	38
Figura 8: Ilustração esquemática do preparo dos complexos de inclusão.....	42
Figura 9: Dispositivo de Enslin para determinação da absorção de líquido.....	49
Figura 10: Espectros de absorção da NMS em diferentes meios	56
Figura 11: Espectros de absorção do PZQ em diferentes meios	57
Figura 12: Espectro na região do UV em etanol ____ Solução de 30µg de NMS ____ Solução de 30µg de NMS com 100µg Alta amilose	58
Figura 13: Espectro na região do UV em meio ácido ____ Solução de 40µg de NMS ____ Solução de 40µg de NMS com 100µg Alta amilose	58
Figura 14: Espectro na região do UV em tampão fosfato ____ Solução de 60µg de NMS ____ Solução de 60µg de NMS com 100µg Alta amilose	59
Figura 15: Espectro na região do UV em tampão fosfato ____ Solução de 60µg de NMS ____ Solução de 60µg de NMS com 1%pancreatina	59
Figura 16: Espectro na região do UV em etanol ____ Solução de 500µg do PZQ ____ Solução de 500µg do PZQ com 100µg Alta amilose	60
Figura 17: Espectro na região do UV em meio ácido ____ Solução de 300µg do PZQ ____ Solução de 300µg do PZQ com 100µg Alta amilose	60
Figura 18: Espectro na região do UV em solução tampão fosfato ____ Solução de 300µg do PZQ ____ Solução de 300µg do PZQ com 100µg Alta amilose.....	60

¹ Segundo norma ABNT 14724/2011

Figura 19:Espectro na região do UV em solução tampão fosfato com 1% de pancreatina ____ Solução de 70µg do PZQ _____ Solução de 70µg do PZQ com 100µg Alta amilose	61
Figura 20: Curva analítica da NMS em diferentes meios.....	62
Figura 21: Curva analítica do PZQ em diferentes meios	63
Figura 22: Percentual de NMS complexada.....	67
Figura 23: Estrutura bi e tri-dimensional da NMS (BOLTON et al.2011)	68
Figura 24: Percentual de PZQ complexado.....	69
Figura 25: Estrutura bi e tri-dimensional do PZQ (BOLTON et al.2011)	70
Figura 26: Curvas de DSC dos materiais isolados	71
Figura 27: Curvas de DSC das misturas físicas.....	72
Figura 28: Curvas de DSC dos complexos preparados sem fármacos	73
Figura 29: Curvas de DSC dos complexos com NMS	75
Figura 30: Curvas de DSC dos Complexos com PZQ.....	77
Figura 31: Curvas de DSC dos complexos com NMS em faixa de temperatura 40-180°C	79
Figura 32: Curvas de DSC dos complexos com PZQ em faixa de temperatura 40-180 °C	80
Figura 33: Difrátogramas dos materiais isolados	88
Figura 34: Difrátograma das misturas físicas	89
Figura 35: Difrátogramas dos complexos com NMS	90
Figura 36: Difrátogramas dos complexos com PZQ	92
Figura 37: Espectro na região do infravermelho dos materiais isolados.....	95
Figura 38:Espectro no Infravermelho dos complexos com NMS	97
Figura 39: Espectro no Infravermelho dos complexos com PZQ	98
Figura 40: Diâmetro de Feret na direção horizontal (0°)	99
Figura 41: Distribuição de tamanho de partícula - Amostras isoladas.....	100
Figura 42: Distribuição de tamanho de partícula - Complexos com NMS	101
Figura 43: Distribuição de tamanho de partícula - Complexos com PZQ.....	103
Figura 44: Fotomicrografias das substâncias isoladas.....	107
Figura 45: Fotomicrografias dos complexos com NMS.....	108
Figura 46: Fotomicrografias dos complexos com PZQ.....	109
Figura 47: Espectro de RMN CP/MAS de ¹³ C – Ácido Palmítico(AG)	111
Figura 48: Espectro de RMN CP/MAS de ¹³ C – Nimesulida(NMS).....	111
Figura 49: Espectro de RMN CP/MAS de ¹³ C – Praziquantel (PZQ).....	112

Figura 50: Espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C – Alta Amilose	113
Figura 51: Espectros de RMN CP/MAS de ^{13}C – Complexos com NMS.....	115
Figura 52: Espectros de RMN CP/MAS de ^{13}C – Complexos com PZQ.....	118
Figura 53: Perfil de absorção de líquido nos complexos com NMS e PZQ.....	122
Figura 54: Perfis de liberação em meio ácido (pH 1,2).....	125
Figura 55: Perfis de liberação em tampão fosfato sem enzima (pH 6,9).....	127
Figura 56: Perfis de liberação em tampão fosfato com pancreatina (pH 6,9)	130

LISTA DE TABELAS ²

Tabela 1: Modelos matemáticos de liberação.....	51
Tabela 2: Complexos de Inclusão.....	53
Tabela 3: Rendimento (%) dos complexos de inclusão com NMS	54
Tabela 4: Rendimento (%) dos complexos de inclusão com PZQ	54
Tabela 5: Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão em diferentes meios com NMS	64
Tabela 6: Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão em diferentes meios com PZQ	64
Tabela 7: Percentual de recuperação da NMS em diferentes meios.....	65
Tabela 8: Percentual de recuperação do PZQ em diferentes meios.	65
Tabela 9: Limite de detecção e limite de quantificação da NMS em diferentes meios..	66
Tabela 10: Limite de detecção e limite de quantificação do PZQ em diferentes meios.	66
Tabela 11: Temperatura de fusão e valores de entalpias-Primeiro evento endotérmico .	81
Tabela 12: Temperatura de fusão e valores de entalpias-Segundo evento endotérmico	83
Tabela 13: Temperatura de fusão e valores de entalpias-Terceiro evento endotérmico	85
Tabela 14: Valores percentuais de NMS complexada através dos valores de entalpia..	86
Tabela 15: Valores de absorção dos grupos funcionais das amostras por FTIR	94
Tabela 16: Diâmetro circular equivalente das amostras	104
Tabela 17: Circularidade das amostras	105
Tabela 18: Deslocamentos químicos de ¹³ C da alta amilose, AG e dos complexos.....	114
Tabela 19: Valores e tempo de equilíbrio de absorção de líquido das amostras	123
Tabela 20: Percentual de liberação dos fármacos complexados em meio ácido (pH 1,2) no tempo de 120 minutos	126
Tabela 21: Percentual de liberação dos fármacos complexados em tampão fosfato sem enzima (pH 6,9) no tempo de 360 minutos.	128
Tabela 22: Tempo de liberação dos fármacos complexados em tampão fosfato com pancreatina (pH 6,9)	130
Tabela 24: Coeficiente de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos nos complexos de inclusão em meio ácido (pH 1,2)	132

² Segundo norma ABNT 14724/2011

Tabela 25: Coeficiente de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos nos complexos de inclusão em tampão fosfato sem enzima	133
Tabela 26: Coeficiente de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos nos complexos de inclusão em tampão fosfato com pancreatina	133

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AA=Alta Amilose

AA 60°C= Alta Amilose submetida ao tratamento hidrotérmico a 60°C

AA 90°C= Alta Amilose submetida ao tratamento hidrotérmico a 90°C

AA:AG60°C= complexo preparado sem fármaco, apenas com AG e Alta Amilose a 60°C

AA:AG90°C= complexo preparado sem fármaco, apenas com AG e Alta Amilose a 90°C

AG= cido palmítico

CD's= ciclodextrinas

LSS=lauril sulfato de sódio

NMS= nimesulida

NMS 1:5AG60°C= complexo na proporção 1:5 (NMS: Alta Amilose) com AG a 60°C

NMS 1:5 60°C= complexo na proporção 1:5 (NMS: Alta Amilose) sem AG a 60°C

NMS 1:15AG60°C= complexo na proporção 1:15 (NMS: Alta Amilose) com AG a 60°C

NMS 1:1560°C= complexo na proporção 1:15 (NMS: Alta Amilose) sem AG a 60°C

NMS 1:30AG60°C= complexo na proporção 1:30(NMS: Alta Amilose) com AG a 60°C

NMS 1:30 60°C= complexo na proporção 1:30 (NMS: Alta Amilose) sem AG a 60°C

NMS 1:5AG90°C= complexo na proporção 1:5 (NMS: Alta Amilose) com AG a 90°C

NMS 1:5 90°C= complexo na proporção 1:5 (NMS: Alta Amilose) sem AG a 90°C

NMS 1:15AG90°C= complexo na proporção 1:15 (NMS: Alta Amilose) com AG a 90°C

NMS 1:15 90°C= complexo na proporção 1:15 (NMS: Alta Amilose) sem AG a 90°C

NMS 1:30AG90°C= complexo na proporção 1:30 (NMS: Alta Amilose) com AG a 90°C

NMS 1:30 90°C= complexo na proporção 1:30 (NMS: Alta Amilose) sem AG a 90°C

NMS MF 1:5= mistura física na proporção 1:5(NMS: Alta Amilose)

NMS MF 1:15= mistura física na proporção 1:15(NMS: Alta Amilose)

NMS MF 1:5 AG= mistura física na proporção 1:5(NMS: Alta Amilose) com AG

NMS MF 1:15 AG= mistura física na proporção 1:15(NMS: Alta Amilose) com AG

PZQ= praziquantel

PZQ 1:5AG 60°C= complexo na proporção 1:5 (PZQ: Alta Amilose) com AG a 60°C

PZQ 1:5 60°C= complexo na proporção 1:5 (PZQ: Alta Amilose) sem AG a 60°C
PZQ 1:15AG60°C= complexo na proporção 1:15 (PZQ: Alta Amilose) com AG a 60°C
PZQ 1:15 60°C= complexo na proporção 1:15 (PZQ: Alta Amilose) sem AG a 60°C
PZQ 1:30AG60°C= complexo na proporção 1:30 (PZQ: Alta Amilose) com AG a 60°C
PZQ 1:30 60°C= complexo na proporção 1:30(PZQ: Alta Amilose) sem AG a 60°C
PZQ 1:5 AG 90°C= complexo na proporção 1:5 (PZQ: Alta Amilose) com AG a 90°C
PZQ 1:5 90°C= complexo na proporção 1:5 (PZQ: Alta Amilose) sem AG a 90°C
PZQ 1:15AG90°C= complexo na proporção 1:15 (PZQ: Alta Amilose) com AG a 90°C
PZQ 1:15 90°C= complexo na proporção 1:15 (PZQ: Alta Amilose) sem AG a 90°C
PZQ 1:30AG90°C= complexo na proporção 1:30 (PZQ: Alta Amilose) com AG a 90°C
PZQ 1:30 90°C= complexo na proporção 1:30 (PZQ: Alta Amilose) sem AG a 90°C
PZQ MF 1:5 AG: mistura física na proporção 1:5(PZQ: Alta Amilose) com AG
PZQ MF 1:15= mistura física na proporção 1:15(PZQ: Alta Amilose)
PZQ MF 1:5 AG: mistura física na proporção 1:5(PZQ: Alta Amilose) com AG
PZQ MF 1:15 AG= mistura física na proporção 1:15(PZQ: Alta Amilose) com AG

δ = deslocamento químico (ppm)

$\bar{\nu}$ = número de ondas (cm^{-1})

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	22
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos.....	25
2.2 Complexos de inclusão.....	29
2.3 Nimesulida (NMS)	35
2.4 Praziquantel (PZQ).....	37
3.0 OBJETIVO GERAL	39
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Materiais.....	40
4.1.2 Equipamentos	40
4.2 Métodos.....	41
4.2.1 Preparo dos complexos de inclusão.....	41
4.2.2 Cálculo de rendimento dos complexos.....	42
4.2.3 Validação da metodologia analítica para NMS e PZQ.....	42
4.2.3.1 Determinação do espectro de absorção da NMS e do PZQ.....	43
4.2.3.2 Especificidade.....	43
4.2.3.3. Linearidade	44
4.2.3.4 Precisão.....	44
4.2.3.5 Recuperação.....	45
4.2.3.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	46
4.2.4 Determinação do teor de fármaco complexado	46
4.2.5 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	47
4.2.6 Difração de Raios X (DRX)	48
4.2.7 Análise Espectroscópica por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	48
4.2.8 Tamanho e forma das partículas	48
4.2.9 Morfologia de superfície	48

4.2.10 Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido (RMN).....	49
4.2.11 Determinação da capacidade de absorção de líquidos.....	49
4.2.12 Determinação dos perfis de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos.....	50
4.2.12.1 Seleção dos complexos de inclusão para teste de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos.....	50
4.2.12.2 Teste de dissolução para determinação dos perfis liberação <i>in vitro</i> dos fármacos.....	50
4.2.13 Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos	51
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
5.1 Preparo dos complexos de inclusão	52
5.2 Rendimento dos Complexos.....	53
5.3 Validação da metodologia analítica da NMS e do PZQ.....	55
5.3.1 Determinação do espectro de absorção da NMS e do PZQ.....	55
5.3.2 Especificidade.....	58
5.3.3 Linearidade	61
5.3.4 Precisão.....	63
5.3.5 Recuperação	65
5.3.6 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	66
5.4 Determinação do teor de fármaco complexado.....	66
5.5 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	70
5.6 Difração de Raios X (DRX)	86
5.7 Análise Espectroscópica por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	93
5.8 Tamanho e forma das partículas.....	99
5.9 Morfologia de superfície	106
5.10 Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido (RMN)	110
5.11 Determinação da capacidade de absorção de líquidos	121
5.12 Determinação dos perfis liberação <i>in vitro</i> dos fármacos	124

5.12.1 Seleção dos complexos de inclusão para teste de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos.....	124
5.12.2 Teste de dissolução para determinação dos perfis liberação <i>in vitro</i> dos fármacos.....	125
5.13 Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos	132
6.0 CONCLUSÕES.....	135
7.0 REFERÊNCIAS	136

1.0 INTRODUÇÃO

Entre as diversas via de administração de fármacos, a via oral é a via mais utilizada na terapêutica por tratar-se de uma via não invasiva e de fácil administração, permitindo uma maior probabilidade de adesão do paciente ao tratamento e alta flexibilidade de dosagem (FASANO, 1998; LIU et al., 2003; PINTO, 2010; ISHA et al., 2012; LAM, GAMBARI, 2014).

A maior parte das formas farmacêuticas administradas por via oral é administrada com intuito de atingir um efeito sistêmico, através da absorção do fármaco no epitélio intestinal, local capaz de absorver vários compostos, devido apresentar vilosidades que aumentam a área de absorção total do TGI em até 300-400m² (ANSEL et al, 2000; ENSIGN et al., 2012)

As formas farmacêuticas convencionais administradas por via oral levam a uma liberação relativamente rápida do fármaco após a administração, entretanto devido às diferenças fisiológicas encontradas ao longo do TGI, flutuações da concentração plasmática podem ocorrer aumentando o risco de se atingir níveis tóxicos ou subterapêuticos, o que pode resultar no comprometimento da resposta terapêutica (ANSEL et al., 2000; AULTON, 2005; PEZZINI et al., 2007).

Por essa razão, o controle temporal e espacial da liberação de fármacos é de grande interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, uma vez que representa uma valiosa ferramenta para aperfeiçoar a resposta terapêutica. Diferentes estratégias podem ser abordadas, relacionadas à formulação e à tecnologia de obtenção, tais como os sistemas de liberação controlada que são delineados para vetorizar e/ou liberar gradualmente o fármaco ao longo do TGI.

Os sistemas de liberação sítio-específica promovem uma liberação seletiva e em quantidade satisfatória de fármaco em um órgão ou tecido alvo, onde o fármaco terá seu efeito farmacológico ou terá melhor absorção para exercer um efeito sistêmico (TORCHILIN, 2000).

Os principais mecanismos de vetorização de fármacos são: através da aplicação direta do fármaco na região afetada (órgão ou tecido), acúmulo passivo do fármaco em regiões de alta vascularização (tumores e inflamações), direcionamento físico através de hidrólise enzimática ou mudanças de temperatura e pH, direcionamento magnético,

utilizando campo magnético externo e através da utilização de moléculas vetores que possuem afinidade específica para a zona afetada. Os polímeros são materiais promissores no desenvolvimento de tais sistemas (TORCHILIN, 2000, SIEPMANN et al., 2008; PINTO et al., 2010).

Entre os diversos polímeros utilizados no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, o amido desperta particular interesse por apresentar ampla disponibilidade, baixo custo e por ser um polímero biodegradável, que sofre degradação química *in vivo*, por hidrólise enzimática, resultando em produtos não tóxicos (WILSON; BASIT, 2005, LALUSH et al. 2005; YU et al., 2005; CONDE-PETIT et al., 2006).

O amido é composto por uma mistura de dois diferentes polímeros; a amilose e amilopectina. A amilose apresenta estrutura essencialmente linear, constituída de unidades de D – glicose, unidas entre si por ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) e a amilopectina é uma molécula muito grande e altamente ramificada constituída de unidades D - glicose ligadas por ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 6) (MUA, JACKON, 1997; SASAKI et al., 2000; TESTER, KARKALAS 2004)

Dependendo da fonte de amido, o conteúdo de amilose pode variar, sendo que para o amido convencional de milho, ele pode variar entre 15 e 30. Amidos com elevados conteúdos de amilose (50% a 85%) também podem ser encontrados, dentre eles, uma variedade híbrida de amido (HYLON VII[®]) composto de 70% de amilose (LE BAIL et al., 1999; SASAKI et al., 2000; TESTER, KARKALAS 2004; VANDEPUTTE, DELCOUR, 2004; WILSON; BASIT, 2005).

A amilose devido à configuração α (1-4) pode assumir uma conformação helicoidal e formar complexos de inclusão com ligantes hidrofóbicos. No momento da formação dos complexos de inclusão, as fitas helicoidais da amilose se organizam de forma que os grupamentos hidroxílicos apresentam-se dispostos na superfície externa da hélice, enquanto grupamentos metileno e oxigênios glicosídicos ficam voltados para a superfície interna resultando em uma parte interior mais hidrofóbica que proporciona sítios de ligação com uma elevada afinidade com ligantes hidrofóbicos (IMMEL, LICHTENTHALER, 2000; PUTSEYS et al., 2010)

Os complexos podem organizar-se em diferentes estruturas, tais como, estruturas do tipo I (estrutura desordenada ou amorfa), polimorfos A e B (estrutura helicoidal formada por dupla hélice) e polimorfo tipo V, que também pode ser associado à formação de complexos tipo II (estrutura formada por hélice simples), resultando em

uma forma semicristalina e proporcionando a essa estrutura maior resistência enzimática. (UCHINO et al., 2001; ELIASSON, 2004; LALUSH et al., 2005; CONDE-PETIT et al., 2006; BIAIS et al., 2006; LESMES et al., 2008; PUTSEYS et al., 2010).

A liberação dos ligantes incluídos nos complexos ocorre por hidrólise enzimática, inicialmente ocorre a rápida hidrólise das áreas amorfas do complexo (JANE, ROBYT, 1984; GALLOWAY et al., 1989) e, posteriormente, ocorre a lenta degradação das áreas cristalinas do complexo de inclusão de amilose (influenciada pelo tamanho da cadeia de amilose e do lipídeo) (GODET et al., 1996).

A taxa de hidrólise também depende da atividade enzimática local; em baixa atividade enzimática, como no caso das enzimas salivares, apenas as porções amorfas são hidrolisadas, em seguida, os complexos com estruturas mais cristalinas, ao chegar ao intestino delgado são hidrolisados pela ação da enzima pancreatina, inicialmente complexos do tipo I e em seguida os complexos tipo V (HEINEMANN et al., 2005; PUTSEYS et al., 2010).

A liberação de compostos incluídos na hélice da amilose por ação da pancreatina representa uma importante ferramenta para vetorizar a liberação do fármaco no intestino (CONDE-PETIT et al., 2006).

Esse trabalho teve o objetivo de obter e caracterizar complexos de inclusão, utilizando a alta amilose e diferentes fármacos, bem como avaliar o desempenho como sistemas de liberação sítio-específica de fármacos com diferentes características estruturais (PZQ e NMS).

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

As formas farmacêuticas de administração oral podem ser classificadas de acordo com a forma de liberação do fármaco e nesse sentido, as formas farmacêuticas que liberam o fármaco rapidamente pelo organismo, são denominadas formas de liberação convencional, enquanto outras formas farmacêuticas que permitem controlar a liberação do fármaco ao longo do TGI são denominadas sistemas de liberação controlada de fármacos (ANSEL et al., 2000; ASHFORD, 2005; PEZZINI et al., 2007).

As formas farmacêuticas convencionais apresentam, em determinados casos, algumas limitações, tais como: dificuldade de manter uma concentração de fármaco constante no(s) local (is) de ação e necessidade de doses frequentes para se conseguir a concentração local requerida, resultando na ineficiência do tratamento ou a manifestação de efeitos adversos (GREGORIADIS, 1981; ANSEL et al., 2000; TORCHILIN, 2000, KIM et al., 2009)

Essas limitações podem ser superadas com o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (GREGORIADIS, 1981; TORCHILIN, 2000).

Os sistemas de liberação controlada apresentam vantagens em relação aos medicamentos convencionais, tais como: (LYRA et al., 2007; ANSEL et al., 2000; MORITA et al., 2000).

-Redução das oscilações plasmáticas das concentrações do fármaco: com o controle da velocidade de liberação do fármaco, os “picos e depressões” das concentrações sanguíneas ou séricas do fármaco são eliminados;

-Redução na frequência da dose: o que acarreta maior conveniência e cooperação do paciente, pois medicamentos com velocidade controlada podem liberar mais de uma única dose e assim, são ingeridos com menos frequência, também ocorre uma redução na administração de doses e o paciente tem menor probabilidade de esquecer;

-Redução dos efeitos colaterais: dificilmente há picos de concentração do fármaco no sangue superior à concentração terapêutica do medicamento;

-Redução de custos de atendimento de saúde: o custo para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos com velocidade controlada é mais elevado em relação ao desenvolvimento do medicamento convencional, porém o custo médio do tratamento em períodos prolongados pode ser bem menor, pois com a menor frequência das doses, o benefício terapêutico ampliado e os efeitos colaterais reduzidos, o tempo dispensado pelos profissionais de saúde no atendimento, administração e monitorização dos pacientes fica reduzido (MORITA et al., 2000; ANSEL et al., 2000; LYRA et al., 2007).

A terminologia utilizada para designar os medicamentos de liberação controlada é bastante ambígua e controversa e a literatura apresenta uma variedade de expressões para descrever esses sistemas, tais como: liberação retardada, repetida, prolongada, sustentada, controlada e modificada (ANSEL et al., 2000; LYRA et al., 2007).

Os medicamentos de liberação sustentada promovem uma liberação inicial de fármaco, suficiente para disponibilizar a dose terapêutica e a manutenção da concentração plasmática do fármaco constante durante um tempo maior que o medicamento convencional, representando uma situação ideal (liberação de ordem zero) (AULTON, 2005).

Os medicamentos com ação prolongada são aqueles a partir dos quais a concentração plasmática eficaz é obtida e mantida durante muito tempo; para que ocorra este efeito é necessária à incorporação de uma quantidade maior de fármaco em relação à forma farmacêutica convencional (ANSEL et al., 2000; KUMAR, DOMB, 2004; AULTON, 2005).

Medicamentos com liberação repetida do fármaco são aqueles que apresentam uma dose individual, que é liberada regularmente logo após a administração, e uma segunda ou até terceira doses que são subsequentemente liberadas, obtendo-se uma curva de concentração plasmática semelhante às resultantes de doses consecutivas de medicamentos convencionais. (LACHMAN et al., 2001; AULTON, 2005)

Medicamentos de liberação retardada são aqueles em que o início da liberação apresenta um tempo de latência maior em relação ao da forma farmacêutica convencional correspondente. Na forma *retard*, a liberação tardia do fármaco é programada intencionalmente para que ocorra somente quando ele atingir o intestino. Os motivos para utilização da liberação retardada são de proteção do fármaco no suco gástrico ou evitar uma eventual ação irritante do fármaco na mucosa estomacal (ANSEL et al., 2000; LACHMAN et al., 2001; AULTON, 2005).

As diferentes terminologias são utilizadas para descrever de forma mais detalhada as diferentes formas de se controlar a liberação dos fármacos, a fim de promover um real controle terapêutico, seja de maneira temporal, controlando o tempo de liberação ou espacial, através da vetorização de fármacos para locais específicos (HAAN, LERK, 1984; SANTUS, BAKER, 2003, EVANGELISTA, 2000; LACHAMN, 2001; LYRA et al., 2007).

Os sistemas de liberação sítio-específica promovem uma liberação seletiva e em quantidade satisfatória de fármaco em um órgão ou tecido alvo, onde o fármaco terá seu efeito farmacológico ou terá melhor absorção para exercer um efeito sistêmico (TORCHILIN, 2000).

Sistemas delineados para vetorizar os fármacos apresentam várias vantagens, tais como, simples protocolos de administração, redução da concentração necessária dos fármacos para o efeito terapêutico, bem como o custo da terapia, a concentração de fármacos nos locais alvos pode ser bruscamente aumentada sem provocar efeitos adversos sobre os compartimentos que não são alvos; melhorando a resposta terapêutica, tornando o tratamento mais eficiente (ANSEL et al., 2000; TORCHILIN, 2000; AULTON, 2005; PEZZINI et al., 2007, PINTO et al., 2010)

As principais estratégias para a liberação sítio-específica de fármacos, incluem, a aplicação direta no fármaco nas regiões afetadas (órgão ou tecido), acúmulo passivo do fármaco em regiões de alta vascularização (tumores e inflamações), direcionamento físico através de hidrólise enzimática ou baseado nas mudanças de temperatura e pH, direcionamento magnético, utilizando campo magnético externo e através da utilização de moléculas vetores que possuem afinidade específica para a zona afetada. (TORCHILIN, 2000, SIEPMANN et al., 2008; PINTO et al., 2010).

O desenvolvimento de sistemas de liberação sítio específica que possibilitam a vetorização de fármacos para o intestino delgado é uma estratégia muito abordada devido ao epitélio intestinal apresentar vilosidades que aumentam a área de absorção total do TGI em até 300-400m², representando uma região com mais elevada capacidade absorptiva em relação às outras regiões do TGI (FRIEND, 2004; ENSIGN et al., 2012).

Para o desenvolvimento de sistemas de liberação sítio-específica é necessário a seleção de um agente apropriado que possibilite a liberação do fármaco em um determinado tecido ou órgão-alvo. Dentre as várias opções, os polímeros demonstram ser agentes versáteis e promissores para exercer tal função (UHRICH et al., 1999; LOPES et al., 2005).

Diversos polímeros têm sido utilizados como excipiente para sistemas de liberação controlada de fármacos, dentre esses polímeros destaca-se a alta amilose, um amido modificado composto por 70% de amilose. (CUI, OATES, 1997; CHUNG et al., 2006)

Estudos realizados em nosso grupo de pesquisa têm demonstrado a versatilidade da alta amilose como excipiente para diferentes formulações permitindo a formação de sistemas capazes de controlar as taxas de liberação de fármacos.

O primeiro estudo com a alta amilose em nosso grupo de pesquisa, baseou-se na reticulação da alta amilose com trimetafosfato de sódio, em diferentes graus, variando a concentração de base (2% ou 4% NaOH) e o tempo de reticulação (0,5-4h). Essa técnica possibilitou a formação de sistemas sólidos não compactados que permitiram a liberação do fármaco por até 18 horas (CURY, 2005; CURY et al., 2009).

Em outro estudo, a alta amilose foi associada à pectina e a mistura foi reticulada pelo mesmo processo. Os resultados de caracterização físico-química indicaram a ocorrência de mudanças estruturais na rede tridimensional das amostras reticuladas bem como maior grau de cristalinidade e maior estabilidade térmica, proporcionando a formação de sistemas compactados com reduzidas taxas de liberação da nimesulida em meio ácido (CARBINATTO, 2010; CARBINATTO et al., 2012; CARBINATTO et al., 2014). Utilizando o mesmo sistema matricial, o fármaco diclofenaco de sódio foi incorporado por imersão possibilitando a liberação de reduzidos percentuais de fármaco em meio ácido (<10%) (SOARES et al., 2013).

As misturas de alta amilose com pectina reticuladas também foram empregadas na obtenção de filmes livres e os resultados demonstraram uma reduzida dissolução em meio ácido e reduzida digestão enzimática (PREZOTTI et al., 2012).

O amido retrogradado foi outro material estudado, o qual foi obtido através da retrogradação da alta amilose, utilizando ciclos alternados de temperatura. O amido retrogradado em associação com a pectina foi utilizado na obtenção de filmes pelo método de evaporação do solvente, assegurando a formação de filmes resistente contra a digestão enzimática pela pancreatina (MENEGUIN, 2012; MENEGUIN et al., 2014).

O amido retrogradado e pectina também foram estudados na forma de sistemas compactados que permitiram diferentes graus de controle das taxas de liberação do fármaco (RECIFE, 2013).

Os resultados promissores das pesquisas desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram a possibilidade de um controle da liberação do fármaco com

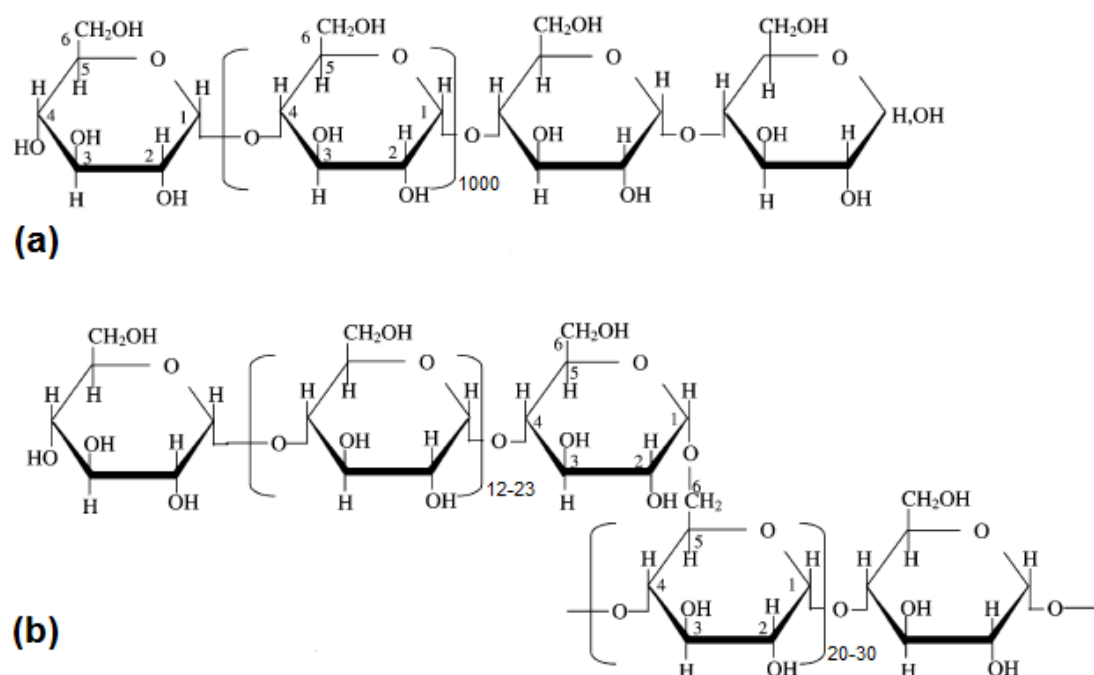
reduzidas taxas de liberação em meio ácido e resistência enzimática, confirmando que a alta amilose é um material promissor para vetorização de fármacos para o intestino delgado.

A alta amilose apresenta particular habilidade em formar complexos de inclusão helicoidais com fármacos hidrofóbicos, possibilitando a liberação do fármaco através da digestão enzimática principalmente pela ação da enzima pancreatina. No entanto, essa aplicação para área farmacêutica foi pouco explorada, tornando a utilização da alta amilose para formação de complexos uma importante ferramenta tecnológica para uma liberação sítio específica de diferentes fármacos.

2.2 Complexos de inclusão

O amido é composto de dois polímeros de glicose, a amilose, representando uma fração essencialmente linear com ligações glicosídicas α (1-4) e a amilopectina, a qual representa a porção ramificada com ligações α -1,6 (Figura 1) (CHEBLI et al., 2001; RAVENELLE et al., 2002; TESTER, KARKALAS, 2004).

Figura 1: Estrutura da alta amilose (a) e amilopectina (b) (TESTER, KARKALAS, 2004)



Os amidos apresentam em sua composição entre 15% e 25% de amilose, já alguns amidos denominados cerosos (*waxy*), são livres de amilose, há também amidos

modificados que apresentam conteúdos de amilose que variam de 50% a 85%, dentre eles uma variedade híbrida de amido (HYLON VII®) composto de 70% de amilose (LE BAIL et al., 1999; VANDEPUTTE, DELCOUR, 2004; WILSON; BASIT, 2005).

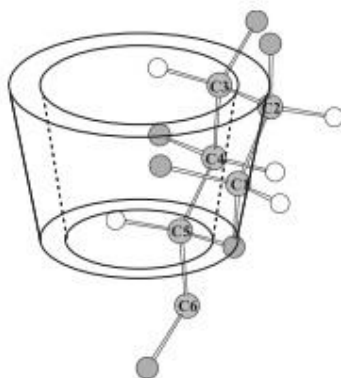
O amido é fonte para a formação de diferentes tipos de complexos de inclusão, tais como as ciclodextrinas (CD's) e os complexos de inclusão com alta amilose.

A interação hidrofóbica entre a molécula hóspede com a cavidade das CD's ou da hélice da amilose origina os complexos de inclusão. A forma estrutural dos complexos de inclusão fornece proteção à molécula hóspede contra a oxidação, degradação pela luz, calor, volatilidade, além de permitir o mascaramento de sabores e odores desagradáveis (BERTOLINI et al., 1998; CEREDA, VILPOUX; 2003)

A degradação enzimática do amido pela ação da enzima glicosiltransferase (CGT amilase sintetizada principalmente pelo microrganismo do *B. macerans* porém também pode ser sintetizada por outros microrganismos como *B. megaterium*, *B.circulans*, *B. stearothermophilus* e *Klebsiella pneumonia*) é capaz de quebrar um segmento da hélice do amido e unir as duas porções terminais deste fragmento numa única molécula cíclica, dando origem às CD's, constituídas por unidades de glicopirranose unidas por ligações α (1-4) (WHISTLER et al., 1984; CONNORS, 1997; SZEJTLI, 1998; CEREDA, VILPOUX; 2003).

As CD's são moléculas com estrutura em forma de cone truncado ou cilindro perfeito, onde os radicais OH são orientados para o exterior do cone com as hidroxilas primarias ligadas em C-6 na parte mais estreita da borda do cone e nas extremidades mais largas as hidroxilas secundárias ligadas com as moléculas de carbono C-2 e C-3 que estão alinhadas na cavidade (Figura 2), conferindo uma característica hidrofóbica nessa região (CONNORS, 1997;SALTÃO, VEIGA; 2001; CEREDA, VILPOUX; 2003; BRITTO et al., 2004; BREWSTER, LOFTSSON, 2007)

Figura 2: Representação esquemática da estrutura tridimensional das CD's (BRITTO et al., 2004)

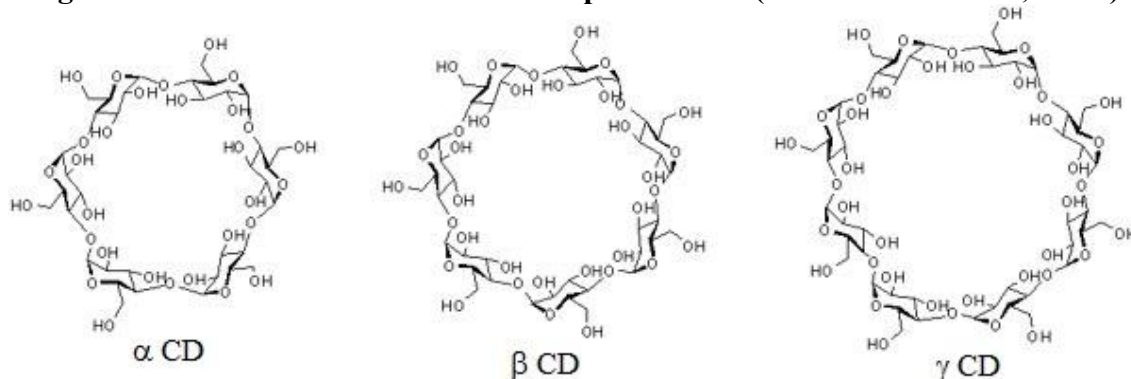


Devido à cavidade das CD's ser apolar quando comparada com a água, essa característica proporciona as CD's facilidade em formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos orgânicos (RYMDÉN et al., 1983; CEREDA, VILPOUX 2003; THANING et al., 2008; FERNANDES et al., 2014).

A formação dos complexos consiste na substituição das moléculas de água que apresentam elevada entalpia por moléculas hóspedes de menor entalpia, através de interações eletrostáticas de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio (GORNAS et al., 2009; LYRA et al., 2010).

Vários fármacos estão disponíveis no mercado em formulações constituídas de complexos de inclusão com CD, entre eles o meloxicam, comprimidos de clordiazepóxido e comprimidos sublinguais de nimesulida. Nessas formulações as CD's são agentes complexantes utilizados para aumentar a solubilidade dos fármacos que são pouco solúveis e assim aumentar sua biodisponibilidade (BREWSTER, LOFTSSON, 2007; FRANZINI, 2010).

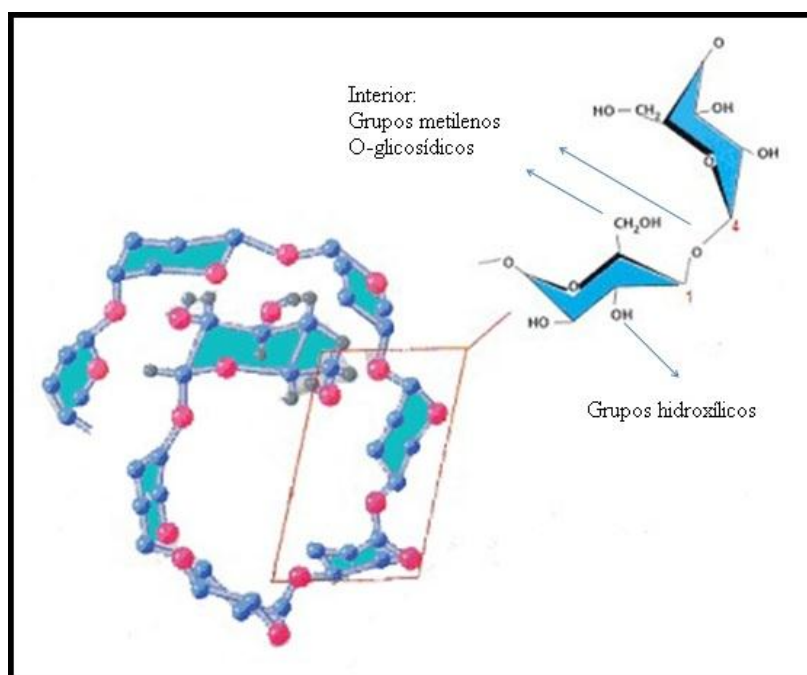
Através de modificações enzimáticas é possível obter a ciclização de seis, sete e oito unidades de glicose, originando as mais comuns CD's naturais, α , β , γ -CD, respectivamente (Figura 3) (CONNORS, 1997; SZEJTLI, 1998; CEREDA, VILPOUX; 2003; VENTURINI et al., 2008.)

Figura 3: Estrutura dos três diferentes tipos de CD's (VENTURINI et al., 2008.)

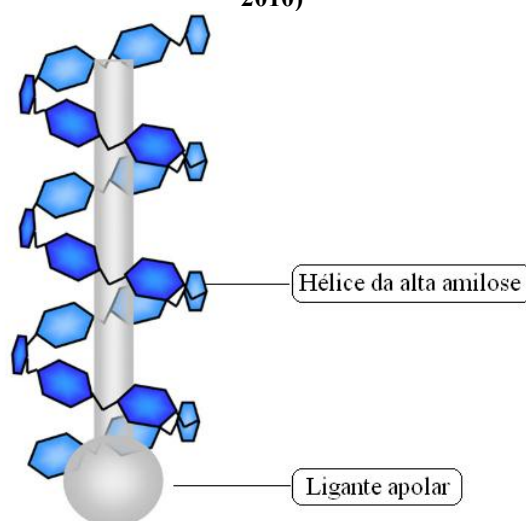
De acordo com a Figura 3, podemos observar que as dimensões das CD's variam com o número de unidades de glicose, originando diferença no diâmetro da cavidade interna. Seus diâmetros são de aproximadamente 5,2, 6,6 e 8,4Å para a α , β e γ -CD, respectivamente, no entanto, um dos critérios para formação dos complexos de inclusão é que a molécula hospede deve se encaixar inteiramente, ou ao menos parcialmente, dentro da cavidade da CD (CONNOR, 1997; SINGH et al., 2002; CEREDA, VILPOUX, 2003), tornando essa característica uma limitação para complexação de muitos fármacos, principalmente na α -CD.

No entanto para superar as limitações das CD's naturais, têm sido feitas modificações químicas nas CD's, porém seus elevados custos de pesquisa e produção e limitam sua incorporação ao mercado farmacêutico (RIBEIRO et al., 2003 CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007).

Devido à configuração α (1-4), a amilose apresenta a habilidade de assumir conformação em hélice de dimensões variadas, possibilitando a complexação de moléculas de diferentes tamanhos. Suas fitas helicoidais ocorrem de forma que os grupamentos hidroxílicos apresentam-se dispostos na superfície externa da hélice, enquanto grupamentos metileno e oxigênios glicosídicos ficam voltados para a superfície interna (Figura 4), resultando em uma parte interior mais hidrofóbica semelhante ao que ocorre com as CD's (IMMEL, LICHTENTHALER, 2000).

Figura 4: Conformação espacial da amilose

A cavidade hidrofóbica da hélice da amilose proporciona sítios de ligação com uma elevada afinidade com ligantes hidrofóbicos, sendo que a presença desse ligante induz a modificações na conformação helicoidal favorecendo a formação de complexos (Figura 5) (PUTSEYS et al., 2010).

Figura 5: Complexo de inclusão: amilose com ligante hidrofóbico (PUTSEYS et al., 2010)

Os consecutivos giros da hélice são estabilizados por ligações de van der Waals e pontes de hidrogênio inter e intra-hélices (RAPPENECKER, ZUGENMAIER, 1981). No entanto, a força motriz para a formação do complexo é, provavelmente, de natureza hidrofóbica e envolve a transferência das moléculas hóspedes hidrofóbicas que estão em meio aquoso para o meio menos polar (interior da hélice) (KUBIK, WULFF, 1993; FANTA et al., 1999).

Cada molécula hóspede exerce influencia nas dimensões da hélice, conforme descrito para a complexação da amilose com iodo, ácidos graxos, compostos aromáticos determinando o número de monômeros de glicose por giro da hélice (SARKO, BILOSKI, 1980; PUTSEYS et al., 2010).

Durante a formação do complexo, as cadeias de amilose podem ser organizadas de forma desordenada ou amorfa (complexos tipo I) ou em dois tipos de formas helicoidais: a dupla hélice (formas A ou B) ou a hélice simples (forma V), sendo que essa última resulta em uma forma semicristalina, organizada em lamelas (complexo tipo II) interligada por regiões amorfas da cadeia do polissacarídeo, conferindo a este tipo de complexo maior estabilidade a hidrólise ácida, possibilitando uma vetorização dos fármacos para o intestino (UCHINO et al., 2001; ELIASSON, 2004; LALUSH et al., 2005; CONDE-PETIT et al., 2006; BIAIS et al., 2006; LESMES et al., 2008; PUTSEYS et al., 2010).

A forma mais comum da amilose V é a V_6 , caracterizada por 6 átomos de glicose por giro da hélice (RUTSCHMANN et al., 1989; MILOJEVIC et al., 1996; JOUQUAND et al., 2006; CARDOSO et al., 2007). Na família V_6 há ainda três subtipos de estruturas conhecidas: V_{6I} , V_{6II} e V_{6III} , dependendo do ligante. Essas estruturas diferem quanto ao volume existente entre as hélices, de forma que para V_{6I} a molécula está dentro da hélice, para V_{6II} e V_{6III} a molécula pode estar dentro das hélices ou localizada entre elas (BIAIS et al. 2006).

No entanto, para moléculas hóspedes maiores, a amilose pode assumir outra estrutura helicoidal denominada V_8 , que apresenta cavidade maior, com 8 resíduos de glicose por giro. A existência de uma forma V_7 é ainda discutível (HELBERT, CHANZY, 1994; SHOGREN et al., 2006).

A taxa de hidrólise da amilose está relacionada com a resistência do complexo e atividade enzimática. Assim, no caso de baixa atividade enzimática (enzimas salivares), somente o material amorfo é degradado e os complexos remanescentes podem agregar-se, resultando em cristalitos mais perfeitamente organizados (HEINEMANN et al.,

2005). No intestino delgado, no entanto, a concentração enzimática mais elevada, bem como o maior tempo de contato, permite a hidrólise dos complexos, predominantemente do tipo I.

A formação dos complexos de inclusão com alta amilose pode proteger a molécula hospede do ambiente ácido do estômago e aumentar sua biodisponibilidade liberando a molécula hospede em porções do intestino mediante a digestão enzimática, principalmente por ação da enzima pancreatina, tornando uma estratégia para liberação sítio específica de diferentes fármacos (LALUSH et al., 2005, CONDE-PETIT et al., 2006; YANG et al, 2009; ; LAY et al., 2011; KONG, ZIEGLER, 2014).

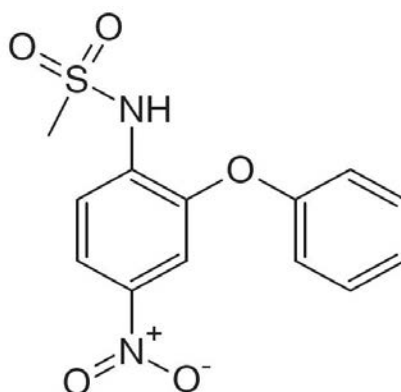
A preparação de complexos de inclusão de amilose, usualmente é conduzida pela mistura de uma solução aquosa de amilose com uma solução alcoólica da molécula hóspede (GODET et al., 1995).

Embora complexos amilose-lipídeo venham sendo amplamente pesquisados para aplicação na área de alimentos (TUFVESON et al.; 2003 a, b; LALUSH et al.; 2005; LESMES et al., 2008; LESMES et al., 2009; YANG et al., 2009; FANTA et al.; 2010), por exemplo, para liberação de nutracêuticos, raros são os relatos de estudos envolvendo a aplicação desses complexos na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. Uchino e colaboradores (2002) e Tozuka e colaboradores (2006) realizaram estudos de caracterização de complexos de amilose com ácido salicílico e análogos e ácido p-aminobenzóico e análogos, respectivamente. Cohen e colaboradores (2008) obtiveram, caracterizaram e avaliaram a liberação de complexos com genisteína.

Os complexos de inclusão com alta amilose representam uma estratégia promissora para veiculação de fármacos para o intestino, uma vez que permite a inclusão de moléculas hóspedes de diferentes tamanhos, explorando material e processo simples e de baixo custo.

2.3 Nimesulida (NMS)

A NMS é um fármaco antiinflamatório não esteroide (AINE) que pertence à classe das sulfonilidas, cuja fórmula estrutural está ilustrada na Figura 6. (BRUNTON et al., 2006).

Figura 6: Fórmula estrutural da NMS

O nome químico da NMS é *N*-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanosulfonamida, com peso molecular 308,3g/mol. Esse fármaco apresenta-se sob a forma de pó cristalino levemente amarelado, com ponto de fusão em torno de 149 °C (BRITISH PHARMACOPEIA, 2003).

A NMS é uma substância muito estável que se decompõe sem gerar subprodutos intermediários somente em temperaturas acima de 208°C, essa estabilidade foi avaliada por Fallavena em 1998 através da utilização de métodos termogravimétricos. A NMS possui um caráter fracamente ácido, com pKa em torno de 6,5 (FALLAVENA, SCHAPOVAL, 1997; SINGH et al., 1999) e é praticamente insolúvel em água (10 µg/mL). Porém, é solúvel em solventes orgânicos, como metanol, etanol, acetona e dimetilformamida (THE MERCK INDEX, 2001).

De acordo com a Classificação Biofarmacêutica, a NMS pertence à categoria II, ou seja, apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade (AMIDON et al., 1995) e, para moléculas deste tipo, a dissolução *in vivo* deve ser a etapa limitante da absorção do fármaco. (DA SILVA, VOLPATO, 2002).

A NMS possui propriedades analgésicas, antitérmicas e antiinflamatórias, com baixa incidência de efeitos adversos gastrointestinais, em casos de tratamentos em curto prazo. (RANG et al., 2000; BRUNTON et al., 2006).

A utilização de AINEs em doenças articulares, o que, em geral, exige altas doses em uso contínuo e prolongado, ocasiona uma elevada incidência de efeitos colaterais, principalmente sobre o trato gastrintestinal. Entre estes efeitos podem ser incluídos dispepsia, diarreia, dor epigástrica, náuseas e vômitos e, em alguns casos, sangramento

gástrico e ulceração, levando os pacientes à interrupção do tratamento (MAZZARINO, KNORST, 2007).

NMS é muito utilizada como fármaco modelo para estudos de solubilidade, devido à sua característica hidrofóbica (PAREKH et al., 2011) e devido a essa característica foi utilizada como fármaco modelo nesse trabalho.

2.4 Praziquantel (PZQ)

Doenças parasitárias, como a esquistossomose, são provocadas por protozoários ou helmintos patogênicos, afetam bilhões de pessoas no mundo inteiro. Dentre as condições que promovem estas infecções a principal é a falta de condições sanitárias adequadas, higiene pessoal, debilitação e resistência orgânica comprometida do hospedeiro, resistência aos fármacos utilizados na quimioterapia e as substância no controle de vetores, contudo torna-se necessário o seu combate através das medidas adequadas preventivas que dependem de educação, melhoria de vida e tratamento correto (MATSUMOTO, 2002; GOODMAN, GILMAN, 2007; LIMA, 2009)

Com o avanço na terapêutica esquistossomicida o tratamento utilizando os antimoniais trivalentes foi substituído por fármacos como o PZQ (NOVAES et al., 1999; MOURÃO, 2001; FREZZA et al., 2007).

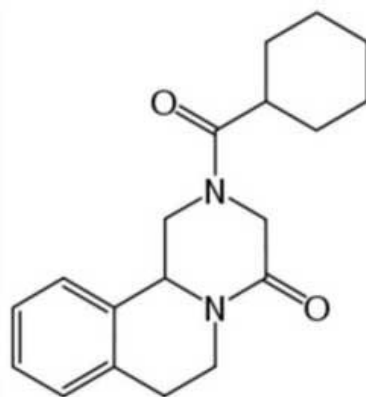
O PZQ é um sólido cristalino com faixa de fusão de 136-142°C e com baixa solubilidade em água (0,4mg/mL a 25°C) (THE MERCK INDEX, 1983; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)

O PZQ pode ser encontrado tanto na forma enantiomérica (-) PZQ que é a forma ativa ou como na forma de uma mistura racêmica (1:1 na mistura de enântiômeros) (\pm)PZQ. A caracterização de ambos pode ser feita através do resultado do difratograma de raios-X. As diferenças entre a forma racêmica e enantiomérica pode ser notada tanto pelos pontos de fusão como pelos difratogramas de raios-X. No difratograma a forma racêmica ((\pm)PZQ) possui picos de intensidade menores e mais largos e o (-)PZQ, picos mais estreitos e de alta intensidade (CIOLI, 1998; FENWICK et al., 2003; GREENBERG, 2005; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

O nome químico do PZQ é a 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4 H-pirazino (2,1-a) isoquinolin-4-ona; sua fórmula química $C_{19}H_{24}N_2O_2$, e peso

molecular de 312,41 g/mol, sua fórmula estrutural está ilustrada na Figura 7 (SHUHUA, 2005; USP 2006).

Figura 7: Fórmula estrutural do PZQ



3.0 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar complexos de inclusão de alta amilose com diferentes fármacos, bem como avaliar o desempenho como sistemas para liberação de fármaco ao longo do TGI.

Etapas para se alcançar o objetivo:

- ✓ Avaliar a influência da presença do ácido palmítico, da temperatura, da proporção fármaco:amilose e características estruturais do fármaco na obtenção de complexos de inclusão.
- ✓ Avaliar o tipo de complexo obtido através das análises de DSC, DRX e RMN.
- ✓ Determinar as características físicas dos complexos formados (tamanho de partícula, morfologia de superfície e capacidade de absorção de líquido).
- ✓ Avaliar a resistência enzimática e o comportamento de liberação do fármaco em meios que simulem os diferentes ambientes do TGI.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

- ácido clorídrico, teor 37% (Quimis);
- ácido palmítico (Sigma-Aldrich);
- água purificada; millipore Milli-Q[®]
- álcool etílico absoluto (Vetec Química Fina);
- alta amilose - Hylon VII[®] (National Starch & Chemical);
- fosfato de potássio monobásico (Vetec Química Fina);
- lauril sulfato de sódio, lote: 1202185 (Vetec Química Fina);
- nimesulida, lote: NM/3680308, teor 99,2% (Henrifarma);
- pancreatina (Sigma-Aldrich);
- praziquantel, lote: 111007 (Valdequímica).

4.1.2 Equipamentos

- Balança analítica (Bel Engineering);
- Centrífuga (Sorvall[®] TC);
- Dispositivo para determinação da capacidade de absorção de líquido segundo Enslin;
- Difrátômetro de Raios X, modelo D5000 (Siemens[®]);
- Equipamento de Análise Térmica, DSC (DSC1 STARe System da Mettler Toledo)
- Equipamento para ensaio de dissolução Hanson Research[®] modelo; New Hanson SR-8 Plus
- Espectrofotômetro de infravermelho (Perkin Elmer[®]);
- Espectrofotômetro ultravioleta/visível (Hewlett Packard-Kayak[®] XA);
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (VARIAN[®] – INNOVA 400);
- Estufa com circulação forçada de ar (FABBE[®], modelo 170);
- Liofilizador, (Edwards[®]);

- Microscópio-Estereoscópio (Leica MZAPO);
- Microscópio eletrônico de alta resolução (Jeol JSM-7500F);
- Peagômetro (Quimis).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo dos complexos de inclusão

Para o desenvolvimento dos complexos de inclusão várias metodologias foram analisadas e, de acordo com os resultados preliminares, foi possível selecionar a metodologia mais adequada para a formação dos complexos. Essa metodologia selecionada como a mais promissora foi baseada nas metodologias propostas por Bhosale e Zilgler, (2010) e Putsey e colaboradores (2010).

Os complexos de inclusão foram preparado com uma quantidade pré-determinada (5% em relação à massa de alta amilose) de ácido palmítico (AG) foi dissolvida em 10mL de uma solução alcoólica dos fármacos, NMS e PZQ, em diferentes concentrações (0,6g/mL, 0,2g/mL, 0,1g/mL). Essa solução foi misturada com a alta amilose, obtendo sistemas nas seguintes proporções Fármaco/Alta amilose de 1:5, 1:15 e 1:30, em seguida, foi evaporado o álcool, em temperatura ambiente. Após a secagem as mistura AG/Fármaco/Alta Amilose foram dispersas em água destilada (10% p/v) e submetida ao aquecimento em 60°C ou 90°C, por 2 horas. Amostras também foram preparadas sem a adição de AG: A separação dos complexos foi realizada por centrifugação (20000rpm/10min.). Os complexos foram lavados por seis vezes (condição pré-determinada³) com solução hidroalcoólica (50%), para remoção de resíduos de AG e fármaco não complexado. Os complexos foram submetidos à secagem por liofilização (Figura 8).

³Obs: O número de lavagem dos complexos foi determinado através dos resultados obtidos pelo teor de fármaco complexado, microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) e difração de Raios-X.

Figura 8: Ilustração esquemática do preparo dos complexos de inclusão

Foram preparadas amostras sem os fármacos com e sem a presença de AG e foram rotuladas como AA:AG 60°C e AA:AG 90°C (amostras preparados com alta amilose na presença de AG variando a temperatura) e AA 60°C e AA 90°C (amostras preparados apenas com a alta amilose, variando a temperatura) essas amostras forma utilizadas em alguns testes como intuito comparativo.

4.2.2 Cálculo de rendimento dos complexos

O rendimento dos complexos é quantidade total de produto obtido em relação à somatória da quantidade de cada componente adicionado. Os rendimentos dos complexos foram calculados através da equação 1. Para os complexos sem a presença do AG esse termo foi excluído da equação (YANG et al., 2009).

$$Re(\%) = \frac{\text{massa complexo}}{\text{massa de amilose} + AG + \text{fármaco}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.2.3 Validação da metodologia analítica para NMS e PZQ.

Espectros de absorção na região do ultravioleta (UV) foram obtidos através das análises das soluções de NMS e do PZQ em diferentes meios: etanol, meio ácido com lauril sulfato de sódio (LSS) (HCl 0,1N, pH 1,2) e tampão fosfato com LSS (pH 6,9).

A validação do método de quantificação foi realizada através da determinação dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, recuperação, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (ICH, 1996; BRASIL 2003; USP, 2011).

4.2.3.1 Determinação do espectro de absorção da NMS e do PZQ.

Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção da nimesulida, soluções em diferentes meios e concentrações foram submetidas à varredura na região do UV (200-450nm): etanol (30µg/mL), meio ácido (pH 1,2) contendo 1,5% de LSS (40µg/mL) e tampão fosfato com LSS (60µg/mL) (pH 6,9).

Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção do praziquantel, soluções em diferentes meios e concentrações foram submetidas à varredura na região do UV (200-450nm): etanol (500µg/mL), meio ácido (pH 1,2) contendo 0,5% de LSS (300µg/mL), tampão fosfato com 0,5% de LSS (300µg/mL) e tampão fosfato com 1% pancreatina (70µg/mL).

4.2.3.2 Especificidade

A especificidade de um procedimento analítico representa sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância analisada na presença de outras substâncias, que poderiam interferir na sua determinação, como por exemplo, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A determinação da especificidade pode ser realizada através da análise de amostra contendo esses interferentes, determinando a capacidade do método em gerar informações confiáveis na sua presença (ICH, 1996, BRASIL, 2003).

Para verificar a interferência de algum componente nas soluções de NMS, as soluções analisadas no item 4.2.3.1 foram adicionadas de alta amilose (100µg/mL). O tampão fosfato também foi também adicionado de pancreatina (1%). Estas soluções foram submetidas à varredura na região do UV entre 250-450nm e os picos de absorção foram registrados.

Para verificar a interferência dos componentes nas soluções de PZQ, as soluções analisadas no item 4.2.3.1 foram adicionadas de alta amilose (100µg/mL). O tampão fosfato foi também adicionado de pancreatina (1%), porém houve influencia da pancreatina, portanto foi analisado solução tampão fosfato de PZQ (70µg/mL) com 1% pancreatina contaminadas ou não com 100µg/mL de alta amilose. Estas soluções foram submetidas à varredura na região do UV entre 250-450nm e os picos de absorção foram registrados.

4.2.3.3. Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

A linearidade do método foi determinada através da obtenção da curva analítica da NMS e do PZQ nos meios descritos no item 4.2.3.1.

Para a solução alcoólica de NMS, soluções com concentrações variando de 5 a 50 µg/mL foram preparadas a partir da solução estoque (100 µg/mL), enquanto para o meio ácido soluções com concentrações entre 5 e 40 µg/mL foram obtidas a partir da solução estoque (100 µg/mL). Para o tampão fosfato (pH 6,9) soluções com concentrações de 40 a 100µg/mL foram preparadas a partir da solução estoque (200µg/mL).

Para o PZQ soluções alcoólicas com concentrações variando de 150 a 700µg/mL foram preparadas a partir da solução estoque (2mg/mL), enquanto em meio ácido soluções com concentrações entre 30 a 300 µg/mL foram obtidas partindo da solução estoque (350µg/mL). Para o tampão fosfato soluções com concentrações 30 a 300µg/mL foram obtidas partindo da solução estoque (350µg/mL) e para tampão fosfato (pH 6,9) com 1% de pancreatina soluções com concentrações de 30 a 250 µg/mL foram preparadas a partir da solução estoque (350µg/mL).

Todas as diluições foram preparadas em triplicata.

As curvas analíticas foram geradas, relacionando a concentração dos fármacos à resposta obtida por espectroscopia na região do UV, através dos valores de absorbância correspondentes às concentrações.

4.2.3.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade das respostas obtidas quando uma série de medidas é realizada para uma mesma amostra, em idênticas condições de teste. Esta é considerada em três níveis, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) em triplicata ou, no mínimo, de seis determinações com 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003).

A partir das soluções estoque de NMS em etanol e em meio ácido foram preparadas soluções nas concentrações de 5, 10 e 40 µg/mL. Para o tampão fosfato foram preparadas soluções nas concentrações de 40,60 e 100 µg/mL.

Para o PZQ em etanol foram preparadas soluções nas concentrações de 150, 300 e 700 µg/mL. Para o meio ácido e tampão fosfato foram preparadas soluções nas concentrações de 30,150 e 300 µg/mL.

Para o PZQ em tampão fosfato com 1% de pancreatina foram preparadas soluções nas concentrações de 30, 150 e 250µg/mL.

Todas as concentrações das soluções foram preparadas em triplicada e correspondem às concentrações baixa, média e alta do intervalo linear da curva analítica.

4.2.3.5 Recuperação

A proximidade dos resultados obtidos através do método analítico é avaliada em relação ao valor verdadeiro, aceito como referência. Pode ser expressa como percentagem de recuperação, pelo ensaio de adição de uma quantidade conhecida de analito à amostra (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

As concentrações adicionadas de NMS e PZQ correspondem às regiões inferior, mediana e superior da curva analítica (idem ao item 4.2.3.4). As amostras foram analisadas por espectroscopia de absorção na região do UV.

A recuperação foi calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida de fármaco adicionada à amostra, acrescida dos intervalos de confiança, utilizando a seguinte fórmula:

$$\%R = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: %R= percentagem de recuperação, C = média das concentrações determinadas experimentalmente, C₀ = concentração teórica inicial.

4.2.3.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Limite de Detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

O Limite de Quantificação (LQ) é a menor quantidade de fármaco em uma amostra que pode ser quantificada ou medida com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

Para a realização destas análises foram preparadas três soluções em diferentes meios nas concentrações próximas ao limite inferior da curva analítica.

Para NMS em etanol e em meio ácido as concentrações foram 5, 7 e 10µg/mL e na solução tampão fosfato as concentrações foram 40,50 e 60µg/mL.

Para PZQ em etanol as concentrações foram 150, 200 e 300µg/mL, em meio ácido e nas soluções tampão fosfato com e sem pancreatina as concentrações foram, 30, 50, 70µg/mL.

O desvio padrão dos valores encontrados foram avaliados para que, pelos respectivos cálculos matemáticos, fosse possível determinar LD e LQ. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O LD e LQ foram calculados, baseando-se no desvio padrão (s) e na inclinação da curva analítica (α) expressos como:

$$LD = 3 \times \frac{s}{\alpha} \quad \text{Equação 3}$$

$$LQ = \frac{s}{\alpha} \times 10 \quad \text{Equação 4}$$

Onde: s = desvio padrão, α = inclinação da curva analítica

4.2.4 Determinação do teor de fármaco complexado

O teor de fármaco complexado representa a quantidade de fármaco complexado comparado com a quantidade total de fármaco adicionado na formulação.

Uma massa pré-determinada de complexos (15mg) foi incubada em 1 mL de solução de pancreatina por 24h à 37°C (LALUSH et al., 2005; YANG et al. 2009), para completa digestão dos complexos e liberação do fármaco complexado.

Após o período de incubação, foi feita a extração do fármaco com etanol e posterior quantificação por espectrofotometria no UV-Vis.

A solução de pancreatina utilizada no ensaio foi preparada através da dispersão de 0,177g de pancreatina em 20mL de tampão fosfato 20mM (0,04% de NaCl e pH 6,9). Em seguida essa preparação foi centrifugada (1500rpm/10min) e depois submetida ao processo de filtração, utilizando o sobrenadante (COHEN et al., 2008).

Com base nas diferentes proporções de fármaco: polímero o teor de fármaco complexado para cada amostra foi determinado segundo equação 5.

$$\% \text{ fármaco complexado} = \frac{\text{massa } F \text{ quantificada do na sol. pancreática}}{\text{massa teórica de } F \text{ no complexo}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

4.2.5 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As propriedades térmicas dos materiais isolados, das misturas física (NMS MF 1:5, NMS MF 1:5AG, PZQ MF 1:5 e PZQ MF 1:5AG), das amostras de alta amilose submetidas a diferentes temperaturas (AA 60°C e AA 90°C), dos complexos de inclusão com e sem fármacos foram determinadas por calorimetria diferencial de varredura em analisador DSC1 STARE System-Mettler Toledo. Pesou-se 5mg das amostras em cadinho de alumínio de 100µL e as amostras foram aquecidas, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50ml/min. O intervalo de temperatura foi de 25 a 200°C com razão de aquecimento de 10°C/min.

O cálculo do conteúdo (C) da fração cristalina da NMS foi baseado na área do pico de DSC, para isso, utilizou a equação 6 (WAGNER, 2009; BHOSALE, ZIEGLER. 2010) .

$$C = \frac{\Delta H_{NMS} \text{ amostras não complexadas}}{\Delta H_{NMS} \text{ total}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

4.2.6 Difração de Raios X (DRX)

Os complexos obtidos, fármacos isolados e a alta amilose foram avaliados através de difratogramas obtidos em difratômetro de raios X, Siemens[®], modelo D5000 com velocidade do goniômetro de 0,02/min, sob radiação de Cu-K α ($\lambda=1,5406\text{\AA}$) e com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 4° e $70^\circ(2\theta)$ e algumas amostras (com PZQ) de 2° e $70^\circ(2\theta)$ devido à observação de picos antes de $4^\circ(2\theta)$.

4.2.7 Análise Espectroscópica por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Pastilhas contendo 1mg dos complexos selecionados e 100mg de KBr anidro foram preparadas em prensa hidráulica. Os espectros de FTIR foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer 1000 com 16 scans em 4cm^{-1} e resolução de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.2.8 Tamanho e forma das partículas

A análise de forma e a distribuição granulométrica das partículas foram avaliadas através da digitalização das imagens em estereoscópio Leica MZAPO. Nesta análise, as partículas foram fotografadas em aumento de 80x. O diâmetro de Feret a 0° e a circularidade de 300 partículas foram determinados a partir da digitalização das imagens em computador utilizando o programa analisador de imagem *Motic Images Advances 3.2*.

4.2.9 Morfologia de superfície

A análise da morfologia de superfície foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) com equipamento Jeol JSM-7500F –Field Emission SEM/Analytical Field Emission SEM”. As amostras NMS, Alta Amilose, AG e os complexos selecionados com NMS e PZQ foram fixadas sobre uma fita de carbono e revestidas com material condutor, nesse caso o carbono foi utilizado.

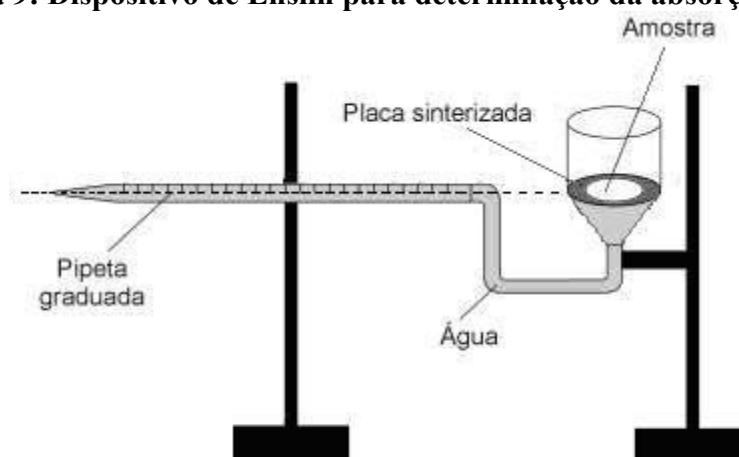
4.2.10 Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido (RMN)

Foram obtidos espectros de RMN ^{13}C (Varian, modelo Inova 400 campo de 9,4 T) em estado sólido com a técnica de polarização cruzada, rotação da amostra no ângulo mágico e desacoplamento de alta potência, conhecida como CP/MAS. Usou-se um pulso de $\pi/2$ de 4 μs , tempo de contato de 1ms, 1024 pontos, tempo de repetição de 3s, desacoplador com banda de 60 KHz e janela espectral de 40 KHz. As amostras foram empacotadas em rotores de zircônia de 5mm e submetidas a uma rotação no ângulo mágico de 8 KHz. Foram obtidos 1000 transientes e os espectros foram filtrados com função de decaimento exponencial ($I_b = 20$). Foi usado hexametilbenzeno (HMB) como referência (δ 17,22 ppm).

4.2.11 Determinação da capacidade de absorção de líquidos

A capacidade de absorção de líquido das amostras foi avaliada em meios com valores de pH que simulassem os diferentes ambientes do trato gastrintestinal (TGI), mas sem adição de enzimas: meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2) e tampão fosfato (pH 6,9). A determinação da capacidade de absorção de líquido foi realizada no dispositivo de Enslin (Figura 9) (VOIGT, 2000).

Figura 9: Dispositivo de Enslin para determinação da absorção de líquido



Para a avaliação da absorção de líquido foi utilizado 0,05g das amostras selecionadas e o equilíbrio de absorção foi determinado através da repetição consecutiva dos valores de meio absorvido pela amostra.

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em % de meio absorvido em relação à massa inicial da amostra, de acordo com a equação 7.

$$\%A = \frac{V}{m} \quad \text{Equação 7}$$

Onde: %A é a porcentagem de absorção de líquido, V (mL) é o volume de meio absorvido e m(g) é a massa inicial da amostra.

Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey e o nível de significância adotado foi p<0,05.

4.2.12 Determinação dos perfis de liberação *in vitro* dos fármacos

*4.2.12.1 Seleção dos complexos de inclusão para teste de liberação *in vitro* dos fármacos.*

Através dos resultados de determinação do teor de fármaco complexado (item 5.4), DSC (item 5.5) e DRX (item 5.6) foram selecionadas as amostras NMS 1:30AG60°C, NMS 1:3060°C, PZQ 1:5AG90°C e PZQ 1:30AG60°C para o teste de liberação *in vitro*.

*4.2.12.2 Teste de dissolução para determinação dos perfis liberação *in vitro* dos fármacos*

O teste de dissolução foi realizado em estação de dissolução Hanson Research modelo, New Hanson SR-8 Plus, utilizando o aparato pá (50rpm), em 900 mL de meios com diferentes valores de pH, a 37°C. Aliquotas foram removidas em intervalos pré-determinados e quantificadas em espectrofotômetro UV-VIS. Para o teste, uma massa pré-determinada de complexos, equivalente a 100mg de NMS e 120mg de PZQ, foi acondicionada em *sinker* para Pallets malha 60, os quais foram centralizados no fundo das cubas de dissolução. Os meios utilizados foram:

a) meio ácido: 900mL de HCl 0,1N (pH 1,2) adicionado de 1,5% LSS para complexos com NMS e 0,5% de LSS para complexos com PZQ, durante 120minutos.

b) tampão fosfato: 900mL de tampão fosfato pH 6,9 contendo 1,5% LSS para complexos com NMS e 0,5% LSS para complexos com PZQ, durante 360minutos.

c) **tampão fosfato com enzima pancreatina:** 900mL de tampão fosfato pH 6,9 contendo 1% de pancreatina. Nesse meio não foi utilizado tensoativo devido à desnaturação da enzima ou redução de sua atividade (DAHL et al., 1991; ZHAO et al., 2004; LESMES et al. 2008)

4.2.13 Análise dos mecanismos de liberação *in vitro* dos fármacos

A partir dos dados de liberação obtidos, foi realizada a análise dos mecanismos envolvidos no processo de liberação do fármaco, através da aplicação de vários modelos matemáticos (Tabela 1), com auxílio do software Sigma Plot 10. Os modelos matemáticos foram empregados nos perfis completos de liberação, exceto os modelos de Peppas e Weibull em que foram utilizados os dados referentes a 60% de liberação do fármaco.

Tabela 1: Modelos matemáticos de liberação

Modelos	Equação
Baker and Lonsdale	$\frac{2}{3} \left[1 - \left(1 - \frac{F}{100} \right)^{\frac{2}{3}} \right] - \left(\frac{F}{100} \right) = k_{BL} t$
Primeira ordem	$F = 100 \left(1 - e^{-k_1 t} \right)$
Higuchi	$F = k_H \sqrt{t}$
Hixson and Crowell	$F = \left[1 - (1 - k_{HC} t) \right]^3$
Peppas	$F = k_p t^n$
Weibull	$F = 1 - \exp(-at^b)$

Onde: F = quantidade de fármaco liberado pelo tempo (t); k_{BL} , k_1 , k_H , k_{HC} and k_p = constantes de liberação; n e b = expoentes de liberação.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Preparo dos complexos de inclusão

Durante o aquecimento dos complexos de inclusão o amido pode gelatinizar, devido à presença de água que desestabiliza a região amorfa e do intumescimento das regiões cristalinas, que consistem principalmente da dupla hélice da amilopectina que com o aumento do nível de hidratação ocorre o desdobramento das hélices. (JACOBS, DELCOUR, 1998; JACOBS et al., 1998; TESTER, DEBON, 2000, KAWAI et al., 2012).

Quando o amido é gelatinizado na presença de ácido graxo ou tensoativos a amilose forma complexos de inclusão helicoidal (GUDMUNDSSON, ELIASSON; 1990; SZCZODRAK, POMERANZ, 1992; EERLINGEN et al., 1994; TUFVESSON et al., 2001; KAWAI 2012)

Para preparar os complexos de inclusão tornou-se necessário a adaptação de uma metodologia apropriada para esses complexos, visto que há poucos relatos na literatura utilizando complexos com alta amilose com adição de fármacos.

As soluções dos complexos apresentaram turbidez durante o preparo e precipitação após o resfriamento, tais características são indício da formação de complexo preparado com amido (CONDE-PETIT et al., 2006).

Com base na metodologia avaliada como a mais promissora, foram obtidos os complexos apresentados na Tabela 2:

Tabela 2: Complexos de Inclusão
Amostras

NMS Temperatura 60°C	NMS 1:5AG60°C NMS 1:560°C NMS 1:15AG60°C NMS 1:1560°C NMS 1:30AG60°C NMS 1:30 60°C
NMS Temperatura 90°C	NMS 1:5AG90°C NMS 1:590°C NMS 1:15AG90°C NMS 1:1590°C NMS 1:30AG90°C NMS 1:30 90°C
PZQ Temperatura 60°C	PZQ 1:5AG60°C PZQ 1:560°C PZQ 1:15AG60°C PZQ 1:1560°C PZQ 1:30AG60°C PZQ 1:3060°C
PZQ Temperatura 90°C	PZQ 1:5AG90°C PZQ 1:590°C PZQ 1:15AG90°C PZQ 1:1590°C PZQ 1:30AG90°C PZQ 1:3090°C

* As abreviaturas dos complexos foram descritas na seção de “lista das abreviações e símbolos”

5.2 Rendimento dos Complexos

Os complexos com NMS e PZQ apresentaram elevados valores de rendimento (Tabela 3 e 4)

Tabela 3: Rendimento (%) dos complexos de inclusão com NMS

Amostras	Rendimento (%)
NMS 1:5AG60°C	73,73
NMS 1:5AG90°C	74,13
NMS 1:560°C	83,13
NMS 1:590°C	77,82
NMS 1:15AG60°C	70,36
NMS 1:15AG90°C	86,77
NMS 1:1560°C	74,78
NMS 1:1590°C	99,06
NMS 1:30AG60°C	75,75
NMS 1:30AG90°C	72,98
NMS 1:3060°C	74,39
NMS 1:3090°C	82,55

Tabela 4: Rendimento (%) dos complexos de inclusão com PZQ

Amostras	Rendimento (%)
PZQ 1:5AG60°C	62,94
PZQ 1:5AG90°C	57,86
PZQ 1:560°C	62,60
PZQ 1:590°C	63,29
PZQ 1:15AG60°C	60,48
PZQ 1:15AG90°C	84,45
PZQ 1:1560°C	57,31
PZQ 1:1590°C	70,49
PZQ 1:30AG60°C	67,88
PZQ 1:30AG90°C	64,62
PZQ 1:3060°C	59,42
PZQ 1:3090°C	66,39

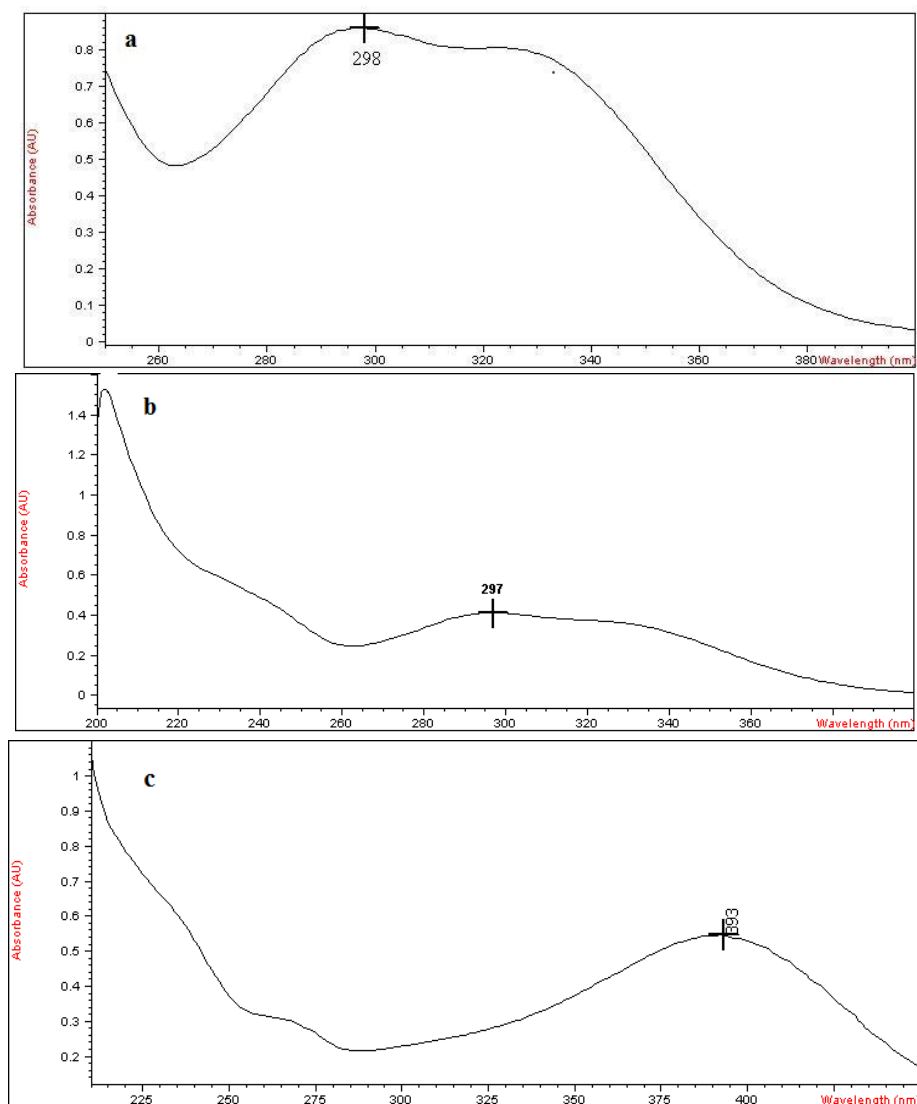
Os complexos com NMS apresentaram valores de rendimento entre 70,36 e 99,06%, enquanto os complexos com PZQ apresentaram rendimento inferior ao dos complexos preparados com NMS, variando entre 57,31 e 84,45%.

O elevado rendimento pode ser atribuído à presença de uma fração de lipídio livre de cadeia longa na composição da alta amilose, que possivelmente favorece o aumento da inclusão de moléculas hospedes dentro da cavidade hidrofóbica da amilose. (TAPANAPUNNITIKUL et al., 2008; LAY et al. 2011)

5.3 Validação da metodologia analítica da NMS e do PZQ

5.3.1 Determinação do espectro de absorção da NMS e do PZQ

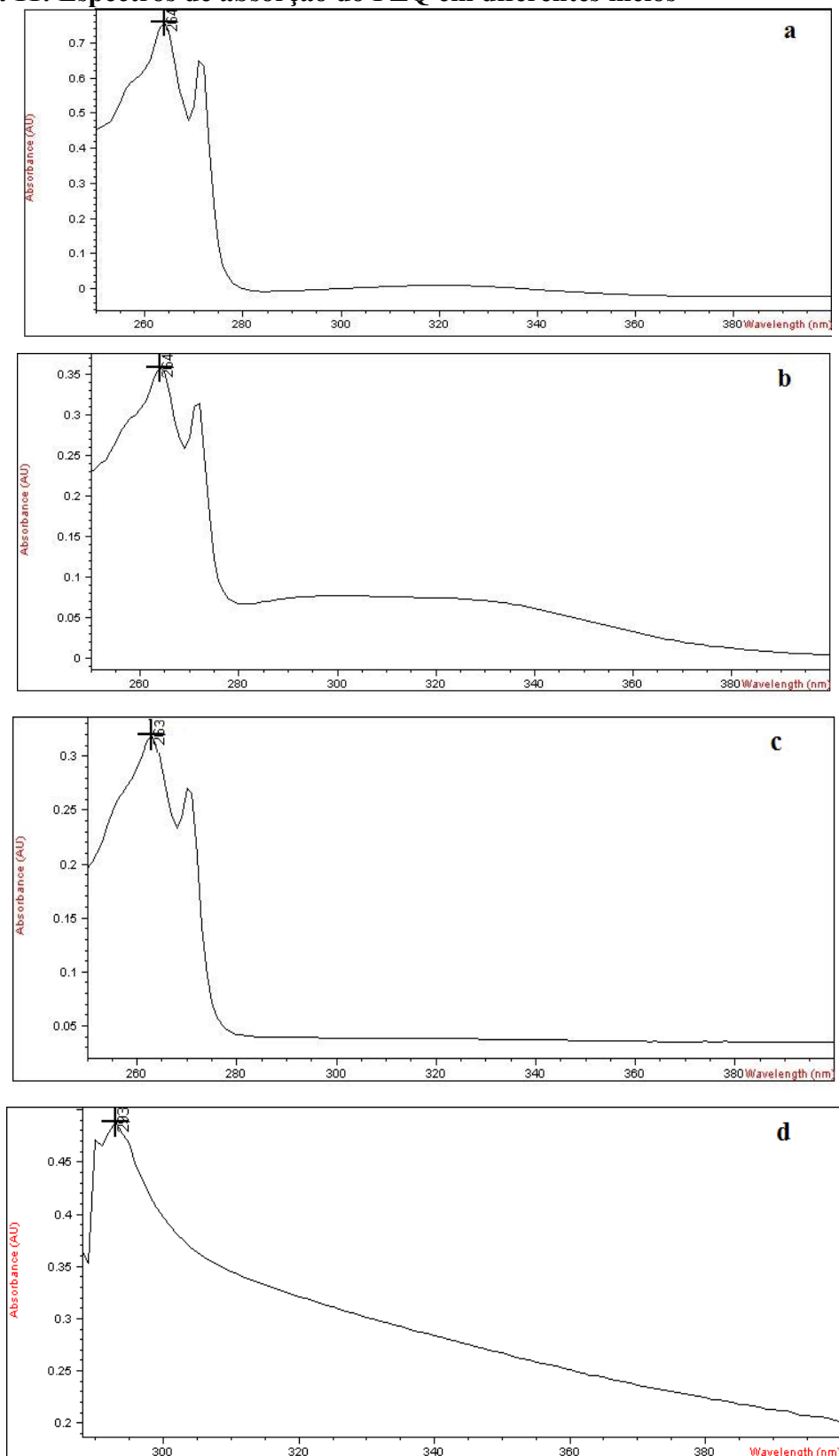
Os espectros de absorção da NMS em etanol, em meio ácido e em tampão fosfato foram obtidos por espectrofotometria na região do UV e os picos de absorção máxima obtidos em 298 nm, 297nm e 393 nm, respectivamente (Figura 10).

Figura 10: Espectros de absorção da NMS em diferentes meios

a= NMS (30 μ g/mL) em etanol, b= NMS (40 μ g/mL) em meio ácido, c= NMS (60 μ g/mL) em tampão

Os espectros de absorção do PZQ em etanol, em meio ácido, tampão fosfato, tampão fosfato com 1% de pancreatina foram obtidos por espectrofotometria na região do UV e os picos de absorção máxima obtidos em 264nm, 264nm, 263nm e 293 nm, respectivamente (Figura 11).

Figura 11: Espectros de absorção do PZQ em diferentes meios



a= PZQ (500 μ g/mL) em etanol, b= PZQ (300 μ g/mL) em meio ácido, c= PZQ (300 μ g/mL) em tampão e d= PZQ (300 μ g/mL) em tampão com pancreatina

5.3.2 Especificidade

No estudo de especificidade do método para NMS em etanol, meio ácido e em tampão fosfato utilizou-se soluções de NMS em presença de 100 μ g de possíveis interferentes (alta amilose) e em tampão fosfato a presença de 1% de pancreatina (Figuras 12, 13, 14 e 15).

Figura 12: Espectro na região do UV em etanol ___ Solução de 30 μ g de NMS ___ Solução de 30 μ g de NMS com 100 μ g Alta amilose

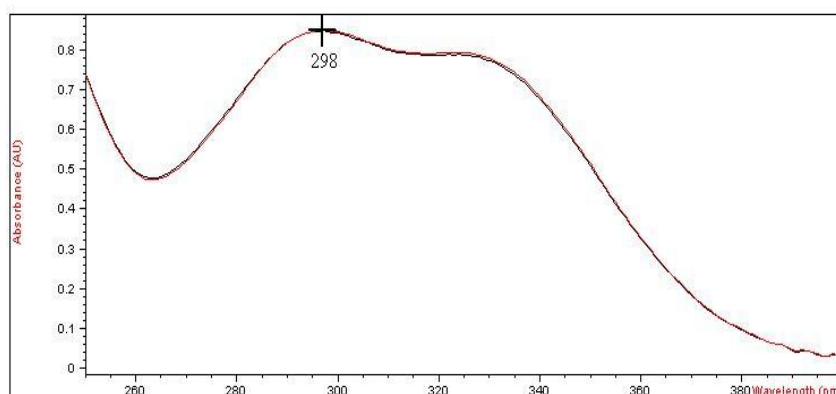


Figura 13: Espectro na região do UV em meio ácido ___ Solução de 40 μ g de NMS ___ Solução de 40 μ g de NMS com 100 μ g Alta amilose

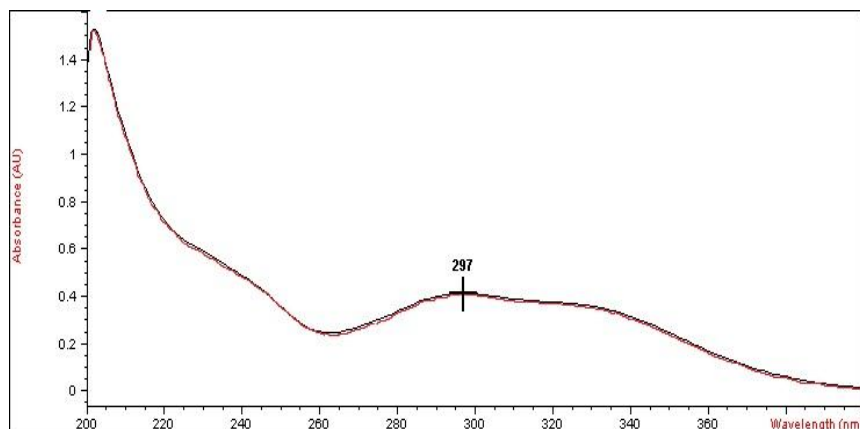


Figura 14: Espectro na região do UV em tampão fosfato ____ Solução de 60µg de NMS ____ Solução de 60µg de NMS com 100µg Alta amilose

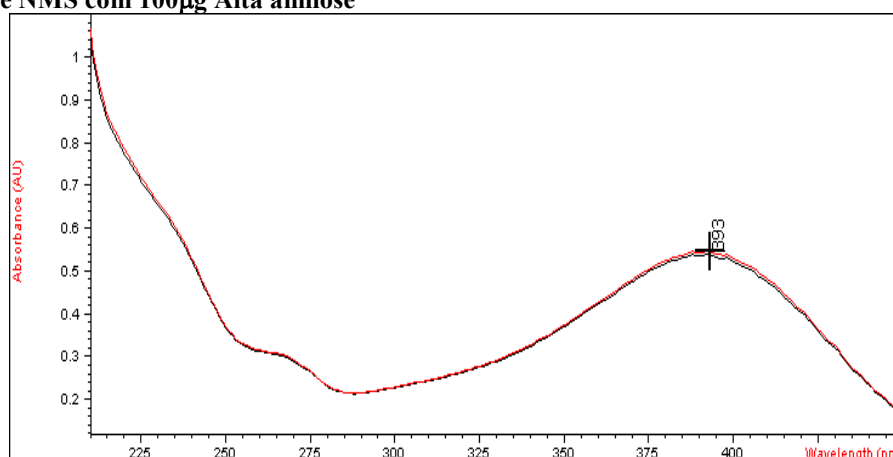
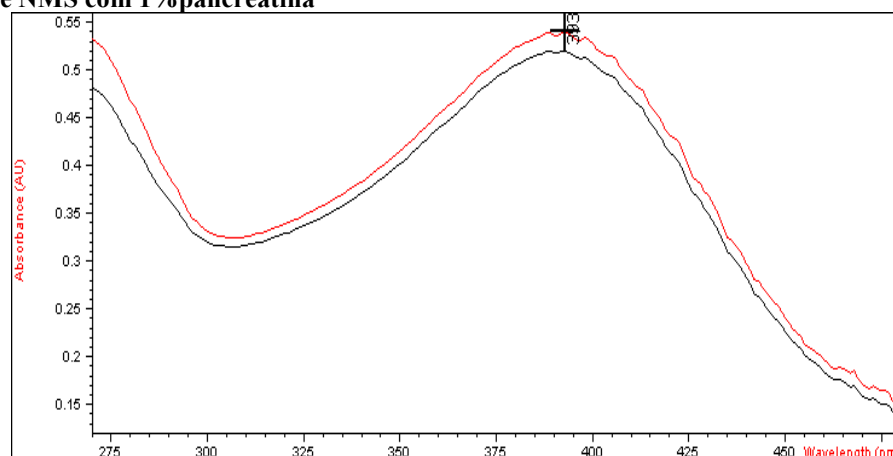


Figura 15: Espectro na região do UV em tampão fosfato ____ Solução de 60µg de NMS ____ Solução de 60µg de NMS com 1%pancreatina



Os métodos propostos para NMS são seletivos e específicos, para os meios analisados, uma vez que não se observou interferência no comprimento de onda de máxima absorção (Figuras 12-15).

No estudo de especificidade do método para PZQ em etanol, meio ácido com 0,5% LSS (HCl 0,1N, pH 1,2) e em tampão fosfato (pH 6,9) utilizou-se soluções de PZQ em presença de 100µg de possíveis interferentes (alta amilose) em tampão fosfato a presença de 1% de pancreatina. No tampão fosfato a presença de 1% de pancreatina, mostrou interferir no comprimento de onda de máxima absorção, portanto esse meio também foi analisado na presença de 100µg de possíveis interferentes (alta amilose) (Figuras 16, 17, 18 e 19).

Figura 16: Espectro na região do UV em etanol ___ Solução de 500 μ g do PZQ ___ Solução de 500 μ g do PZQ com 100 μ g Alta amilose

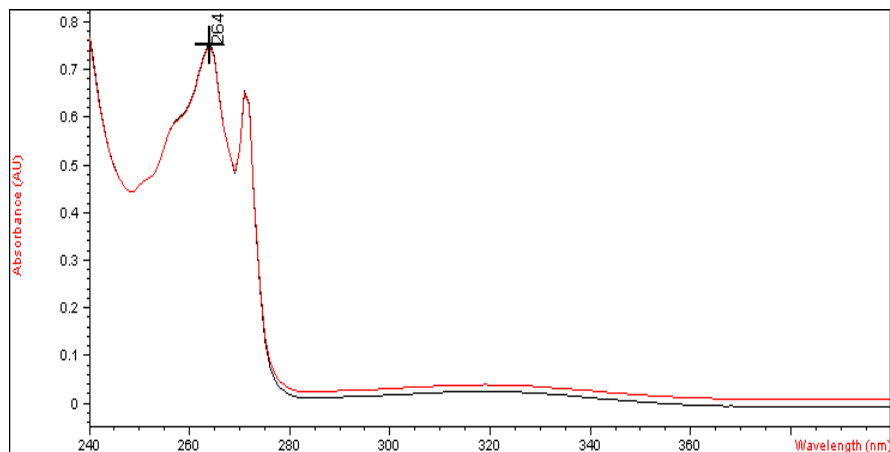


Figura 17: Espectro na região do UV em meio ácido ___ Solução de 300 μ g do PZQ ___ Solução de 300 μ g do PZQ com 100 μ g Alta amilose

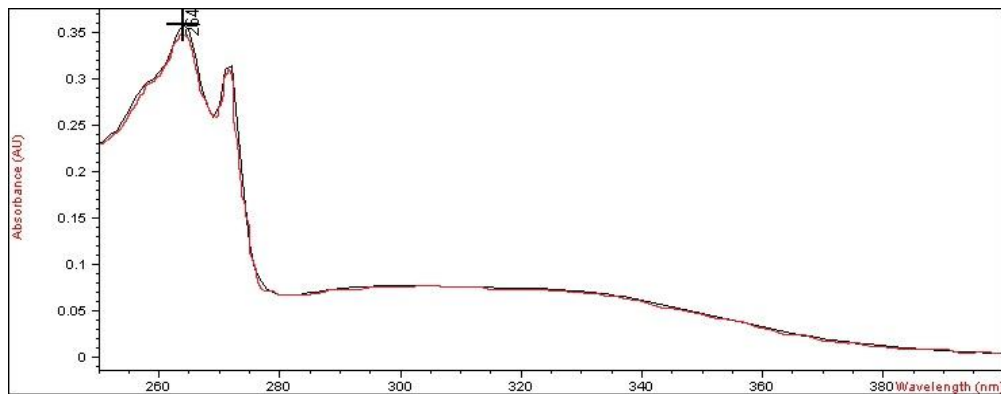


Figura 18: Espectro na região do UV em solução tampão fosfato ___ Solução de 300 μ g do PZQ ___ Solução de 300 μ g do PZQ com 100 μ g Alta amilose

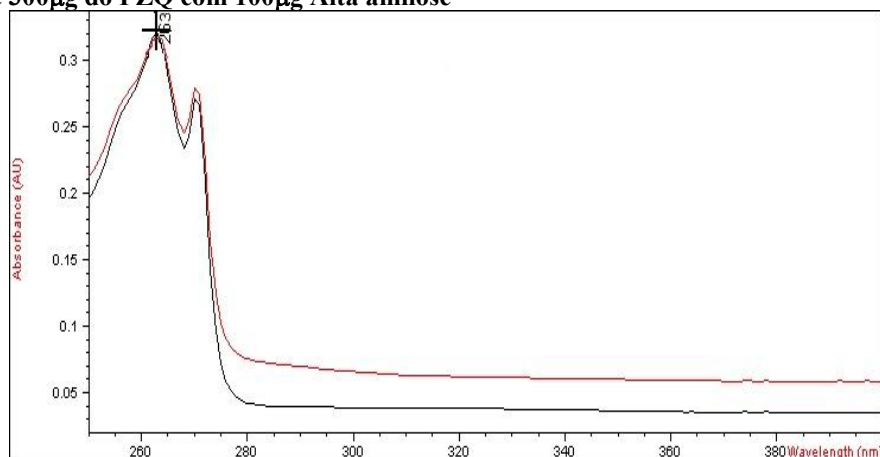
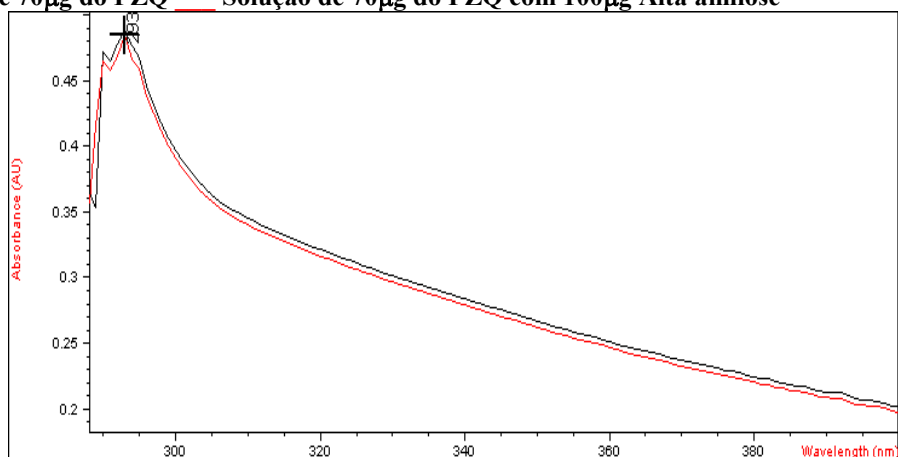


Figura 19: Espectro na região do UV em solução tampão fosfato com 1% de pancreatina —
Solução de 70µg do PZQ — Solução de 70µg do PZQ com 100µg Alta amilose

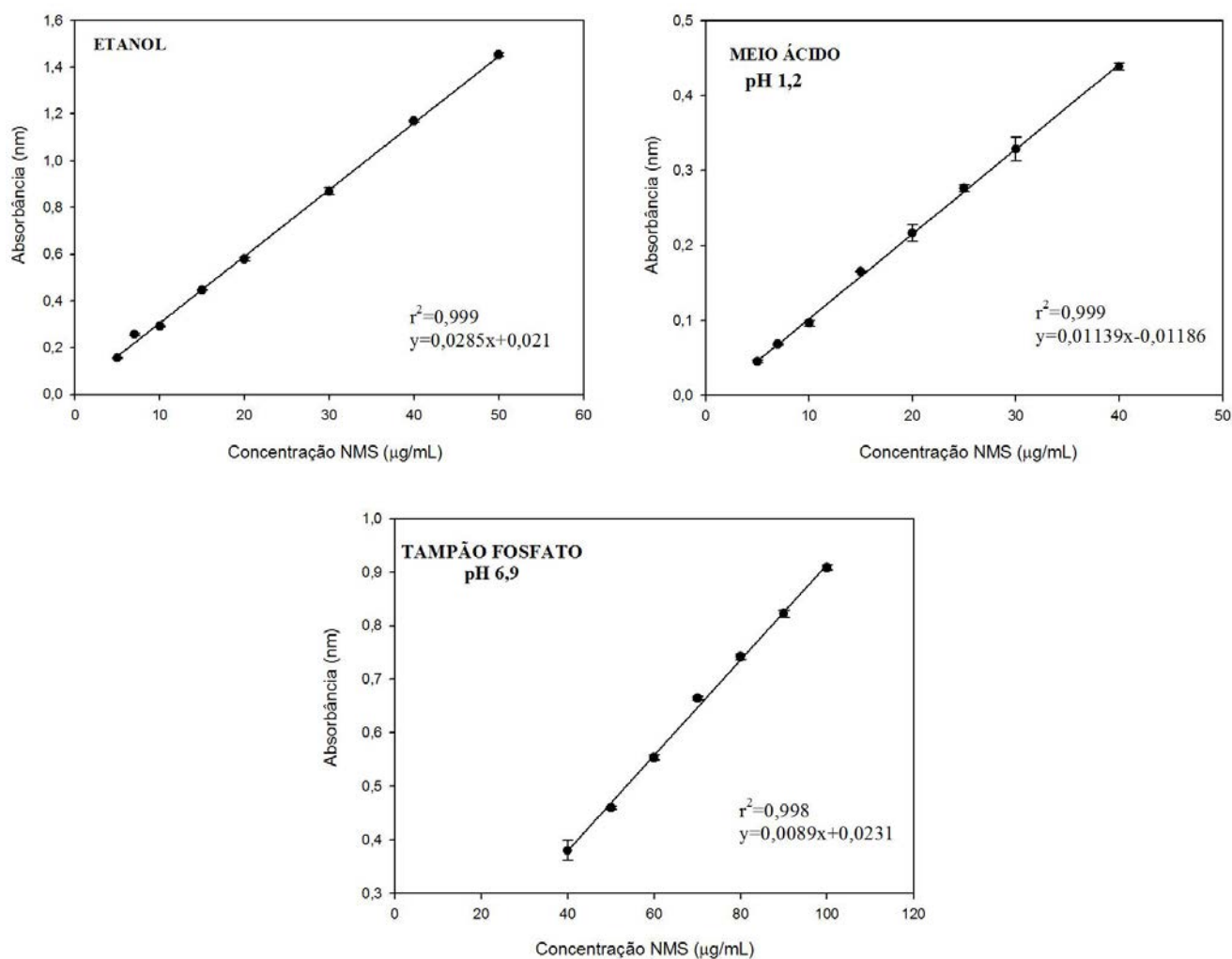


Os métodos propostos para PZQ também foram seletivos e específicos, para os meios analisados, uma vez que não se observou interferência no comprimento de onda de máxima absorção (Figuras 16-19).

5.3.3 Linearidade

As curvas analíticas para quantificação da NMS em diferentes meios são exibidas na Figura 20.

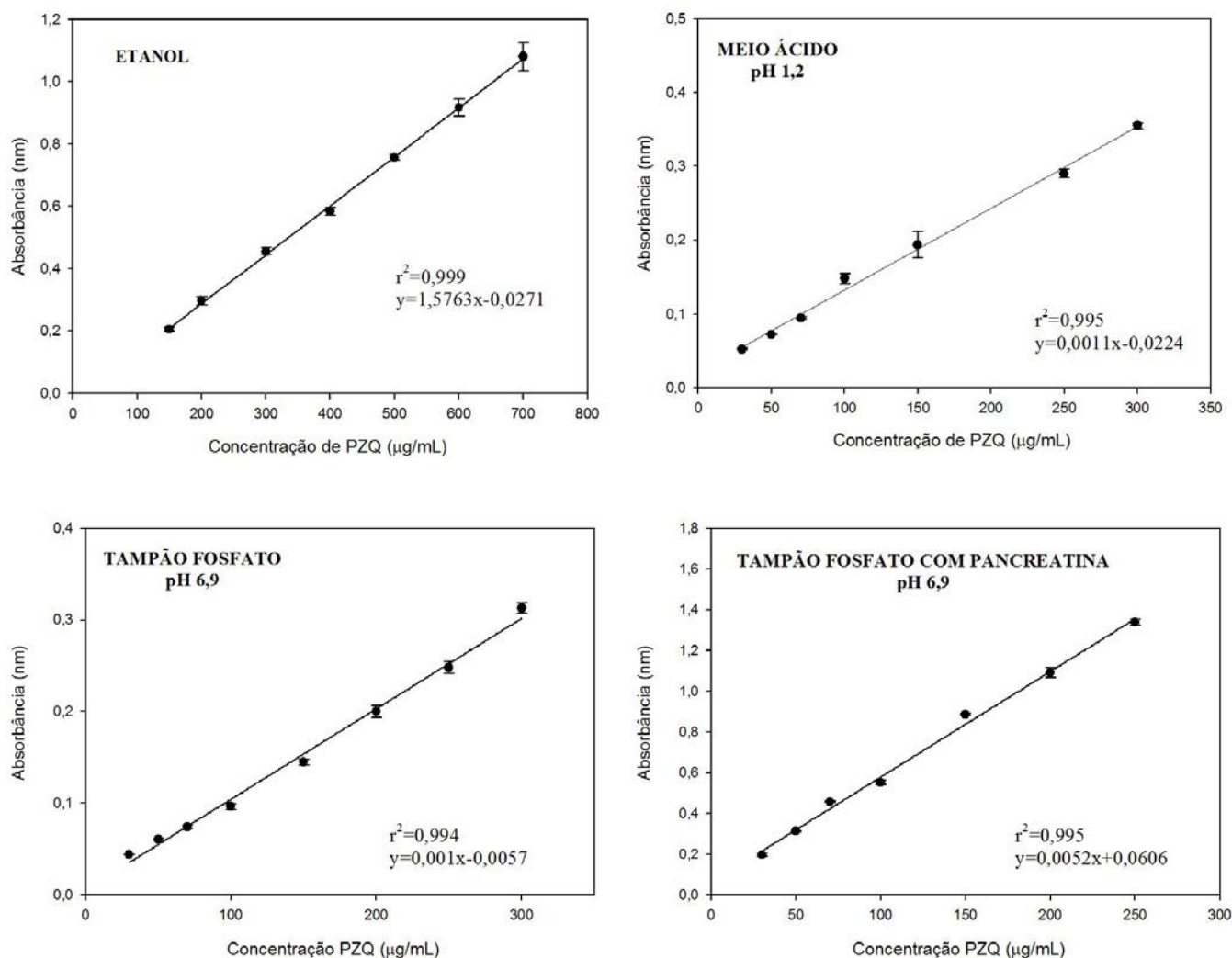
Figura 20: Curva analítica da NMS em diferentes meios



Todos os resultados atenderam aos critérios aceitáveis do coeficiente de correlação (r) que deve ser de 0,99 (BRASIL, 2003).

As curvas analíticas para quantificação do PZQ em diferentes meios são exibidas na Figura 21.

Figura 21: Curva analítica do PZQ em diferentes meios



Todas as curvas analíticas de PZQ atenderam aos critérios mínimos aceitáveis do coeficiente de correlação (r) que deve ser de 0,99 (BRASIL, 2003).

5.3.4 Precisão

Os valores dos testes de precisão das diferentes soluções de NMS e de PZQ são exibidos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão em diferentes meios com NMS

	Concentração	Média Absorbância	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)
Etanol	5µg/mL	0,155	0,002	1,419
	10µg/mL	0,292	0,002	0,733
	40µg/mL	1,169	0,004	0,373
Meio ácido	5µg/mL	0,045	0,002	4,213
	10µg/mL	0,096	0,004	4,370
	40µg/mL	0,439	0,005	1,094
Tampão Fosfato	40µg/mL	0,379	0,018	4,754
	60µg/mL	0,554	0,004	0,772
	100µg/mL	0,908	0,005	0,534

Tabela 6: Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão em diferentes meios com PZQ

	Concentração	Média Absorbância	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)
Etanol	150µg/mL	0,203	0,0038	1,853
	300µg/mL	0,456	0,011	2,465
	700µg/mL	1,085	0,037	3,444
Meio ácido	30µg/mL	0,052	0,001	2,533
	100µg/mL	0,148	0,006	4,427
	300µg/mL	0,355	0,004	1,114
Tampão Fosfato	30µg/mL	0,041	0,001	1,188
	100µg/mL	0,096	0,003	3,499
	300µg/mL	0,313	0,005	1,471
Tampão Fosfato com pancreatina	30µg/mL	0,195	0,007	3,839
	150µg/mL	0,885	0,005	0,558
	250µg/mL	1,338	0,014	1,062

Os resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6 indicam que os métodos propostos são precisos para a quantificação de NMS e PZQ, obtendo-se um coeficiente de variação menor que 5% (BRASIL, 2003).

5.3.5 Recuperação

Os percentuais de recuperação (%R) da NMS em diferentes meios são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Percentual de recuperação da NMS em diferentes meios.

	Concentração	Média Absorbância	Quantidade Recuperada (µg/mL)	%R
Etanol	5µg/mL	0,155	4,748	94,970
	10µg/mL	0,292	9,529	95,292
	40µg/mL	1,169	40,270	100,670
Meio ácido	5µg/mL	0,0452	5,009	100,180
	10µg/mL	0,0961	9,421	94,211
	40µg/mL	0,4386	39,548	98,870
Tampão Fosfato	40µg/mL	0,380	40,026	100,065
	60µg/mL	0,554	59,605	99,342
	100µg/mL	0,908	99,409	99,409

Os percentuais de recuperação (%R) do PZQ em diferentes meios são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Percentual de recuperação do PZQ em diferentes meios.

	Concentração	Média Absorbância	Quantidade Recuperada (µg/mL)	%R
Etanol	150µg/mL	0,155	146,037	97,358
	300µg/mL	0,446	306,266	102,089
	700µg/mL	1,169	705,540	100,791
Meio ácido	30µg/mL	0,052	26,837	89,457
	150µg/mL	0,194	155,608	103,739
	300µg/mL	0,355	302,303	100,768
Tampão Fosfato	30µg/mL	0,041	35,876	119,587
	150µg/mL	0,145	138,933	92,622
	300µg/mL	0,313	307,114	102,371
Tampão Fosfato com pancreatina	30µg/mL	0,195	25,879	86,264
	150µg/mL	0,885	158,645	105,763
	250µg/mL	1,339	245,781	98,312

Os resultados dos percentuais de recuperação (%R) demonstraram que os índices de recuperação estão adequados, dentro da faixa recomendada cujo intervalo é de 80 a 120% (BRASIL,2003).

5.3.6 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os valores obtidos na determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) da NMS e do PZQ estão apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9: Limite de detecção e limite de quantificação da NMS em diferentes meios

	Etanol	Meio ácido	Tampão Fosfato
Desvio Padrão médio	0,003	0,0035	0,009
Inclinação da curva analítica (α)	0,0285	0,01139	0,0089
LD ($\mu\text{g/mL}$)	0,295	0,922	3,008
LQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,982	3,072	10,027

Tabela 10: Limite de detecção e limite de quantificação do PZQ em diferentes meios

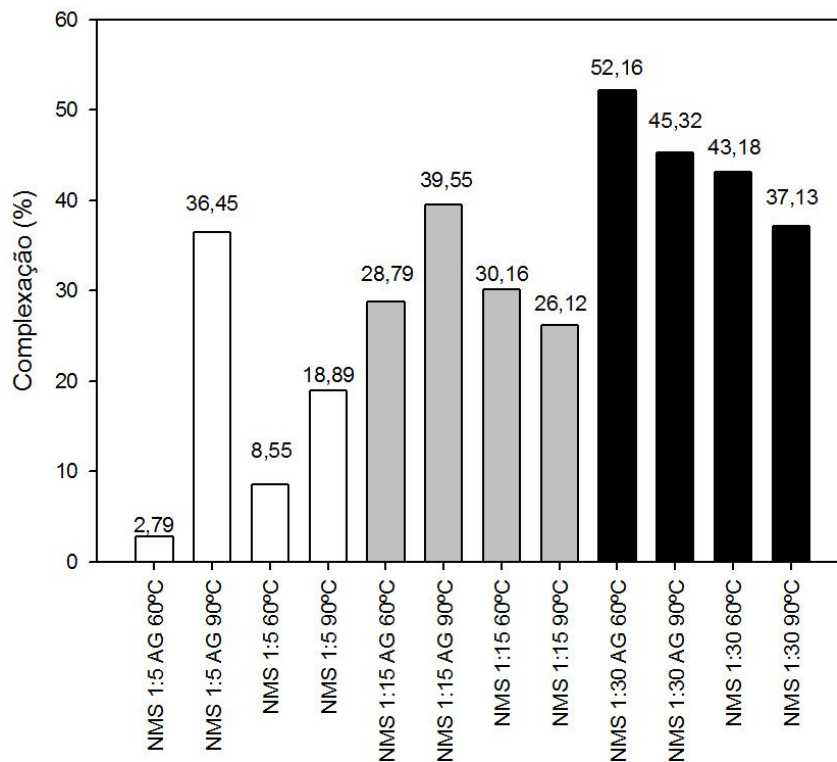
	Etanol	Meio ácido	Tampão Fosfato	Tampão Fosfato com pancreatina
Desvio Padrão médio	0,007	0,001	0,001	0,005
Inclinação da curva analítica (α)	1,5762	0,0011	0,001	0,0052
LD ($\mu\text{g/mL}$)	0,013	3,108	3,568	2,935
LQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,043	10,361	11,894	9,783

Os métodos para NMS e PZQ demonstraram capazes de detectar e quantificar o fármaco em reduzidas concentrações.

5.4 Determinação do teor de fármaco complexado

Os dados exibidos na Figura 22 demonstram a influência das proporções de NMS e polímero no teor de fármaco complexado.

Figura 22: Percentual de NMS complexada



A proporção 1:5 (fármaco:polímero) resultou nos menores valores de fármaco complexado (2,79-18,89%), exceto para a amostra NMS 1:5AG90°C que atingiu 36,45%, indicando que a elevação da temperatura favoreceu a formação dos complexos (Figura 22). Para esta proporção, a presença do AG não influenciou significativamente a formação do complexo.

As amostras na proporção 1:15 apresentaram valores de NMS complexada intermediários, entre 26,12% e 39,55%.

O maior teor de fármaco complexado foi obtido pelas amostras NMS 1:30AG60°C (52,16%), NMS 1:30AG90°C (45,32%) e NMS 1:3060°C (43,18%), evidenciando que à medida em que aumenta a proporção de polímero a complexação é favorecida. Nesta proporção, a temperatura de 60°C foi mais adequada para complexação de NMS, tanto na presença quanto na ausência de AG.

Através do conjunto de resultados pode-se observar que o aumento da proporção de polímero (1:30) resultou nos mais elevados valores de percentual de NMS complexada, esse comportamento pode ser explicado devido à presença de uma

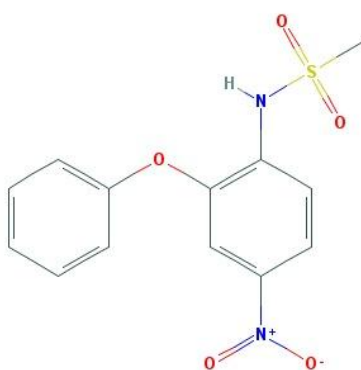
proporção mais elevada de alta amilose que proporciona mais sítios disponíveis para a complexação do fármaco.

Para esses complexos, além do aumento na proporção do polímero (1:30), as características da molécula hóspede (NMS) também determinam a capacidade de complexação com a amilose, tais como, tamanho, forma, hidrofobicidade e solubilidade em água. (TAPANAPUNNITIKUL et al., 2008).

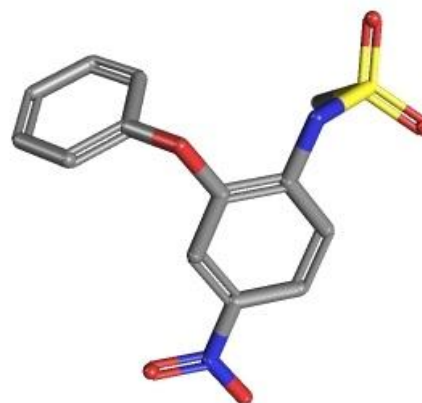
A NMS é um fármaco com características predominantemente hidrofóbicas, com escassa solubilidade em água (0,01mg/ml), o que deve favorecer a entrada da molécula na cavidade hidrofóbica das fitas helicoidais da amilose. Além disso, sua estrutura apresenta dois anéis aromáticos (Figura 23), o que deve contribuir para a inclusão desse fármaco na hélice da amilose, como também foi observado por Paiva e colaboradores (2013) em estudos com complexos de inclusão com β -ciclodextrina. Braga e colaboradores (2003) também estudaram a formação de complexos de inclusão com β -ciclodextrina e sal de nimesulida (4-nitro-2-phenoxyethanesulfonamide) e concluíram que a formação envolveu a inclusão do anel nitrofenil na cavidade da β -ciclodextrina.

Figura 23: Estrutura bi e tri-dimensional da NMS (BOLTON et al.2011)

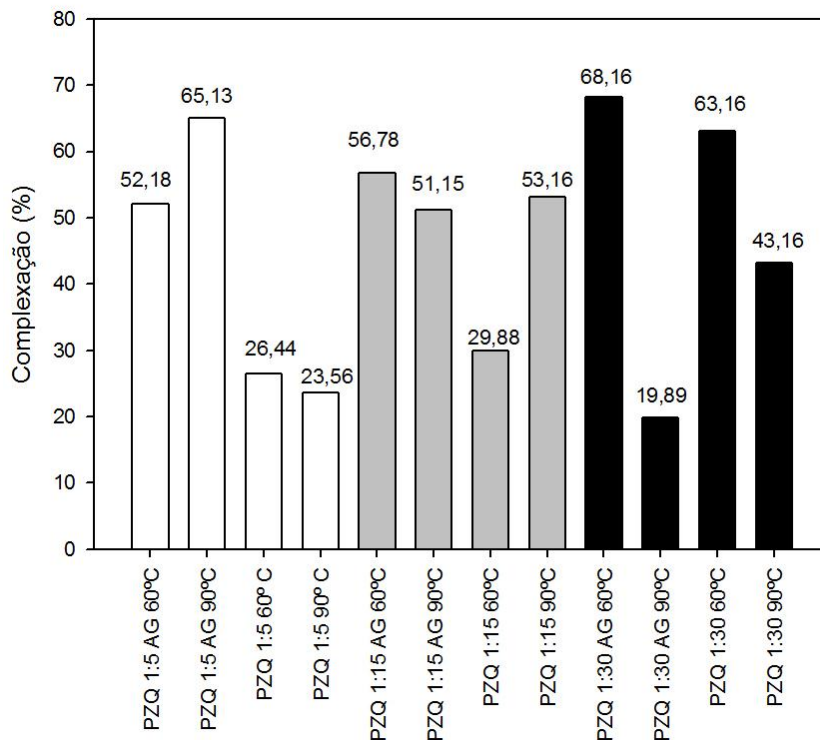
Estrutura bi-dimensional



Estrutura tri-dimensional



Os complexos com PZQ apresentaram alto teor de fármaco complexado (19,89-68,16%-Figura 24)

Figura 24: Percentual de PZQ complexado

Para as amostras na proporção 1:5, a temperatura não influenciou na complexação, no entanto a presença do AG demonstrou contribuir para a formação dos complexos, tanto em temperaturas a 60°C PZQ 1:5AG60°C (52,18%), PZQ 1:560°C (26,44%), quanto para a temperatura de 90°C PZQ 1:5AG90°C (65,13%) e PZQ 1:590°C(23,56%) (Figura 24).

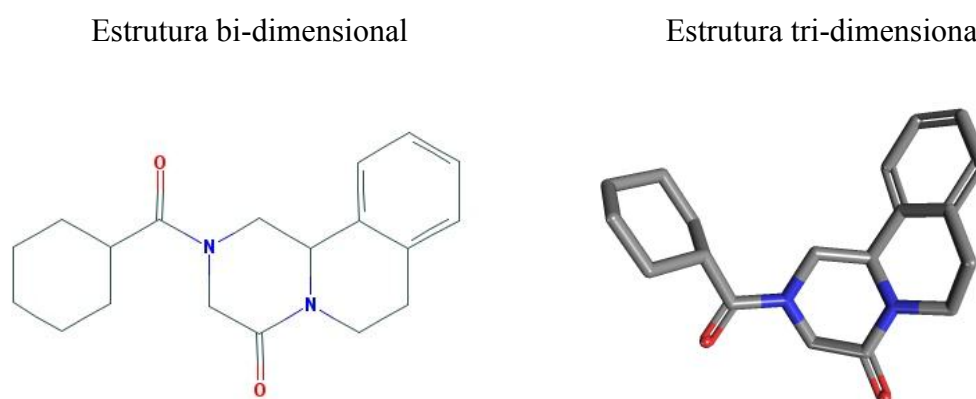
Para as amostras na proporção 1:15 também a temperatura não influenciou na complexação e a presença do AG favoreceu a formação do complexos tanto em temperatura de 60°C, como observado nas amostras PZQ 1:15AG60°(56,78%), PZQ 1:1560°C (29,88%), quanto em temperatura de 90°C, PZQ 1:15AG90°C (51,15%) e PZQ 1:1590°C (53,16%) (Figura 24).

No entanto, para as amostras na proporção 1:30 a temperatura de 60°C (Figura 24) favoreceu a complexação, enquanto a presença de AG não influenciou significativamente, visto que para esta proporção, as amostras sem o AG também seguiram esse comportamento.

Os complexos preparados com PZQ apresentaram valores mais elevados de teor de fármaco complexado do que os complexos preparados com NMS.

Considerando que a NMS e o PZQ tem semelhantes pesos e volumes moleculares (NMS 308,3g/mol; $212,4 \pm 3 \text{cm}^3$ e PZQ 312,41g/mol; $254,2 \pm 5 \text{cm}^3$), a maior percentagem de complexação com PZQ pode ser atribuído a presença de um anél isoquinólico em sua estrutura química (Figura 25), que segundo Jesus e colaboradores (2006) permitiu a complexação do PZQ com β -ciclodextrina. (THE MERCK INDEX, 1983, THE MERCK INDEX, 2001;CHEMSPIDER, 2013)

Figura 25: Estrutura bi e tri-dimensional do PZQ (BOLTON et al.2011)



5.5 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

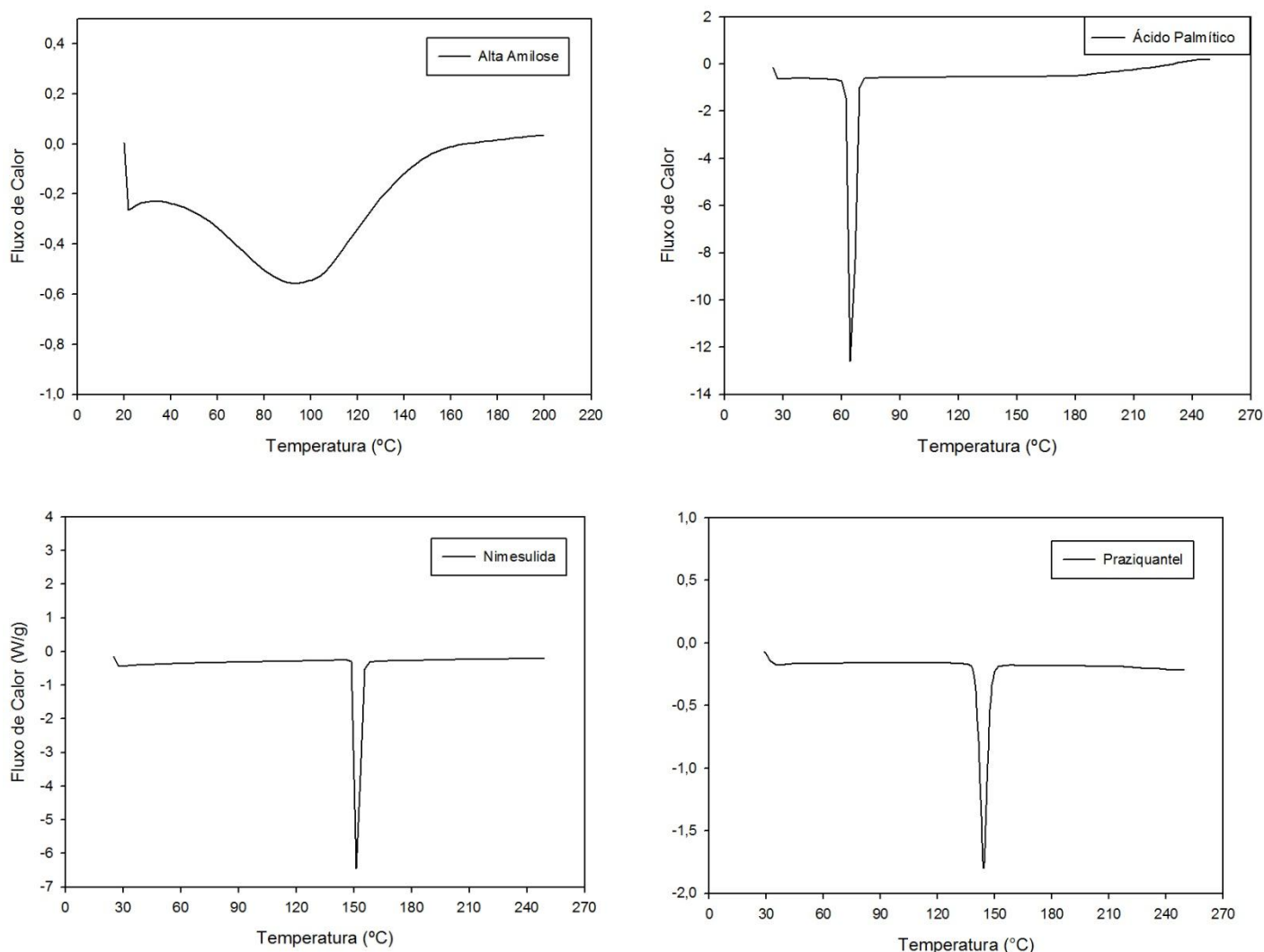
A análise térmica é uma técnica muito utilizada para uma investigação de complexos de inclusão (FRÖMMING, SZEJTLI, 1994, GIORDANO et al., 2001; JESUS, 2006).

Modificações no perfil termoanalítico obtidos em análises de DSC como variações relevantes nos valores de entalpias, desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos e reduções de intensidade permitem a identificação da formação de complexos de inclusão (LYRA et al., 2010).

Os dados apresentados na Figura 26 e Tabelas 11-13 demonstram as diferenças nos perfis, bem como variações nos valores de entalpias dos complexos em relação aos materiais isolados (Figura 26).

As curvas de DSC dos materiais isolados são exibidas na Figura 26.

Figura 26: Curvas de DSC dos materiais isolados



Nas curvas de DSC da NMS e do PZQ (Figura 26) são observados picos em 149,17°C e 140,1°C, respectivamente, correspondentes ao evento endotérmico de fusão dos fármacos (SINGH et al., 2001; BRITISH PHARMACOPEIA, 2003; USP 2006).

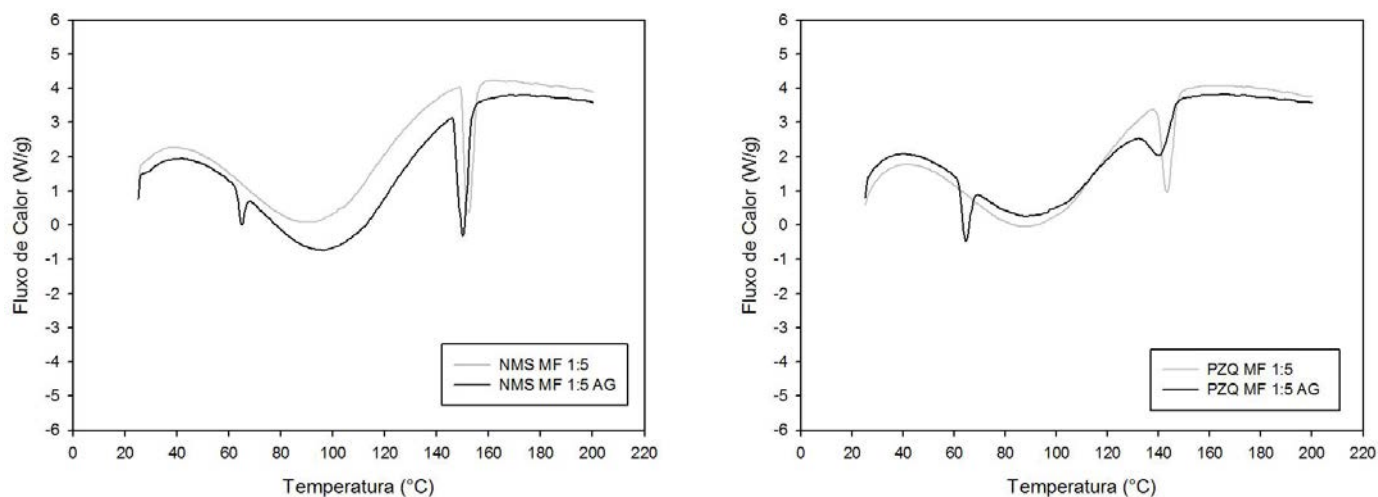
A curva de DSC do AG apresentou um pico endotérmico em 62,41°C que corresponde ao ponto de fusão deste material (GODET, et al., 1995; BHOSALE, ZIEGLER. 2010).

A alta amilose (Figura 26) apresenta um evento endotérmico entre 60°C e 120°C; com temperatura de fusão de 103,43°C (Tabela 12). Esse amplo evento endotérmico de fusão é particular de polímeros semi-cristalinos e ocorre devido a ampla distribuição do tamanho dos cristalitos (KARKALAS et al., 1995; FANTA et al., 2002 WAGNER, 2005; BHOSALE, ZIEGLER. 2010).

Após a fusão, todos os materiais demonstraram adequada estabilidade térmica, pois não houve indícios de eventos de degradação até temperatura de 250°C (Figura 26).

As curvas de DSC das misturas físicas são exibidas na Figura 27.

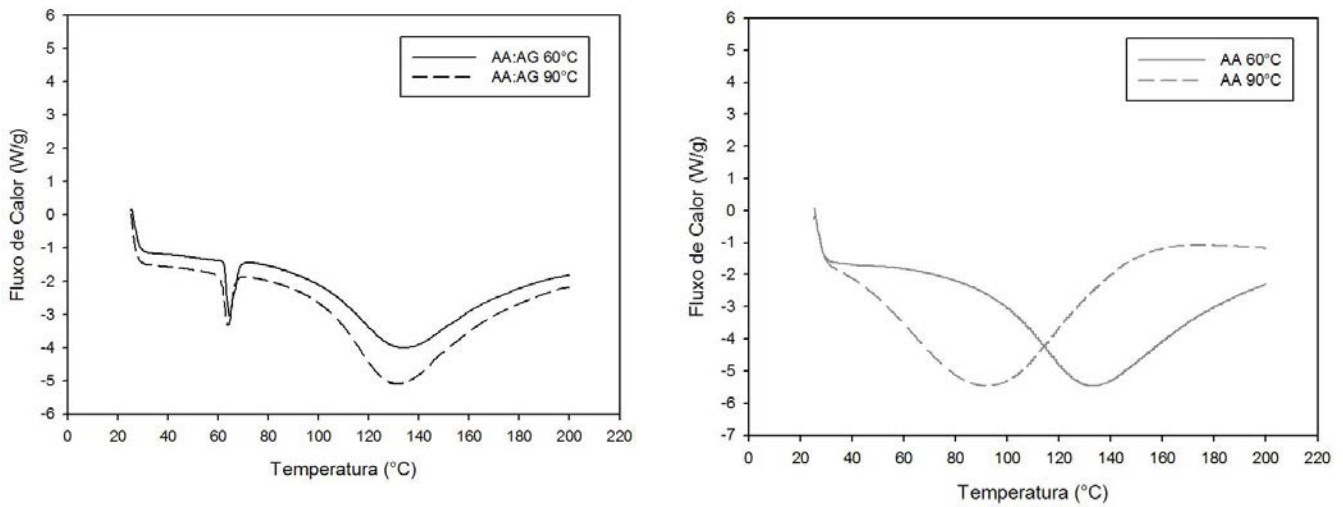
Figura 27: Curvas de DSC das misturas físicas



As misturas físicas foram preparadas na proporção de 1:5 devido as proporções de 1:15 e 1:30 não permitirem a observação dos picos relativos a NMS e nem ao PZQ, devido ao efeito de diluição na alta amilose.

De acordo com a Figura 27, as curvas das misturas físicas apresentam-se como uma somatória dos picos endotérmicos dos materiais isolado. Ligeiros deslocamentos de temperaturas foram observados para os picos de fusão do AG, NMS e PZQ os quais podem estar relacionados a uma pequena interação entre os materiais e o polímero (Tabela 11 e 13).

As curvas de DSC dos complexos preparados sem os fármacos são exibidas na Figura 28.

Figura 28: Curvas de DSC dos complexos preparados sem fármacos

As amostras AA:AG 60°C e AA:AG 90°C (Figura 28) apresentam dois eventos endotérmicos deslocados, relacionados ao AG e a alta amilose (Tabelas 11 e 12) O primeiro evento endotérmico, em aproximadamente 63°C é relacionado à fusão do AG não complexado; o segundo evento endotérmico entre 60-160°C é atribuído à alta amilose. O deslocamento dos eventos para temperaturas mais elevadas pode ser atribuído à formação de complexos amilose-lipídios, os quais se apresentam mais estáveis em relação à alta amilose. (MORRISON, 1995, DENARDI, DA SILVA, 2009).

Durante o preparo dessas amostras, que envolve o tratamento hidrotérmico, dependendo da temperatura pode ocorrer a gelatinização do amido e mudanças nas propriedades físico-químicas podem ser observadas devido à ruptura da estrutura cristalina (SINGH et al., 2003).

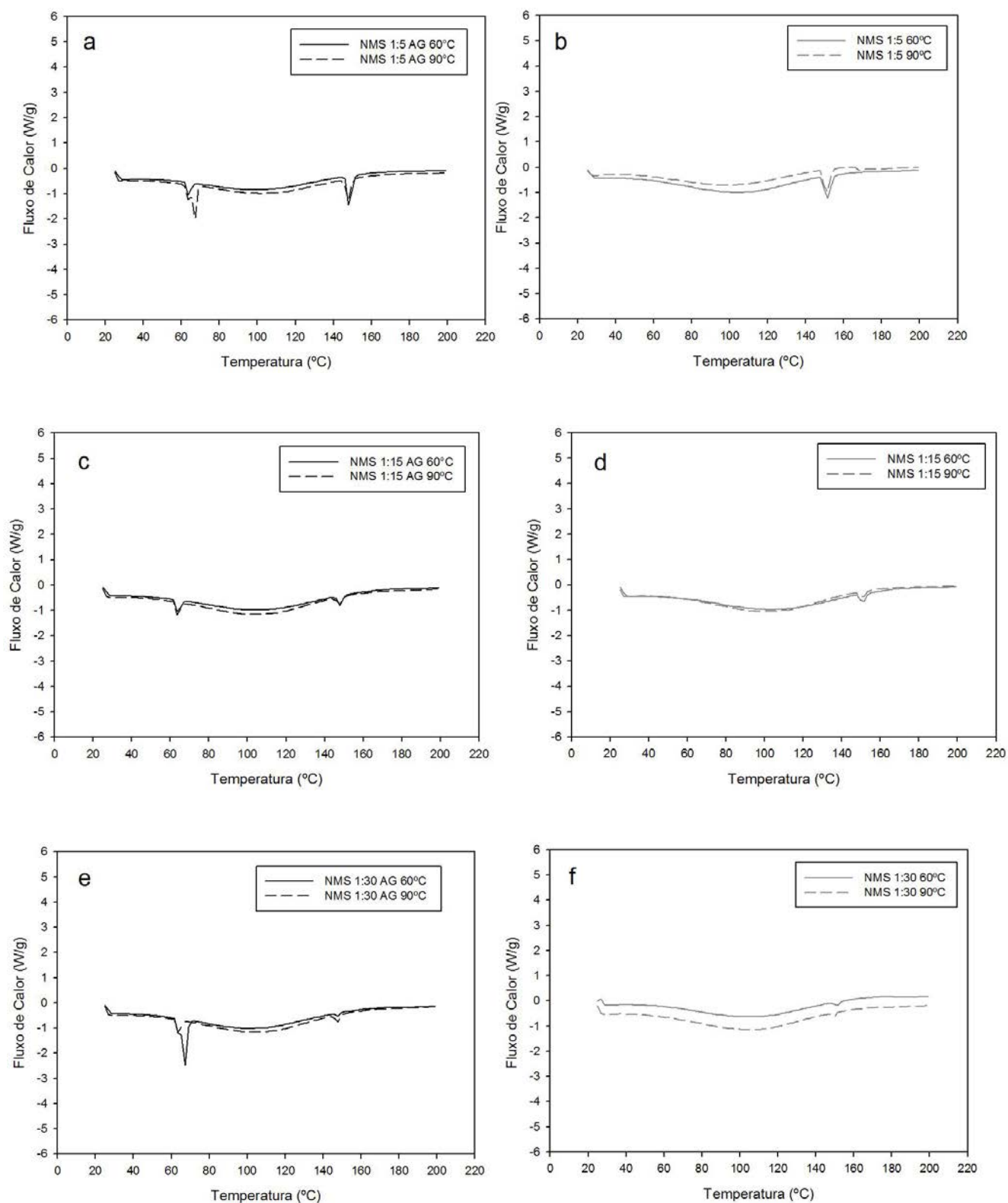
As amostras submetidas ao tratamento hidrotérmico a 60°C (AA 60° e AA:AG 60°C) apresentaram um comportamento semelhante em relação ao evento endotérmico da alta amilose, o qual foi deslocado para temperaturas mais elevadas entre 60-160°C (Tabela 12), demonstrando a organização da estrutura do material e indicando que essa temperatura não provocou a gelatinização do amido. No entanto, esse comportamento foi distinto para a amostra AA 90°C a qual exibindo o evento endotermico da alta amilose deslocado para uma temperatura menor, com o pico de fusão em 92,47°C (Tabela 12), indicando uma desorganização estrutural causada pelo processo de gelatinização do amido, que promove o intumescimento irreversível e perda da organização estrutural (SINGH et al., 2003 BELLO-PÉREZ et al., 2006; KIBAR et al., 2010).

No caso da amostra AA:AG 90°C observou um comportamento semelhante das amostras preparadas a 60°C indicando uma interferência do AG no processo de gelatinização.

O tratamento hidrotérmico na temperatura de 60°C e a presença de AG, proporcionaram a elevação da temperatura de transição vítrea do polímero como exibido pelas amostras AA:AG 60°C, AA60°C e AA:AG 90°C (Figura 28 e Tabela 12), indicando maior cristalinidade e maior resistência dos grânulos de amido à gelatinização quando comparados com a amostra AA90°C (SINGH et al., 2003)..

As curvas de DSC dos complexos com NMS são apresentadas na Figura 29.

Figura 29: Curvas de DSC dos complexos com NMS



De acordo com os perfis apresentados na Figura 29, podemos observar que complexos preparados com NMS apresentam eventos endotérmicos relacionados à

fusão do AG, alta amilose e da NMS, no entanto ocorre um deslocamento de temperatura e redução de entalpia nesses eventos (Tabelas 11-13), indicando interação dos materiais possivelmente causada pelo processo de complexação.

Para os complexos com NMS sem AG são observados dois eventos endotérmicos relacionados à alta amilose e a NMS e para os complexos com o AG três eventos endotérmicos relacionados ao AG, alta amilose e NMS.

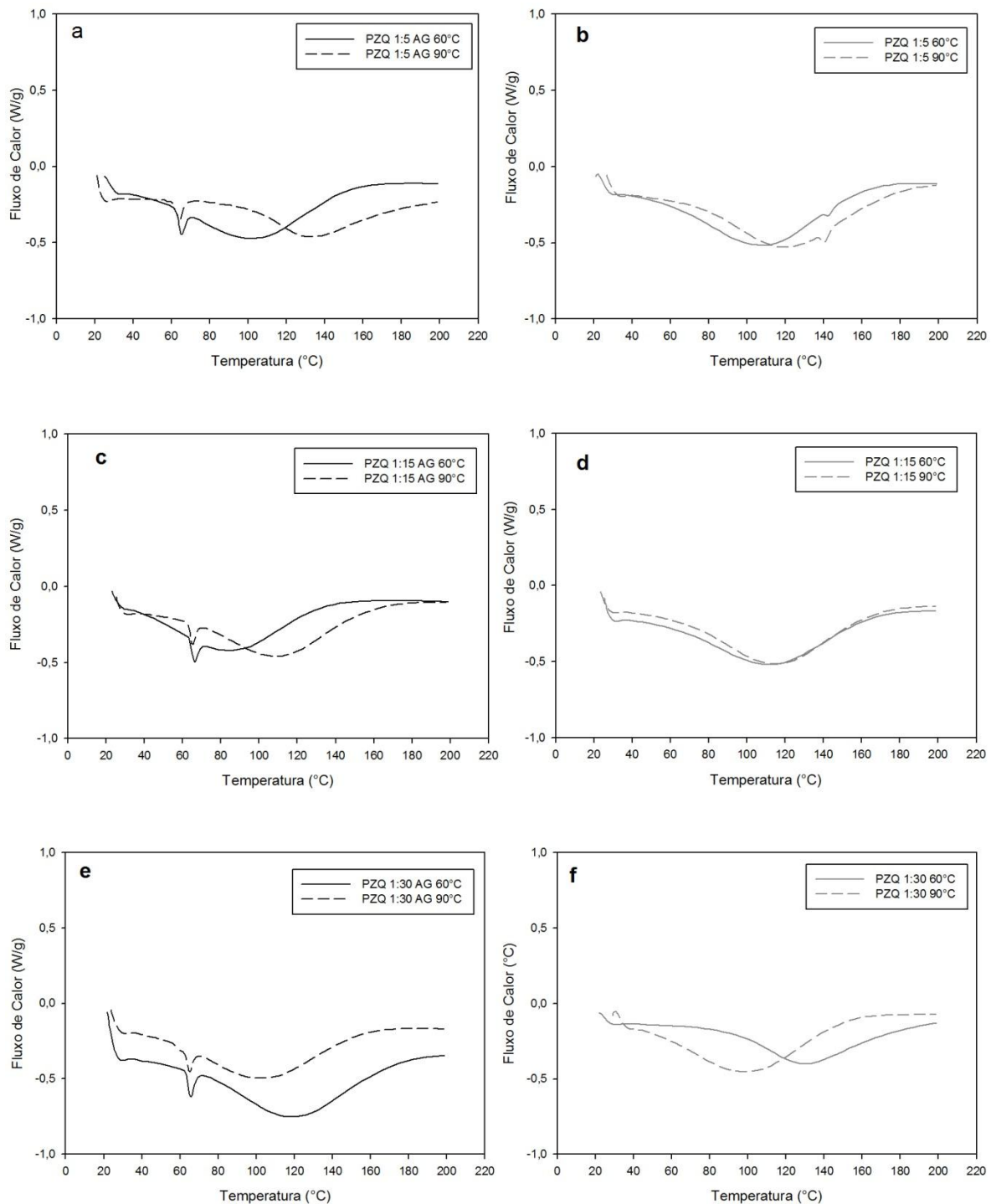
O primeiro evento endotérmico observado nas amostras com AG, em temperaturas em torno de 60°C (Tabela 11) está associado ao AG na forma não complexada; o segundo evento endotérmico em temperaturas entre 60-160°C (Tabela 12) é característico da alta amilose e o terceiro evento endotérmico (149,1°C) está relacionado à fusão da NMS na forma não complexada (Tabela 13).

A presença da forma não complexada da NMS e do AG sugere que ocorreu uma complexação parcial dos componentes nos complexos (AL-MARZOQUI et al., 2009).

O deslocamento do ponto de fusão referente à NMS não complexada (149,17°C, Figura 26 e Tabela 13) foi observado para todas as amostras analisadas. No entanto, esse deslocamento foi mais pronunciado para os complexos preparados com AG (Figura 29a, 29c e 29e) em que o ponto de fusão da NMS foi deslocado para temperaturas de aproximadamente 145,5°C, indicando que o AG favoreceu a interação do fármaco com o polímero possivelmente favorecendo o processo de complexação (Tabela 13).

A significativa redução do pico endotérmico entre 145-150°C, relacionados ao evento endotérmico de fusão da NMS, indica uma complexação parcial da NMS na cavidade hidrofóbica da alta amilose (AL-MARZOQUI et al. 2007; AL-MARZOQUI et al. 2009; TAKAHASHI, 2009).

Nas curvas de DSC dos complexos preparados com PZQ (Figura 30) nota-se a ausência do pico de fusão do fármaco, evidenciando a sua complexação com o polímero (AIGNER et al., 2012).

Figura 30: Curvas de DSC dos Complexos com PZQ

As curvas de DSC dos complexos com PZQ apresentam apenas 2 eventos endotérmicos quando os complexos contém AG, sendo que o evento endotérmico em torno de 60°C é relacionado com a fusão do AG que está na forma não complexada e o segundo evento endotérmico entre 60°C e 160°C é relacionado a alta amilose.

Para as amostras PZQ 1:5 com AG (Figura 30a) com o aumento da temperatura de 60°C para 90°C houve um deslocamento de eventos endotérmicos, o que sugere que

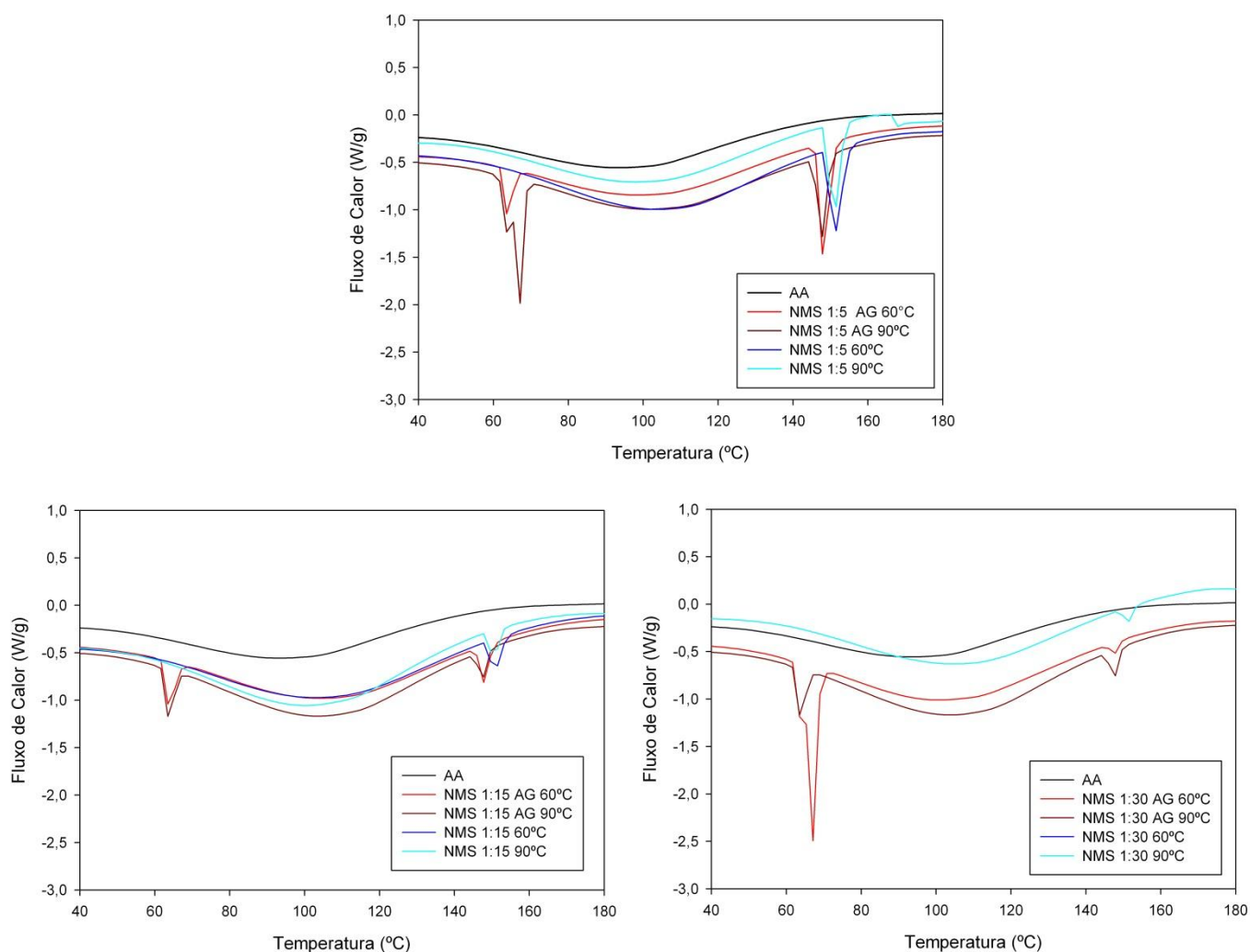
nessa proporção, a presença de AG associado com uma temperatura mais elevada favorece a formação dos complexos. Esse comportamento está de acordo com o teste de teor de fármaco complexado (Figura 24), em que a amostra PZQ1:5AG 90°C apresentou 65,13% de fármaco complexado.

Um pico endotérmico reduzido relacionado com a fusão do PZQ (aproximadamente em 140°C) foi observado apenas nas amostras PZQ 1:5 90°C e PZQ 1:5 60°C (Figura 30b) sugerindo que nessas condições há uma fração de PZQ na forma não complexada. Essas amostras também demonstraram baixo teor de fármaco complexado (Figura 24- PZQ 1:5 90°C, 23,56% e PZQ 1:5 60°C, 26,44%).

Considerando que o segundo evento endotérmico o qual foi observado para os complexos com NMS e PZQ na faixa de 60 até 160°C, apresentaram uma variação endotérmica significativa em relação à alta amilose, foram obtidas novas curvas de DSC na faixa de 40-180°C visando melhor detalhamento desse evento (Figuras 31 e 32).

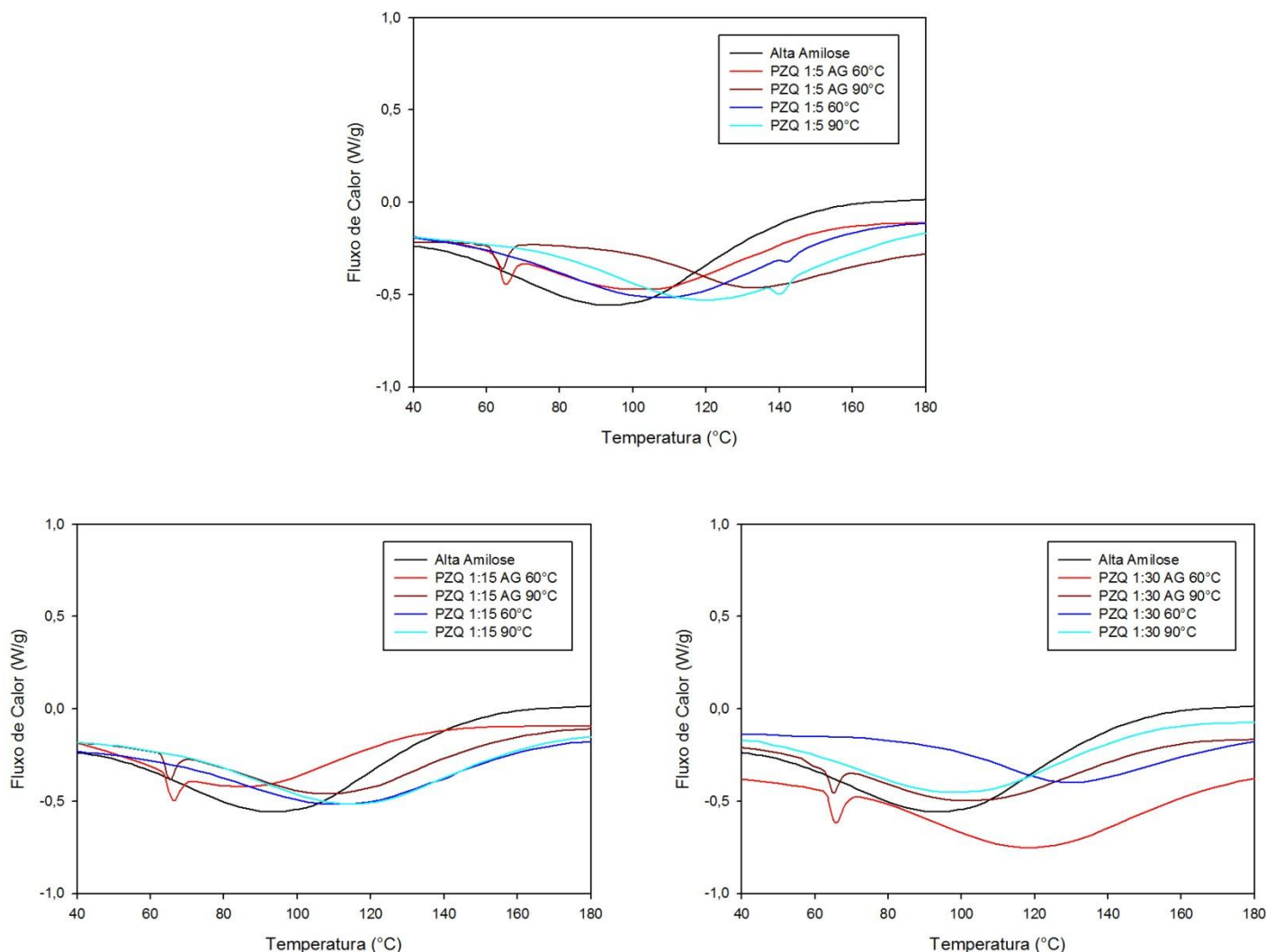
O deslocamento do evento endotérmico da alta amilose para temperatura acima de 100°C, observado para ambos os fármacos, indica a formação de complexos tipo II (Figuras 31 e 32), os quais devem apresentar uma maior resistência enzimática dos complexos, ferramenta importante para controlar a liberação desses fármacos ao longo do TGI (KARKALAS et al., 1995; FANTA et al., 2002; BHOSALE, ZIEGLER, 2010).

Figura 31: Curvas de DSC dos complexos com NMS em faixa de temperatura 40-180 °C



Para os complexos com NMS, esse deslocamento do evento endotérmico de 60-160°C foi mais pronunciado para a proporção 1:30 e esse deslocamento para temperaturas mais elevadas sugere maiores quantidade de zonas cristalinas o que pode também contribuir para maior resistência enzimática (FANTA et al., 2002; BHOSALE, ZIEGLER 2010).

Figura 32: Curvas de DSC dos complexos com PZQ em faixa de temperatura 40-180 °C



As amostras PZQ 1:5AG90°C, PZQ 1:30AG60°C e PZQ1:3060°C apresentaram valores de deslocamento do evento endotérmico de fusão da alta amilose mais evidente (PZQ 1:5 AG 90°C, 134,26°C, PZQ 1:30 AG 60°C, 119,23 e PZQ 1:30 60°C,130,27°C) que os demais complexos preparados com PZQ (Tabela 12). Esse deslocamento esta relacionado com a maior cristalinidade desses complexos o que possivelmente irá conferir uma maior resistência enzimática. Assim como para os complexos com NMS, esses complexos com PZQ também apresentaram maiores quantidades de fármaco complexado (Figura 24), demonstrando que essas foram as melhores condições para formação de complexos com PZQ.

Na Tabela 11 são apresentadas as temperaturas de fusão (T) referentes do AG das amostras bem como os valores de entalpias teóricas e obtidas experimentalmente.

Tabela 11: Temperatura de fusão e valores de entalpias-Primeiro evento endotérmico

Amostras	Curva de aquecimento		
	1º evento endotérmico		
	T _{AG} (°C)	ΔH _{AG} (J/g) Teórica	ΔH _{AG} (J/g) Experimental
AG	62,41	298,21	298,21
AA:AG 60°C	64,24	11,65	7,96
AA:AG 90°C	63,73	12,70	7,03
NMS MF 1:5 AG	64,83	14,69	2,88
NMS 1:5AG60°C	63,55	15,51	7,16
NMS 1:5AG90°C	66,74	15,13	24,09
NMS 1:15AG60°C	63,70	15,51	7,82
NMS 1:15AG90°C	63,69	15,40	8,22
NMS 1:30AG60°C	66,90	13,39	33,72
NMS 1:30AG90°C	63,87	14,80	8,75
PZQ MF 1:5 AG	64,32	11,70	8,51
PZQ 1:5AG60°C	65,22	13,60	0,67
PZQ 1:5AG90°C	64,19	13,06	0,64
PZQ 1:15AG60°C	66,08	13,06	0,63
PZQ 1:15AG90°C	65,26	11,70	0,57
PZQ 1:30AG60°C	65,39	15,78	0,61
PZQ 1:30AG90°C	65,11	12,79	0,56

Onde: T_{AG} é a temperatura de fusão do ácido palmítico. ΔH_{AG} Teórico é a entalpia de fusão do ácido palmítico teórica e ΔH_{AG} experimental é o resultado da entalpia experimental.

A Tabela 11 demonstra as variações de entalpia para todas as amostras indicando uma interação dos materiais.

As informações apresentadas pelos valores de ΔH_{AG} das amostras NMS 1:5AG 90°C e NMS 1:30AG60°C (Figuras 30a e 30e, Tabela 11) contém informações referentes as entalpias que não possibilitam a separação de cada um dos processos (LUCAS, et al. 2001).

Na Tabela 12 são apresentadas as temperaturas de fusão (T) referentes a alta amilose das amostras bem como os valores de entalpias teóricas e obtidas experimentalmente.

O segundo evento endotérmico (60-120°C) foi observado para as misturas físicas (Figura 27) e para todos os complexos de inclusão (Figuras 29 e 30), sendo esse

evento atribuído ao amplo pico de fusão referente da alta amilose (KARKALAS et al., 1995; FANTA et al., 2002 WAGNER, 2005; BHOSALE, ZIEGLER. 2010).

Tabela 12: Temperatura de fusão e valores de entalpias-Segundo evento endotérmico

Amostras	Curva de aquecimento		
	2ºevento endotérmico		
	T_{AA} (°C)	ΔH_{AA} (J/g) Teórica	ΔH_{AA} (J/g) Experimental
Alta amilose	103,43	455,05	455,05
AA:AG 60°C	133,34	377,95	160,77
AA 60°C	132,61	469,51	210,32
AA:AG 90°C	130,96	411,54	189,68
AA 90°C	92,47	452,40	299,03
NMS MF 1:5 AG	101,14	396,21	115,75
NMS MF 1:5	91,83	337,51	220,14
NMS 1:5AG60°C	105,72	418,01	94,14
NMS 1:560°C	104,35	405,75	187,03
NMS 1:5AG90°C	105,68	407,95	93,30
NMS 1:590°C	100,07	365,39	161,95
NMS 1:15AG60°C	107,34	471,51	240,41
NMS 1:1560°C	106,03	457,69	258,34
NMS 1:15AG90°C	105,32	468,20	272,81
NMS 1:1590°C	102,69	421,54	273,61
NMS 1:30AG60°C	108,70	419,77	133,44
NMS 1:3060°C	108,41	437,93	236,86
NMS 1:30AG90°C	109,18	463,87	241,26
NMS 1:3090°C	108,34	425,12	271,68
PZQ MF 1:5 AG	96,01	314,83	60,26
PZQ MF 1:5	91,83	322,84	185,96
PZQ 1:5AG60°C	104,49	366,86	24,63
PZQ 1:560°C	108,64	403,55	26,11
PZQ 1:5AG90°C	134,26	352,19	13,14
PZQ 1:590°C	120,61	410,96	27,45
PZQ 1:15AG 60°C	66,55	396,84	27,19
PZQ 1:1560°C	112,72	396,84	27,31
PZQ 1:15AG90°C	109,14	355,69	28,21
PZQ 1:1590°C	114,93	396,84	29,70
PZQ 1:30AG60°C	119,23	495,12	27,62
PZQ 1:3060°C	130,27	378,54	21,43
PZQ 1:30AG90°C	102,06	401,22	26,28
PZQ 1:3090°C	102,00	435,37	24,13

Onde: T_{AA} é a temperatura de fusão da alta amilose. ΔH_{AA} Teórica é a entalpia de fusão da alta amilose teórica ΔH_{AA} experimental é o resultado da entalpia experimental

No segundo evento endotérmico (Tabela 12) as maiores variações entre os valores das entalpias obtidas em relação aos valores das entalpias teóricas foram para os complexos com PZQ, principalmente para a amostra PZQ 1:5AG90°C e PZQ 1:30AG60°C sugerindo maior interação fármaco-polímero.

Essa interação ocorre durante o processo de inclusão inter ou intra-hélices, onde as moléculas de água que estão incluídas dentro da hélice são deslocadas para o meio, resultando em um rearranjo e hidratação da parte externa da hélice, enquanto a molécula hóspede perde algumas moléculas de água ao entrar na hélice e essas interações entre amilose e molécula hóspede resultam em uma diminuição de energia (CASTRONUOVO, et al.,1997).

Na Tabela 13 são apresentadas as temperaturas de fusão (T) referentes a NMS das amostras bem como os valores de entalpias teóricas e obtidas experimentalmente.

O terceiro evento endotérmico é observado para as misturas físicas (Figura 27), para os complexos de inclusão preparados com NMS (Figura 29) e apenas para os complexos PZQ 1:560°C e PZQ 1:590°C (Figura 30), sendo esse evento atribuído ao pico de fusão dos fármacos.

Tabela 13: Temperatura de fusão e valores de entalpias-Terceiro evento endotérmico

Amostras	Curva de aquecimento		
	3º evento endotérmico		
	T_F (°C)	ΔH_F (J/g) Teórica	ΔH_F (J/g) Experimental
NMS	149,17	138,07	138,07
NMS MF 1:5 AG	150,15	24,27	16,89
NMS MF 1:5	152,48	20,67	18,54
NMS 1:5AG60°C	147,75	25,62	22,14
NMS 1:560°C	150,58	24,85	20,13
NMS 1:5AG90°C	147,25	24,99	15,09
NMS 1:590°C	150,47	22,38	18,89
NMS 1:15AG60°C	147,51	9,64	6,95
NMS 1:1560°C	150,37	9,36	6,55
NMS 1:15AG90°C	146,83	9,58	4,86
NMS 1:1590°C	150,23	8,63	4,60
NMS 1:30AG60°C	146,90	4,27	2,01
NMS 1:3060°C	150,62	4,50	2,69
NMS 1:30AG90°C	146,89	4,75	1,94
NMS 1:3090°C	149,56	4,35	1,75
PZQ	140,21	90,83	90,83
PZQ MF 1:5 AG	140,75	16,13	13,85
PZQ MF 1:5	143,31	16,50	17,32
PZQ 1:5AG60°C	-----	18,75	-----
PZQ 1:560°C	142,95	20,63	0,1347
PZQ 1:5AG90°C	-----	18,00	-----
PZQ 1:590°C	141,11	21,00	0,2534
PZQ 1:15AG60°C	-----	6,78	-----
PZQ 1:1560°C	-----	6,78	-----
PZQ 1:15AG90°C	-----	6,07	-----
PZQ 1:1590°C	-----	6,78	-----
PZQ 1:30AG60°C	-----	4,23	-----
PZQ 1:3060°C	-----	3,06	-----
PZQ 1:30AG90°C	-----	3,43	-----
PZQ 1:3090°C	-----	3,72	-----

Onde: T_F é a temperatura de fusão dos fármacos (NMS e PZQ). ΔH_F Teórica é a entalpia de fusão dos fármacos teórica e ΔH_F Experimental é o resultado da entalpia experimental

Todos os complexos preparados com NMS apresentaram uma fração cristalina que pode ser relacionada com o AG e a NMS que estão em sua forma não complexada (KONG, HAY; 2003), indicando a complexação parcial da NMS. Para os complexos preparados com PZQ a ausência do pico endotérmico relacionado à fusão desse fármaco indica uma total complexação (AIGNER et al.; 2012).

Com base nos valores de entalpia (Tabela 13) foi calculado a percentagem de NMS complexado (Tabela 14), levando em consideração a proporção de NMS de cada amostra, utilizando a equação 6.

Tabela 14: Valores percentuais de NMS complexada através dos valores de entalpia

Amostras	NMS não complexada (%)	NMS complexada (%)
NMS 1:5AG60°C	96,30	3,70
NMS 1:5AG90°C	65,00	35,00
NMS 1:560°C	86,35	13,65
NMS 1:590°C	80,87	19,13
NMS 1:15AG60°C	75,08	24,92
NMS 1:15AG90°C	55,50	44,50
NMS 1:1560°C	71,72	28,28
NMS 1:1590°C	52,03	47,97
NMS 1:30AG60°C	41,76	58,24
NMS 1:30AG90°C	42,66	57,34
NMS 1:3060°C	58,60	41,40
NMS 1:3090°C	38,62	61,38

Os resultados exibidos na Tabela 14 associados aos resultados do teste de teor de fármaco complexado (Figura 22) permitem concluir que os complexos preparados na proporção 1:30 em temperatura de 60°C apresentam os maiores valores de NMS complexada.

5.6 Difração de Raios X (DRX)

A difratometria de raios X tem sido muito utilizada na caracterização de estruturas, já que o princípio da difração depende do fenômeno de interferência que ocorre quando uma onda em movimento é espalhada a partir de um número de centros

e, esses centros têm relação direta com os domínios cristalinos e amorfos presentes na estrutura (BILLMEYER Jr, 1984).

Considerando uma estrutura cristalina com dois ou mais planos, as condições para que ocorra a difração de raios X dependeram da diferença de caminho percorrido pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição se baseia nos princípios de Bragg (Equação 8), nos quais um cristal é apresentado como um conjunto de planos refletoras, com espaçamento uniforme, de onde os raios X incidentes num ângulo teta (θ) são refletidos num mesmo ângulo (CULLITY, 1956; BILLMEYER Jr, 1984; CALLISTER Jr, 2008).

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

Equação 8

Onde: n=número inteiro; d=distância entre os planos cristalinos; λ =comprimento de onda da radiação utilizada.

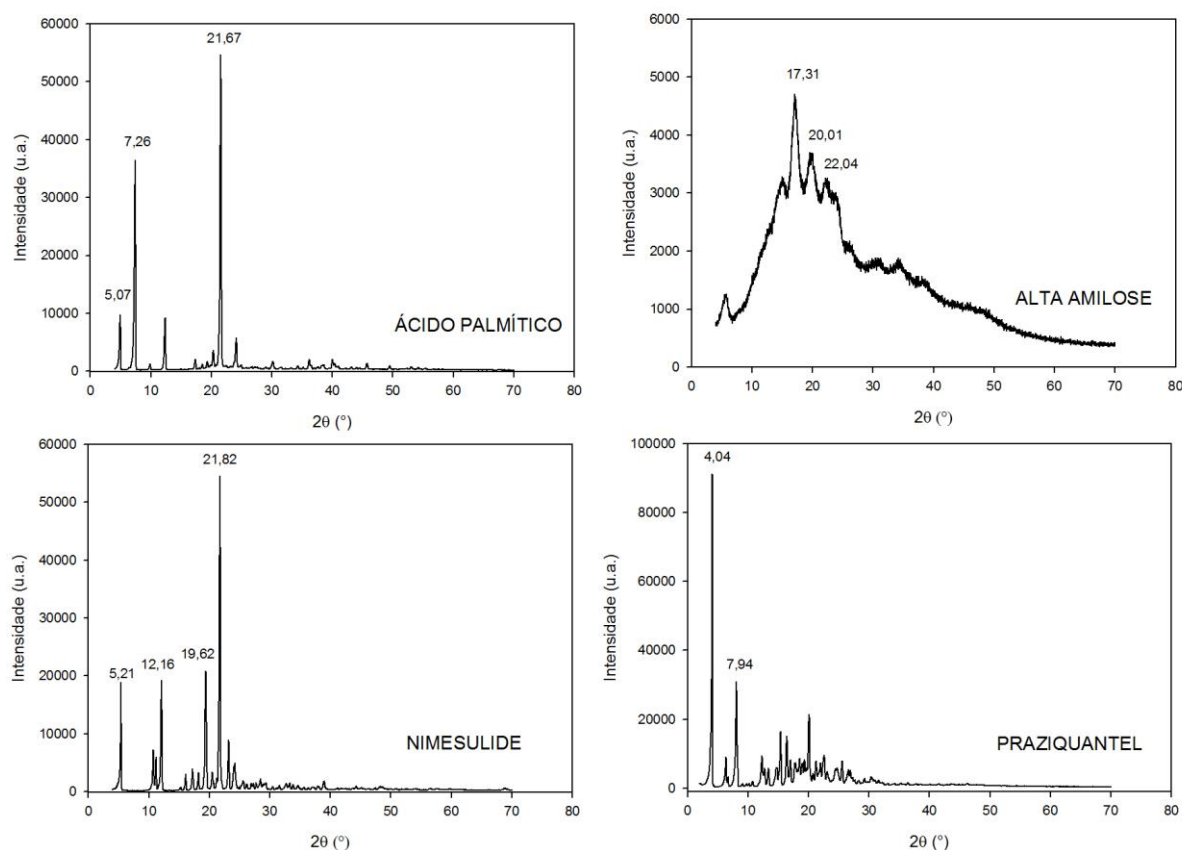
Desta maneira, o estudo da estrutura interna de um material cristalino depende da radiação penetrante nesse material e dos efeitos de interferência resultantes do espalhamento provocado pela sua estrutura. Os raios X têm poder de penetração e mostram os efeitos de interferência desde que eles tenham comprimento de onda da mesma ordem de magnitude do espaçamento entre os planos do cristal (BILLMEYER Jr, 1984).

Os compostos sólidos são considerados cristalinos, amorfos ou com domínios cristalinos e amorfos (semicristalinos) e difratam facilmente a radiação X. Em difratogramas originados por polímeros é possível observar um acentuado halo amorfo e também regiões bem definidas que correspondem aos domínios cristalinos, ou seja, às regiões ordenadas da estrutura (CANEVAROLO Jr, 2004).

Desta forma, é possível observar duas formas polimórficas nos complexos formados por amilose-ácido graxo. A forma do tipo I é considerada de natureza amorfa enquanto a tipo II é semicristalina (LALUSH et al., 2005). O processo realizado em baixa temperatura favorece a formação do complexo tipo I, enquanto a forma II é favorecida em elevadas temperaturas (GODET et al., 1995; LALUSH et al., 2005)

Os padrões da difração de Raios-X dos componentes isolados, das misturas físicas (NMS MF 1:15, NMS MF1:15AG, PZQ MF 1:15 e PZQ MF 1:15AG) e dos complexos são ilustrados nas Figuras 33-36.

Figura 33: Difratogramas dos materiais isolados



O AG apresenta dois picos intensos em 7,26° e 21,65°(2θ), enquanto a NMS exibe picos característicos em 5,21°, 12,16°, 19,62° e 21,82°(2θ) (SINGH et al., 2001).

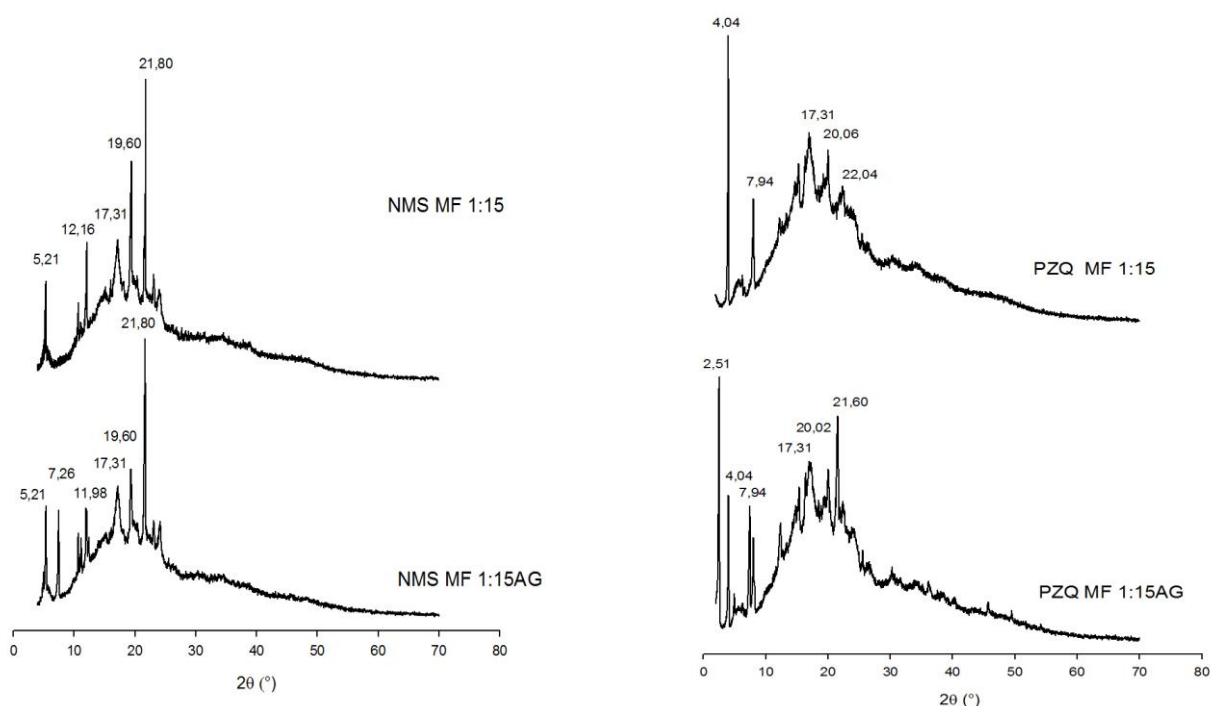
Para a alta amilose, o pico mais evidente está em aproximadamente 17° (2θ) e picos menores são encontrados em aproximadamente 20°, 22° e 23° (2θ), além de um pico em aproximadamente 5° (2θ) que é característico de estruturas tipo B (CHEETHAM, TAO, 1998; WEY et al., 2010).

O PZQ um sólido cristalino comercialmente é encontrado na forma de uma mistura racêmica composta pelos isômeros (-)PZQ e (+)PZQ. Apenas a forma enantiomérica (-)PZQ apresenta atividade esquistosomicida. (CIOLI, 1998; FENWICK et al., 2003; GREENBERG, 2005).

Como demonstrado nos padrões de DRX (Figura 33), o PZQ apresenta características de material cristalino com picos intensos e finos em aproximadamente 4,04°, 6,22° e 7,94°(2θ), além de vários picos entre 10° e 25°(2θ), sugerindo que o PZQ utilizado para o desenvolvimento desse trabalho está na forma racêmica (LIU et al., 2004; PASSERINI et al., 2006; CHENG et al., 2010).

Os difratogramas das misturas físicas são exibidos na Figura 34.

Figura 34: Difratograma das misturas físicas



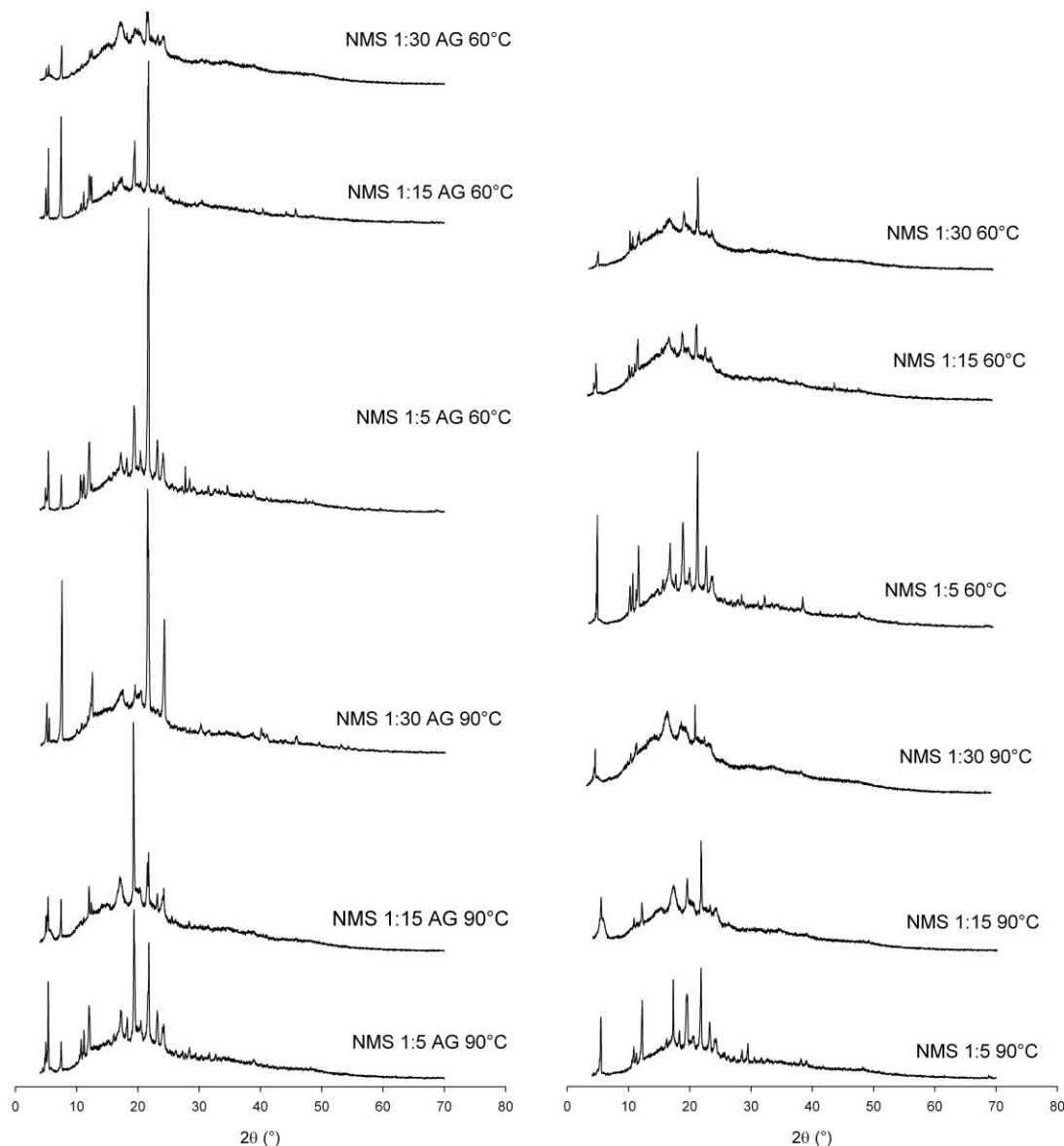
Nas misturas físicas é possível observar alguns picos correspondentes aos materiais isolados (Figura 34).

Nas misturas físicas com PZQ foram observados picos do PZQ não complexado (Figura 33) em $4,04^\circ$ e $7,94^\circ(2\theta)$, no entanto, o pico mais evidente na alta amilose em $17^\circ(2\theta)$ é observado com menor intensidade nas misturas físicas das amostras com os diferentes fármacos, os quais podem estar relacionados a uma pequena interação dos materiais o que confirma os resultados de DSC (Figura 27).

Picos em aproximadamente $21^\circ(2\theta)$ podem ser atribuídos à estrutura V da amilose, no entanto, para as misturas físicas com NMS esse pico é mais intenso, sendo atribuído também a NMS não complexada que apresenta no difratograma (Figura 33) pico mais evidente em $21,8^\circ(2\theta)$.

Picos atribuídos ao AG também foram observados na amostra NMS MF 1:15 AG em $7,26^\circ(2\theta)$.

Os difratogramas dos complexos preparados com NMS são exibidos na Figura 35.

Figura 35: Difratogramas dos complexos com NMS

Através de uma análise comparativa dos difratogramas dos complexos com NMS (Figura 35) e os componentes isolados e misturas físicas, podemos observar mudanças nas intensidades relativas, indicativas da formação de complexos (CAO et al., 2005).

Os picos correspondentes à NMS aparecem em $5,21^\circ$; $12,16^\circ$; $19,62^\circ$ e $21,82^\circ(2\theta)$ (Figura 33); enquanto nos complexos (Figura 35) esses picos aparecem deslocados e com intensidade reduzida.

Uma característica essencial do complexo de inclusão é a formação da amilose tipo V. A caracterização do empacotamento cristalino da amilose tipo V por difração de raios-X é uma prova da formação dos complexos de inclusão e é associada principalmente com a formação de complexos tipo II e possibilita concluir a

conformação helicoidal da amilose (LE BAIL et al., 2005; CONDE-PETIT et al., 2006, LAY et al, 2011)

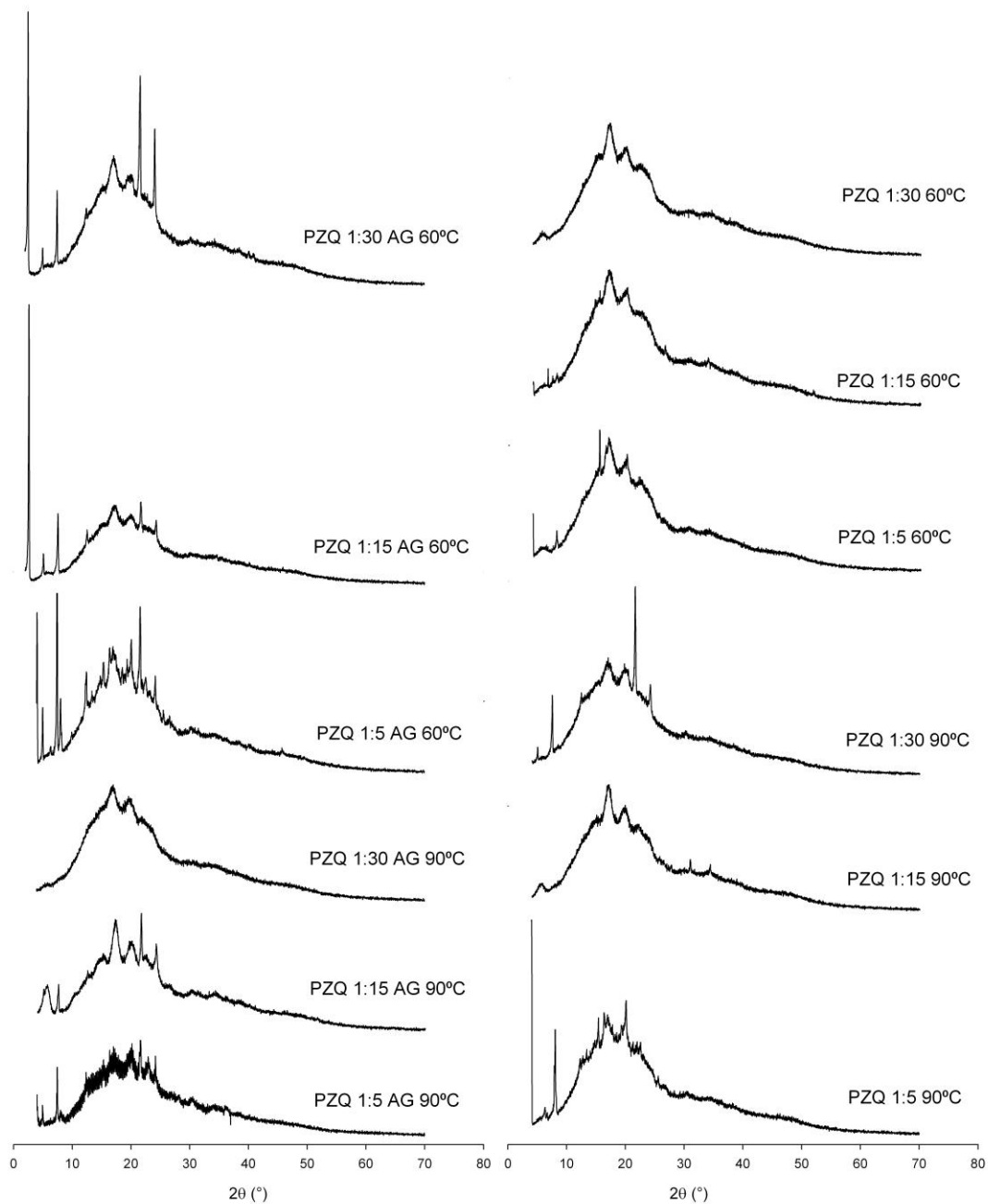
A presença de um pico em aproximadamente $20^\circ(2\theta)$ é característico da estrutura semi cristalina da amilose tipo V e foi observados nos complexos (Figura 35), sendo atribuído a formação de complexos de inclusão tipo II (CONDE-PETIT et al., 2006; SHOGREN et al., 2006; LESMES et al.2009; ZABAR et al., 2010).

Nos complexos (Figura 35) houve o deslocamento do pico em $5,21^\circ$ para aproximadamente $5,30^\circ$ e esse pico aparece mais intenso para as amostras na proporção 1:5, que pode ser atribuído ao empacotamento físico da NMS que não foi complexada, em concordância com os resultados de teor de fármaco complexado (Figura 22) que nessa proporção resultou nos menores percentuais de fármaco complexado (2,79-18,89%)

Nos complexos com NMS preparados com AG o pico em $7,26^\circ(2\theta)$ referente ao AG não complexado aparece deslocado para $7,48^\circ(2\theta)$ indicando que a presença do AG provocou uma mudança estrutural causada pela interação do fármaco/AG/polímero, em concordância com os dados de DSC (Figura 29 e Tabela 11).

O pico em $19,62^\circ$ correspondente a NMS não complexada (Figura 33) aparece com intensidade reduzida, principalmente para as amostras na proporção 1:30 com temperatura de 60°C indicando modificações estruturais causadas pelo processo de complexação da NMS, esse resultado associado aos resultados do teste de teor de fármaco complexado (Figura 22) e DSC (item 5.5) indicam que a proporção 1:30 em temperatura de 60°C permitiu maior complexação da NMS.

Os difratogramas dos complexos preparados com PZQ são exibidos na Figura 36.

Figura 36: Difratogramas dos complexos com PZQ

Através da análise comparativa dos difratogramas dos complexos com PZQ (Figura 36) com os componentes isolados e misturas físicas, podemos observar mudanças nas intensidades relativas, indicando a formação de complexos (CAO et al., 2005).

Os picos correspondentes ao PZQ não complexado aparecem em $4,04^\circ$; $6,22^\circ$; $7,94^\circ$ e picos entre 10° e 25° (Figura 33), nos complexos (Figura 36) esses picos aparecem deslocados, com intensidades reduzidas ou estão ausentes.

Todos os complexos com PZQ (Figura 36) não apresentam os picos em $6,22^\circ$ e $7,94^\circ$ (2θ) atribuídos ao PZQ não complexado, exceto nas amostras PZQ 1:590°C e PZQ 1:560°C, sugerindo que nessas condições há uma fração de PZQ na forma não complexada, o que está de acordo com os resultados de DSC (Figura 30b) e de teor de fármaco complexado (Figura 24- PZQ 1:590°C, 23,56% e PZQ 1:560°C, 26,44%).

Um pico em aproximadamente $20^\circ(2\theta)$ foi observado para os complexos com PZQ (Figura 36) semelhante aos complexos com NMS (Figura 35), que pode ser atribuído ao polimorfo V-amilose (ZABAR et al. 2010), indicativo da formação de complexos de inclusão do tipo II.

Nos difratogramas dos complexos com ambos os fármacos (Figuras 35 e 36) foi possível observar que todas as amostras apresentam-se como estrutura semicristalina, com picos em aproximadamente $20^\circ(2\theta)$ caracterizando a formação de complexos tipo II usualmente associados com a formação do complexo tipo V da amilose (LAY et al., 2011).

5.7 Análise Espectroscópica por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica capaz de caracterizar compostos orgânicos, pois permite detectar grupos funcionais. Quando se forma o complexo, pequenos deslocamentos das bandas poderão mascarar a do hóspede, caso esteja em pequena quantidade (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994).

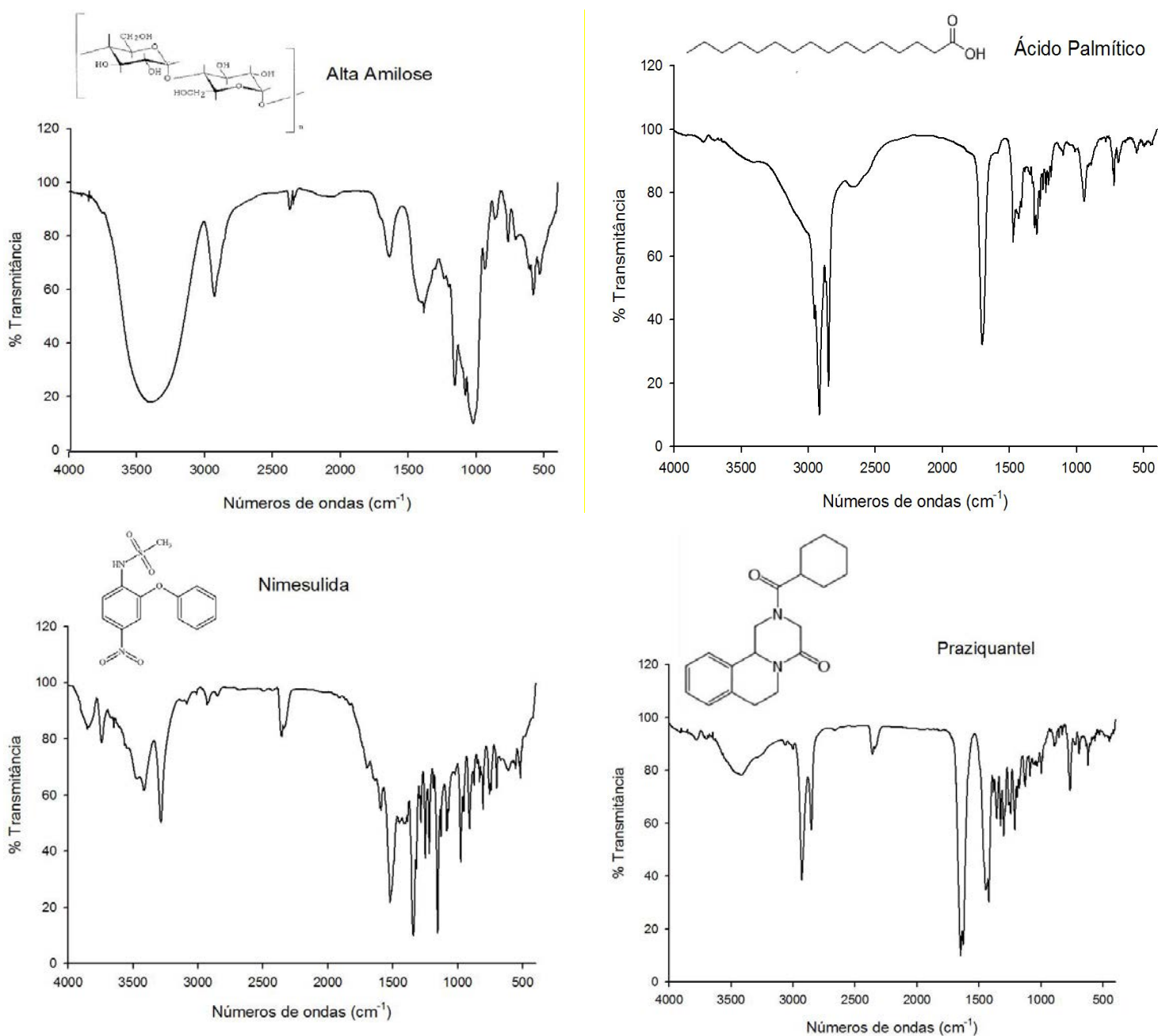
Os valores de absorção dos grupos funcionais são exibidos na Tabela 15.

Tabela 15: Valores de absorção dos grupos funcionais das amostras por FTIR

Frequência ($\bar{\nu}$ (cm⁻¹))	Grupo funcional
3650-3100	O-H deformação axial
3600-3070	N-H deformação axial
3100-3000	C-H deformação angular (anel aromático)
3000-2840	C-H deformação simétrica e assimétrica de carbono sp ³
1695-1650	C=O deformação axial
1600, 1588, 1500 e 1450	C=C deformação axial (anel aromático)
1560-1350	N=O deformação axial
1300-1000	C-O de ácido carboxílico, deformação axial
1275-1020	C-O de éteres, deformação axial
1280	C-N deformação axial
1158	O=S=O deformação axial
764	C-H deformação angular (anel aromático)

Os espectros de infravermelho das substâncias isoladas são mostrados na Figura 37.

Figura 37: Espectro na região do infravermelho dos materiais isolados



No espectro de infravermelho da alta amilose (Figura 37) foram observadas absorções em 3400 cm⁻¹ (banda larga), 2930 e 2850 cm⁻¹, 1020 cm⁻¹, referentes as deformações dos grupos O-H, C-H de carbonos sp³ e C-O, respectivamente (Tabela 15) (SILVERSTEIN et al., 2006; CURY et al., 2008).

No espectro de infravermelho do AG (Figura 37) foram observadas absorções em torno de 3300 cm⁻¹ referente à deformação axial da ligação O-H do ácido carboxílico, absorções em 2918 cm⁻¹ e 2850 cm⁻¹, referentes a C-H de carbono sp³ e que se sobrepõe a banda larga de O-H e em 1699 cm⁻¹ referente ao grupo C=O de ácido carboxílico. A absorção observada em 1455 cm⁻¹ pode ser atribuída à deformação axial

da ligação C-O-H e a absorção em 1302cm^{-1} é referente à deformação axial da ligação C-O (Tabela 14) (SILVESTEIN et al. 2006).

No espectro de infravermelho da NMS (Figura 37) foram observadas absorções em torno de 3100 cm^{-1} e 1593 cm^{-1} referente às ligações C-H as ligações C=C (esqueleto de anel aromático) (Tabela 15).

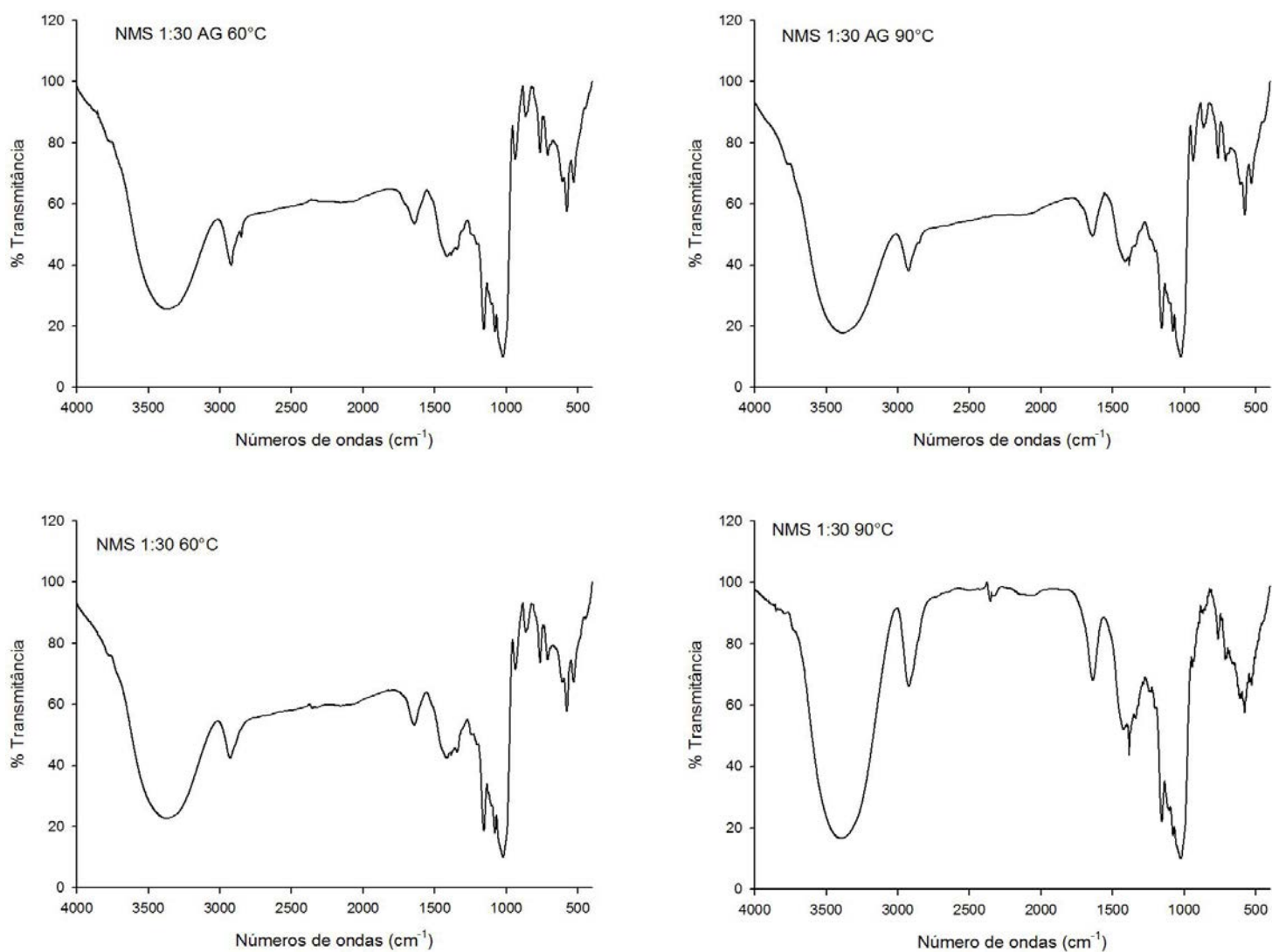
No espectro da NMS também foram observadas absorções em 1158 cm^{-1} , 1350 cm^{-1} e em 3400 cm^{-1} referentes às absorções dos grupos O=S=O, N=O e N-H (cuja banda aparece como um dublete), respectivamente (Tabela 15) (SINGH, et al. 2001; SILVESTEIN et al. 2006).

Para o PZQ (Figura 37) foram observadas absorções em 2930 e 2849 cm^{-1} que são referentes às ligações C-H de carbonos sp^3 (Tabela 15).

No espectro de infravermelho do PZQ também foi observada absorção em 1630 cm^{-1} referente às deformações axiais das ligações C=O. O valor mais baixo de absorção para este tipo de ligação ocorreu porque é uma banda de carbonila de amida e este deslocamento é devido ao efeito de ressonância que ocorre através da doação dos pares de elétrons não ligantes dos nitrogênios às carbonilas dando a elas um "caráter de ligação simples" e com isso, desloca a absorção da carbonila que deveria estar na faixa de $1695\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ (SILVESTEIN et al. 2006).

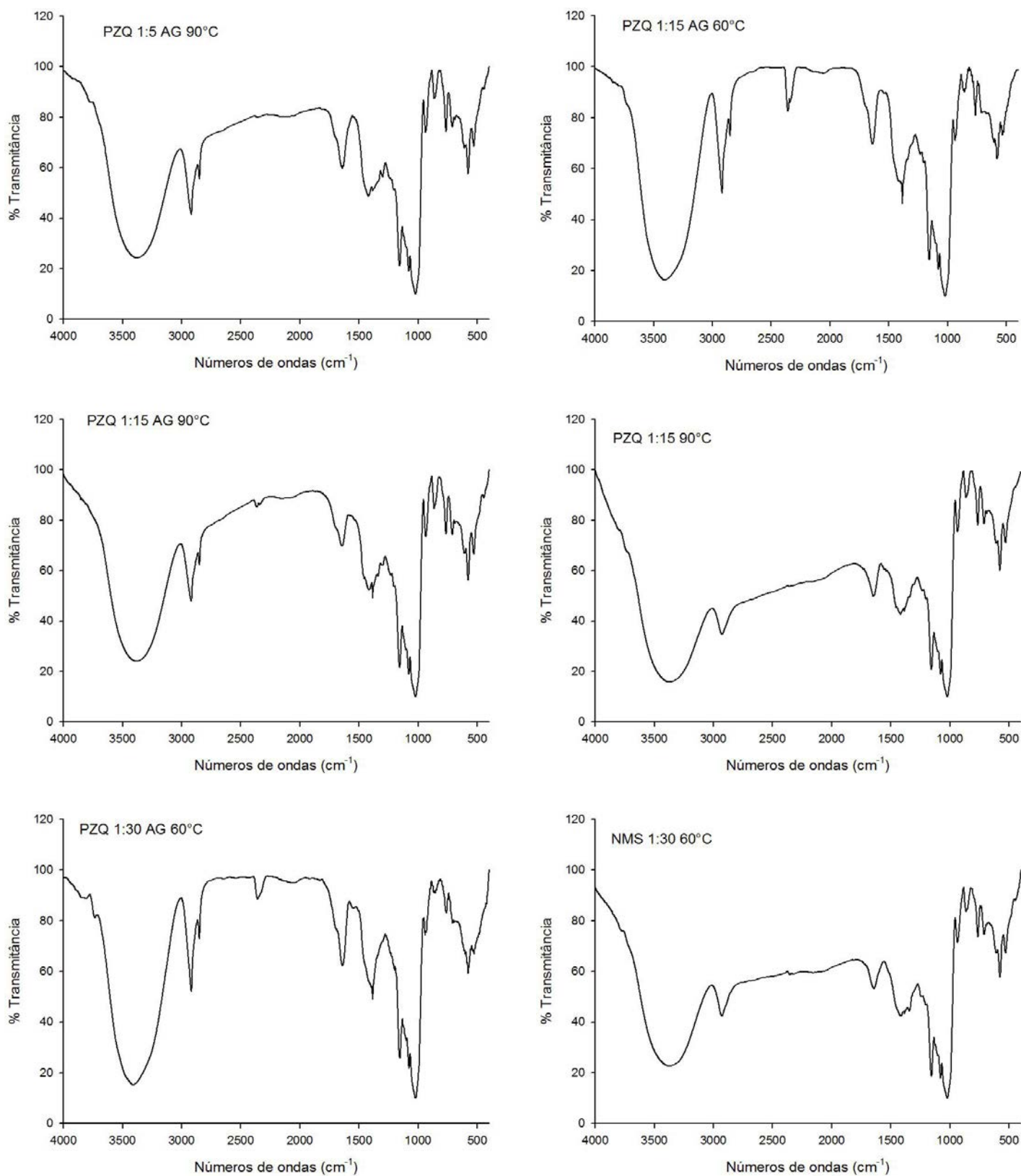
Outras absorções também foram observadas em 3000 cm^{-1} , na faixa de 1480 a 1430 cm^{-1} , em 1280 cm^{-1} e na região de menor frequência (764 cm^{-1}), as quais são absorções referentes aos grupos C-H de carbono sp^2 (do anel aromático), C=C (esqueleto de anel aromático) C-N e C-H, respectivamente (Tabela 15) (LIU et al., 2004; SILVESTEIN et al. 2006, PASSERINE et al., 2006).

Os espectros de absorção dos complexos com NMS e com PZQ são exibidos nas Figuras 38 e 39.

Figura 38: Espectro no Infravermelho dos complexos com NMS

Para os complexos com NMS (Figura 38), as bandas referentes aos grupos funcionais desta molécula hóspede ficaram encobertas e esses complexos exibiram as bandas referentes aos estiramentos O-H e a fragmentos de hidrocarboneto da cadeia polimérica da alta amilose (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994; CURY et al., 2008)

Figura 39: Espectro no Infravermelho dos complexos com PZQ



Nos complexos com PZQ (Figura 39), as bandas referentes aos grupos funcionais desta molécula hóspede também foram encobertas e exibiram as bandas referentes aos estiramentos de O-H e a fragmentos de hidrocarboneto da cadeia polimérica da alta amilose (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994; CURY et al., 2008)

As bandas vibracionais da amilose não apresentarem mudanças significativas após formação dos complexos, pois a encapsulação de moléculas na amilose se dá principalmente devido às forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Assim, não há formação de verdadeiras ligações químicas entre as moléculas hospede e polímero nestes complexos de inclusão, e alterações significativas não são observadas (SZEJTLI, 1998)

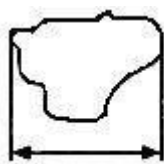
5.8 Tamanho e forma das partículas

Para medir tamanho de partículas esféricas utiliza-se unicamente o diâmetro. Na maioria dos casos, as partículas apresentam-se irregulares, por exemplo, no caso de partículas em forma de agulha, a aplicação do termo “diâmetro” é equivocada, pois não existe nenhum parâmetro isolado que possa ser avaliado, em relação à medida e classificação, de forma que outros parâmetros são necessários para realizar a determinação do tamanho das partículas (O’CONNOR, SCHWARTZ, 2000, CROWDER, 2003).

Quando uma partícula é circunscrita por um prisma retangular com comprimento, largura e altura, seu tamanho é expresso pelo diâmetro obtido a partir dessas três dimensões e são medidas através da microscopia por diâmetros estatísticos, entre eles estão os diâmetros de Feret e Martin (MASUDA et al., 2006)

Nesse trabalho, o parâmetro avaliado para a determinação do tamanho de partícula foi o diâmetro de Feret a 0° (Figura 40).

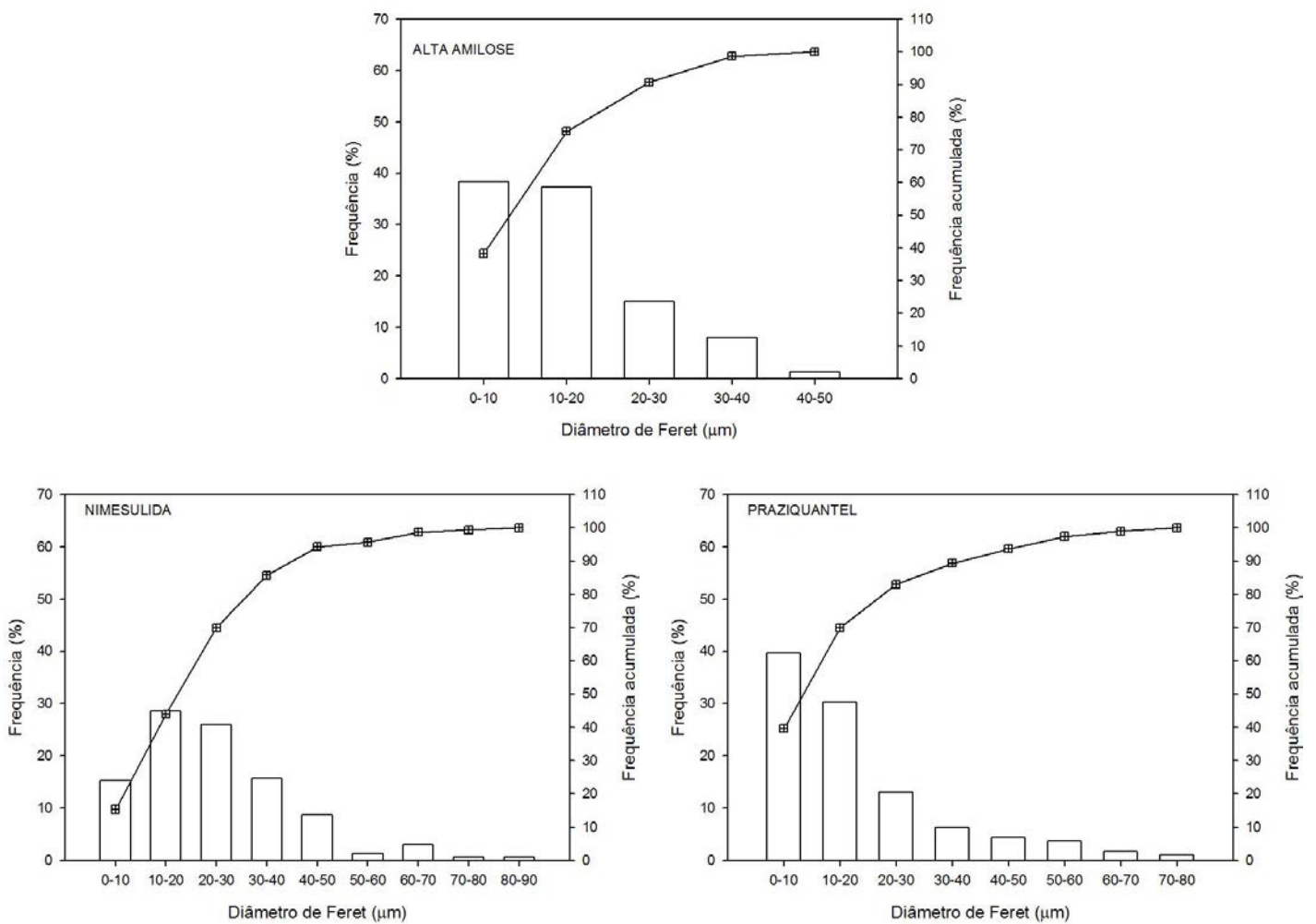
Figura 40: Diâmetro de Feret na direção horizontal (0°)



O diâmetro de Feret a 0° corresponde à distância horizontal entre duas linhas paralelas verticais, imaginárias e tangentes a uma partícula (BARBER, 1993; STANIFORTH, 2005).

Os perfis de distribuição granulométrica das amostras isoladas, complexos de inclusão com NMS e complexos de inclusão com PZQ, obtidos para populações de 300 partículas são apresentados nas Figuras 41-43.

Figura 41: Distribuição de tamanho de partícula - Amostras isoladas



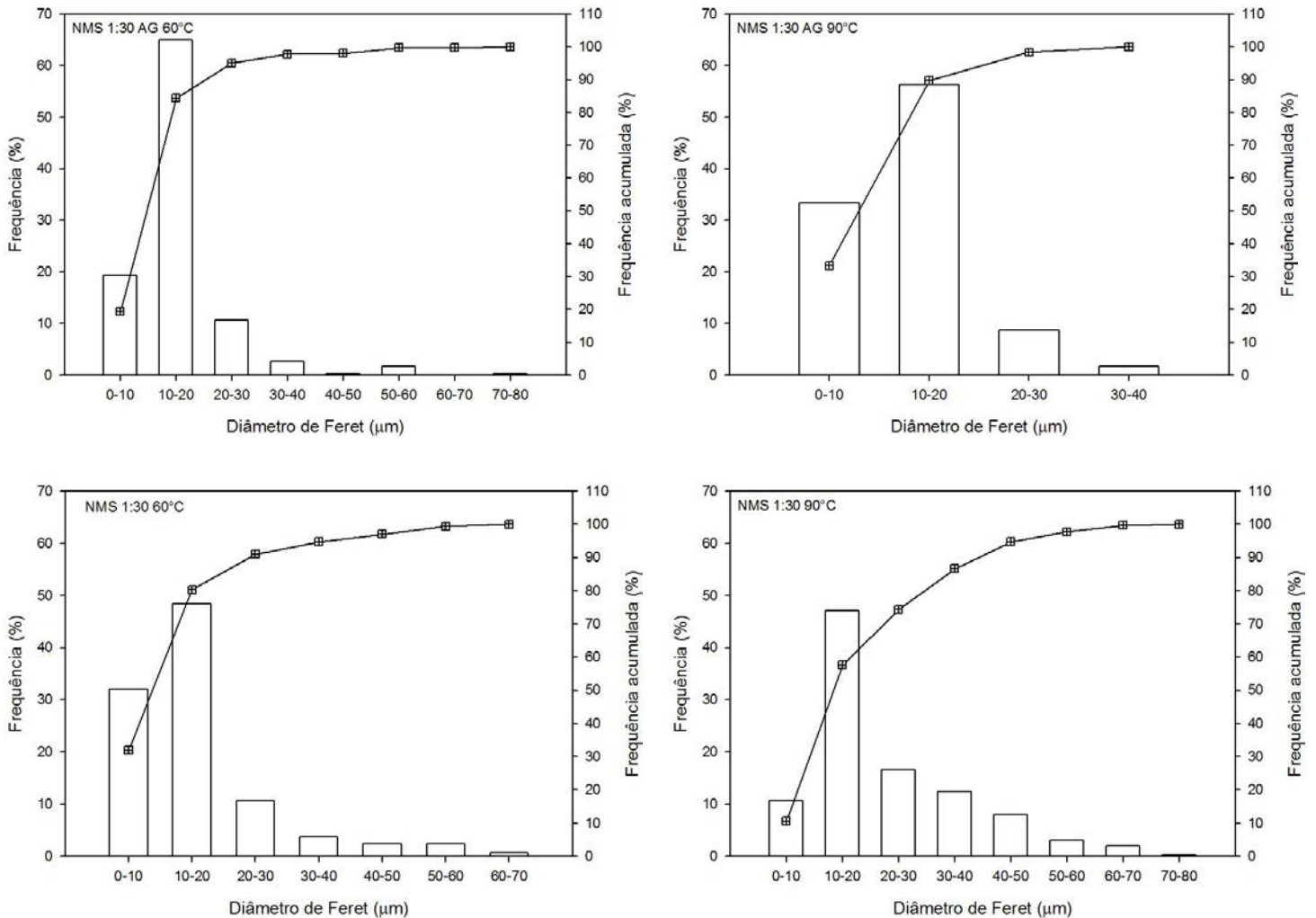
O tamanho dos grânulos de amidos isolados a partir de diferentes origens botânicas é relatado entre 1-110 µm. Entre os diferentes amidos, a alta amilose apresenta grânulo de tamanhos pequenos entre 0-10 µm (SINGH et al., 2007; SINGH et al., 2010).

O perfil de distribuição das partículas da alta amilose (Figura 41) demonstra que a faixa de distribuição compreende o tamanho de 0-50µm, no entanto a alta amilose apresenta maior frequência percentual de partículas pequenas na faixa de 0-20µm.

A distribuição do tamanho das partículas de NMS (Figura 41) compreende a faixa de 0-90 μm com maior percentual de frequência das partículas entre 10-30 μm .

O PZQ apresenta faixa de distribuição de partículas (Figura 41) entre 0-80 μm com maior percentual de frequência das partículas entre 0-20 μm .

Figura 42: Distribuição de tamanho de partícula - Complexos com NMS

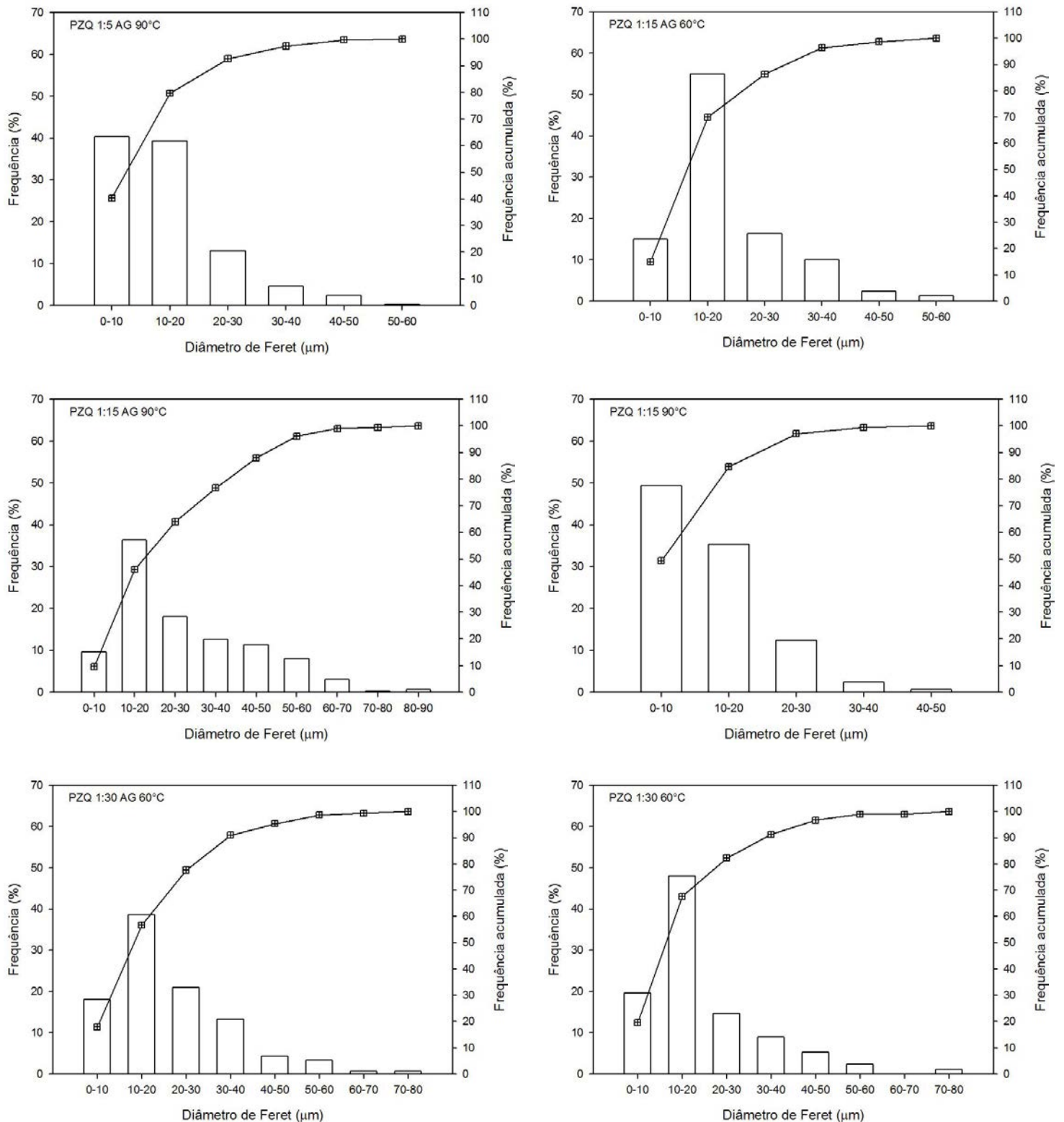


O tamanho das partículas dos complexos com NMS (Figura 42) exibe maior proporção de partículas de tamanho pequeno, semelhante ao tamanho das partículas da alta amilose e da NMS não complexada.

Analisando-se os perfis de distribuição exibidos na Figura 42, todos os complexos com NMS apresentaram perfis de distribuição semelhantes, com maior percentual de frequência na faixa de 10-20 μm , demonstrando que a variação de temperatura e a presença de AG não influenciaram no tamanho dos complexos formados.

A presença da NMS também não demonstrou exercer influência no tamanho das partículas dos complexos, devido à semelhança com a distribuição granulométrica das partículas de alta amilose, que também apresentaram maior frequência de partículas com tamanho entre 0-20 μ m (Figura 41). A semelhança nos tamanhos dos complexos com fármacos em relação às partículas de amilose também foi observado por Cohen e colaboradores (2008) em estudo com complexos de inclusão com genisteína.

Figura 43: Distribuição de tamanho de partícula - Complexos com PZQ



O tamanho das partículas dos complexos com PZQ (Figura 43) exibiu comportamento de distribuição semelhante aos complexos com NMS, com maior proporção de partículas na faixa de 10-20µm.

Esse comportamento foi observado também para os complexos com NMS, indicando que, fármacos diferentes, variações na proporção de fármaco: polímero, mudanças de temperatura, e a presença do AG não exercem influência no tamanho das partículas dos complexos.

O diâmetro circular equivalente pode ser descrito para determinar o tamanho das partículas (BARBER, 1993). Na Tabela 16, estão apresentados os dados do diâmetro circular médio das amostras isoladas e dos complexos.

Tabela 16: Diâmetro circular equivalente das amostras

AMOSTRAS	DIÂMETRO MÉDIO (μm)
Alta Amilose	14,855 \pm 9,558
NMS	25,023 \pm 14,933
PZQ	17,939 \pm 15,560
NMS1:30AG60°C	15,376 \pm 8,573
NMS 1:3060°C	15,805 \pm 10,937
NMS 1:30AG90°C	12,905 \pm 5,813
NMS 1:3090°C	22,759 \pm 13,961
PZQ 1:5AG90°	14,336 \pm 9,035
PZQ 1:15AG60°C	18,047 \pm 9,995
PZQ 1:15AG90°C	26,771 \pm 16,939
PZQ 1:1590°	12,456 \pm 7,657
PZQ 1:30AG60°C	21,238 \pm 13,381
PZQ 1:3060°C	18,924 \pm 13,079

De acordo com a Tabela 16, os tamanhos das partículas dos complexos apresentaram uma variação entre 12,456 e 26,771 μm e de maneira geral os complexos apresentaram pequenos tamanhos de partículas e tamanhos semelhantes ao das partículas de alta amilose (COHEN et al., 2008).

Esses resultados também estão em concordância com os obtidos pelo diâmetro de Feret.

O reduzido tamanho das partículas dos complexos pode proporcionar maior concentração dos fármacos no local de ação, visto que esse tamanho reduzido aumenta a

área de superfície e o contato do complexo no epitélio intestinal possibilitando maior concentração de fármaco nesse órgão (SAJEESH, SHARMA, 2006).

Em relação à morfologia, deve-se considerar que ela é caracterizada pela descrição qualitativa de sua aparência visual como acicular, esférica, angular e irregular ou, quantitativamente, por meio do cálculo de diferentes fatores de forma (MIKLI et al., 2001).

O fator de forma analisado nesse trabalho foi a circularidade, em que valores mais próximos a 1 indicam que a amostra aproxima-se mais da forma esférica e, conseqüentemente, quanto mais o valor se afastar de 1, mais irregular deverá ser a forma da partícula (STANIFORTH, 2005). Os valores de circularidade estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Circularidade das amostras

AMOSTRAS	CIRCULARIDADE
Alta Amilose	0,688 ± 0,093
NMS	0,689 ± 0,102
PZQ	0,566 ± 0,170
NMS1:30AG60°C	0,741 ± 0,109
NMS 1:3060°C	0,737 ± 0,170
NMS 1:30AG90°C	0,638 ± 0,118
NMS 1:3090°C	0,687 ± 0,114
PZQ 1:5AG90°	0,623 ± 0,141
PZQ 1:15AG60°C	0,655 ± 0,124
PZQ 1:15AG90°C	0,623 ± 0,127
PZQ 1:1590°	0,647 ± 0,116
PZQ 1:30AG60°C	0,609 ± 0,149
PZQ 1:3060°C	0,640 ± 0,133

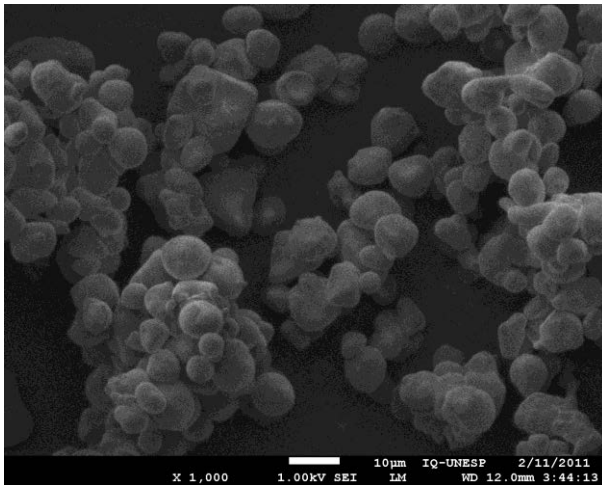
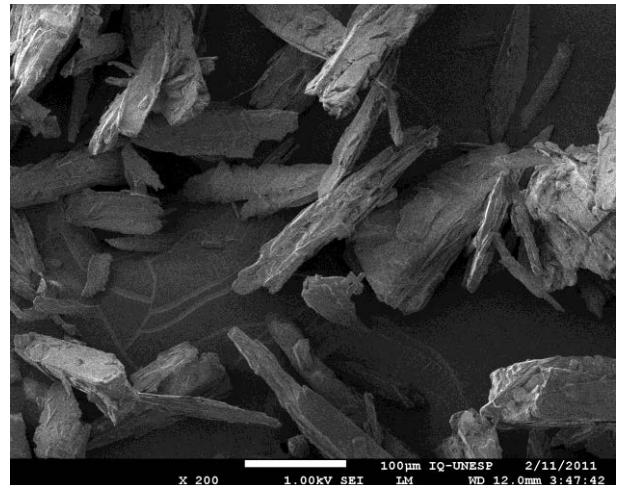
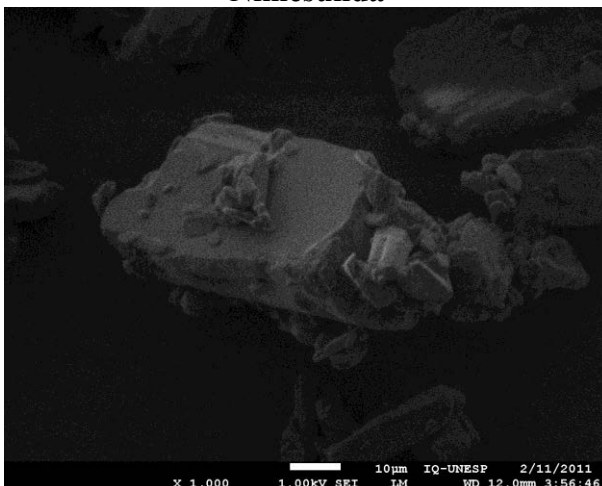
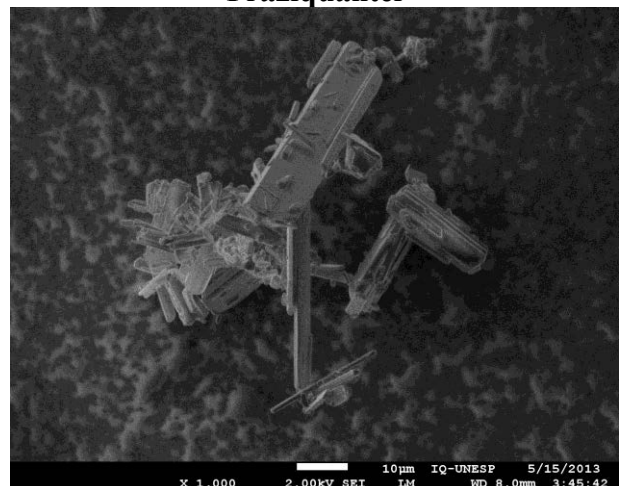
De acordo com os valores de circularidade (Tabela 17), podemos observar que todos os complexos demonstram certa regularidade de forma, visto que os valores apresentam-se dentro de uma estreita faixa (0,609 a 0,741).

5.9 Morfologia de superfície

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens com alta ampliação (até 300.000x) e alta resolução. A obtenção de imagem ocorre através da interação entre o feixe de elétrons e a superfície da amostra, gerando sinais de espalhamentos. Esse sinal é recebido, armazenado no computador, o qual é convertido em imagem (FLEGLER, 1993; GOLDSTEIN, 2003; MEYER, 2004; SKOOG et al., 2007)

Essa técnica foi utilizada, pois fornece a visualização direta dos complexos permitindo avaliar a forma, o tamanho e outras características (GAUMET et al., 2008).

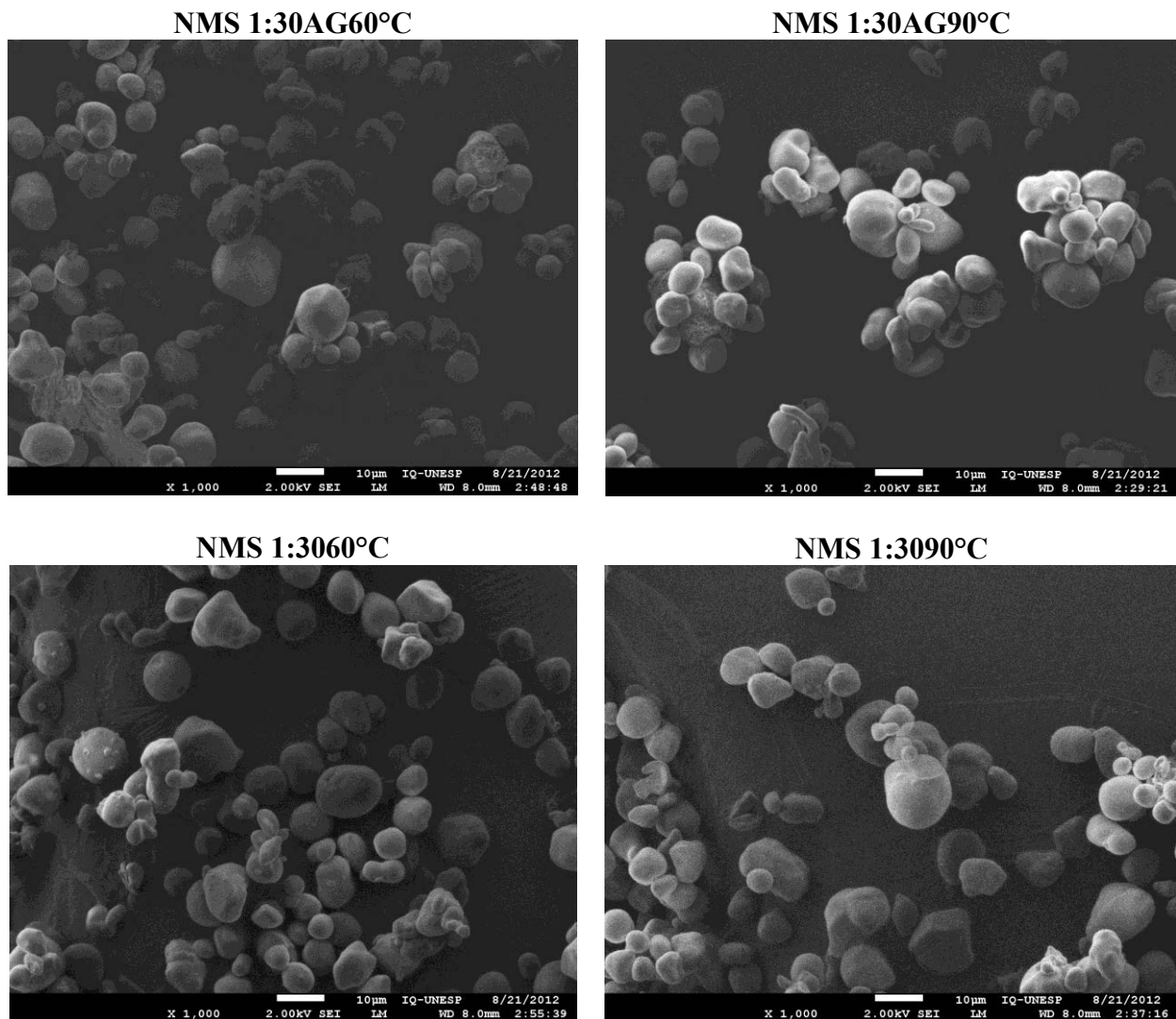
As fotomicrografias (MEV-FEG, aumento de 1000x) dos materiais isolados (Figura 44) e dos complexos de inclusão (Figura 45 e 46) (exceto o AG com aumento de 200x).

Figura 44: Fotomicrografias das substâncias isoladas**Alta Amilose****Ácido Palmítico****Nimesulida****Praziquantel**

A fotomicrografia da alta amilose (Figura 44) revelou que as partículas de alta amilose são globulares com superfície lisa, enquanto as partículas dos fármacos (Figura 44) apresentam-se na forma cristalina com formatos irregulares (RIBEIRO et al., 2003; MIAO et al., 2011).

A maioria dos cristais de NMS (Figura 44) tem tamanho de aproximadamente 5-20µm de comprimento e 1-5 µm de largura (SINGH et al., 2001).

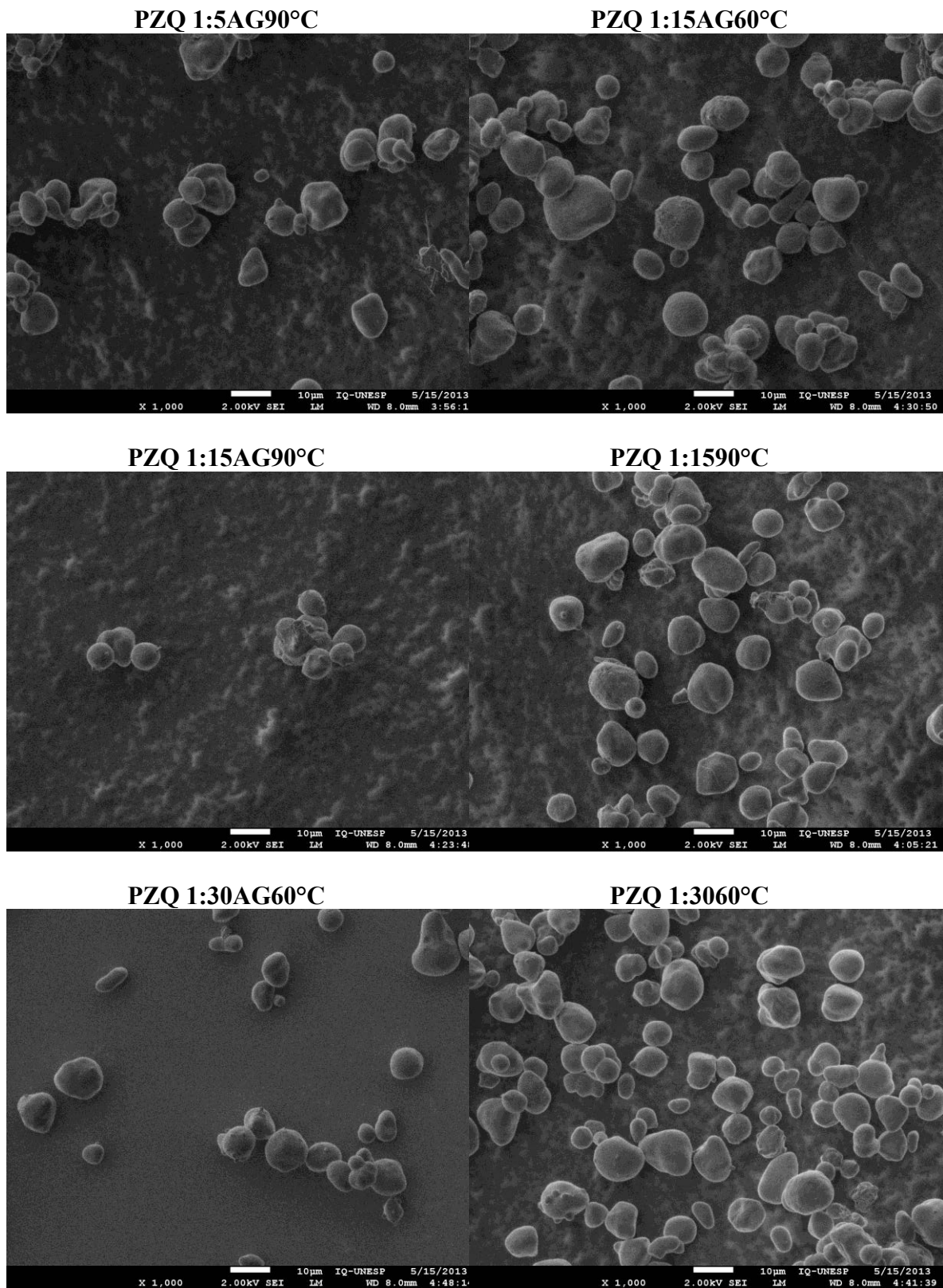
Os cristais de PZQ (Figura 44) são finos e alongados e encontram-se agrupados.

Figura 45: Fotomicrografias dos complexos com NMS

As fotomicrografias dos complexos (Figura 45) revelam estruturas esféricas de superfície lisa, semelhantes às observadas pela alta amilose (Figura 44).

Nos complexo NMS 1:3090°C e NMS 1:30AG90°C podemos observar estruturas semelhantes às da NMS, sugerindo que há também NMS na forma não complexada, o que esta de acordo com os resultados de DSC (item 5.5) e DRX (item 5.6) que evidenciaram uma fração de NMS na forma livre.

Figura 46: Fotomicrografias dos complexos com PZQ



De acordo com as fotomicrografias dos complexos (Figura 46) foi possível observar a ausência de estruturas semelhantes a do PZQ na forma livre, sugerindo a

complexação desse fármaco com a alta amilose, esse resultado está em concordância com os resultados do DSC (item 5.5), dos quais, não observou o evento endotérmico relacionado ao PZQ na forma livre.

Todas as partículas dos complexos com NMS e PZQ mostraram-se no formato esférico com superfície lisa e com certa regularidade no tamanho das partículas.

5.10 Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido (RMN)

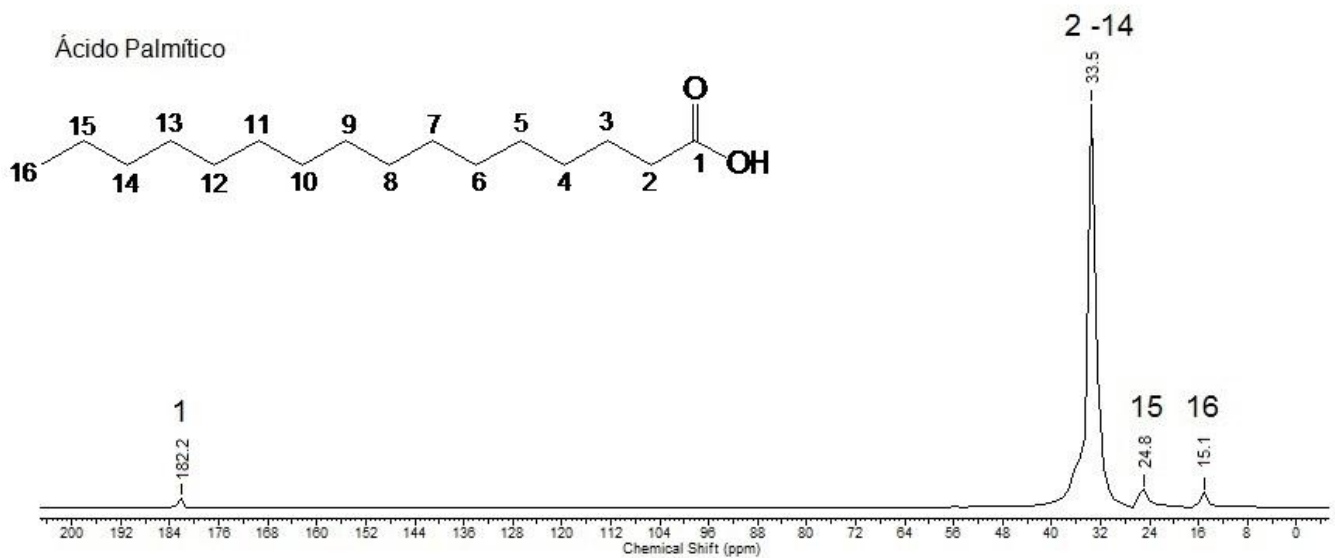
A espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma forma de espectroscopia de absorção, da qual sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética em uma frequência regida pelas características estruturais da amostra (SILVERSTEIN et al., 2006).

Complexos de inclusão com alta amilose têm sido analisados pela técnica de RMN ^{13}C no estado sólido (SENEVIRATNE, BILIADERIS, 1991; GIDLEY et al, 1998), através da observação das mudanças que ocorrem nos sinais de carbono (^{13}C) pertencentes nas moléculas da amilose ou do hospede no estado complexado. (CONNORS 1996)

Durante o processo de complexação, ocorre uma modificação considerável no ambiente dos átomos situados no interior da molécula de alta amilose gerado basicamente pela saída de moléculas de água e entrada de uma molécula hóspede, geralmente de característica apolar. O mesmo vai ocorrer com os núcleos da molécula do fármaco, que vai passar de um meio polar (solução) para um meio de caráter apolar interior da molécula de alta amilose. Por isso os sinais de RMN observados na alta amilose terão uma variação de deslocamento químico, devido a estarem envolvidos no processo de complexação (DJEDAINÉ, PERLY, 1991)

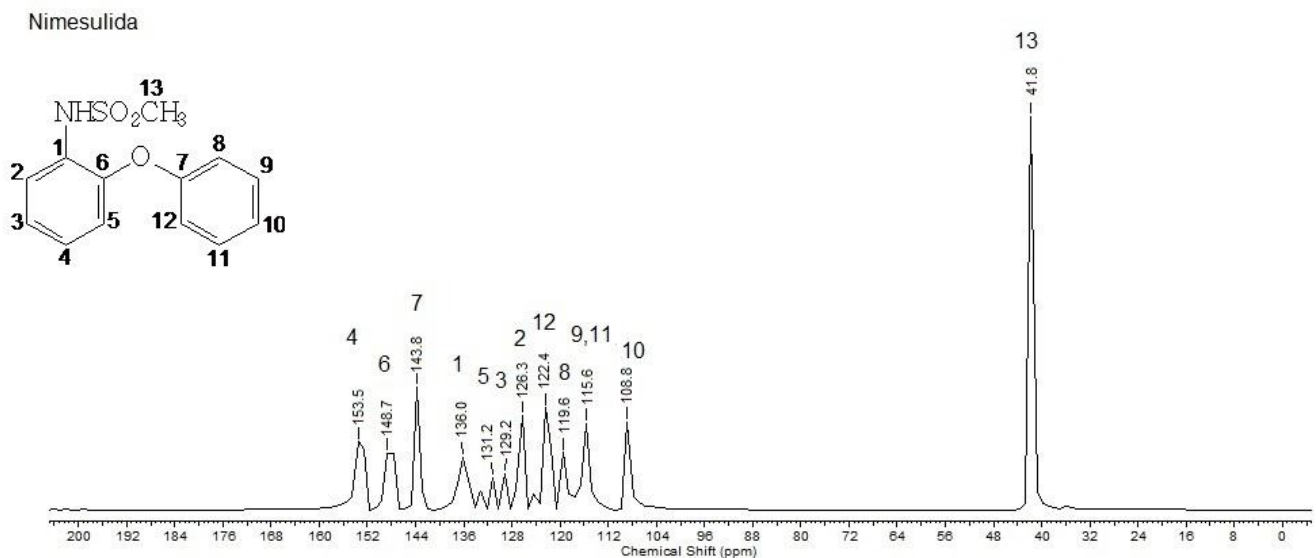
Os deslocamentos químicos das amostras isoladas são representados nos espectros de RMN de ^{13}C nas Figuras 47-49.

Figura 47: Espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C – Ácido Palmítico(AG)



No espectro de RMN ^{13}C da Figura 47 foram observados quatro sinais referentes à estrutura química do AG. O sinal mais intenso a δ 33,5 ppm foi atribuído aos carbonos C-2 a C-14, esses carbonos apresentam o mesmo deslocamento químico devido a apresentarem o mesmo ambiente químico. O sinal a δ 182,2 ppm foi atribuído ao carbono da carboxila (C-1) devido ao fato desse carbono estar mais desblindado por efeito da eletronegatividade do oxigênio ligado diretamente ao carbono, enquanto que os carbonos C-15 e C-16 encontraram-se mais blindados, com sinal a δ 24,8 ppm e δ 15,1 ppm, respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2006).

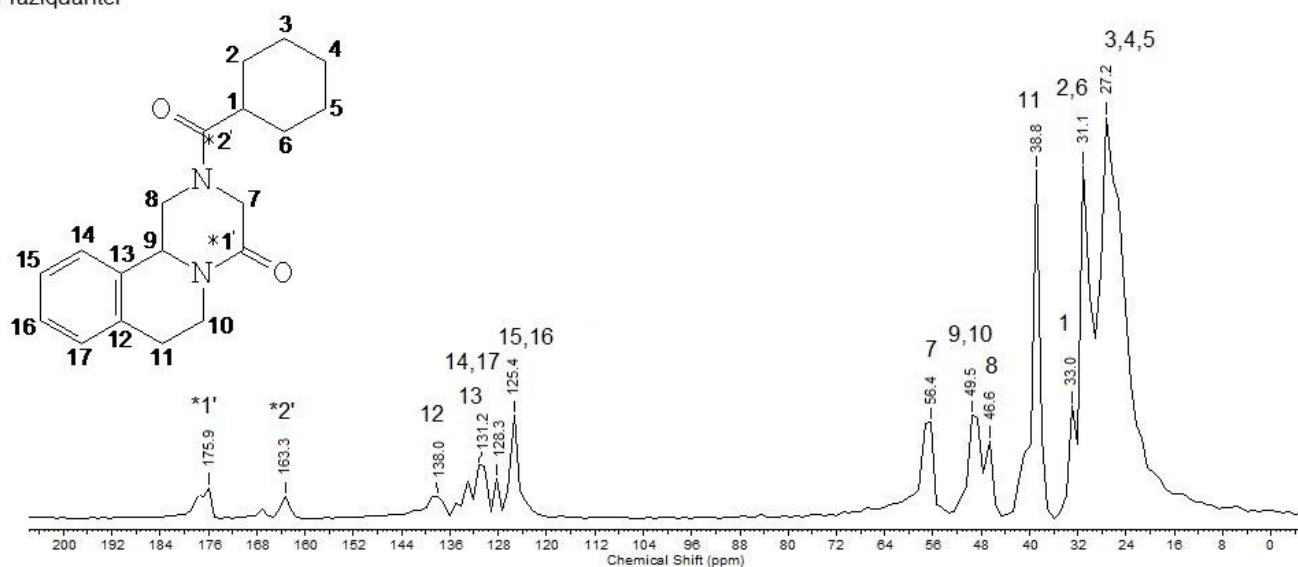
Figura 48: Espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C – Nimesulida(NMS)



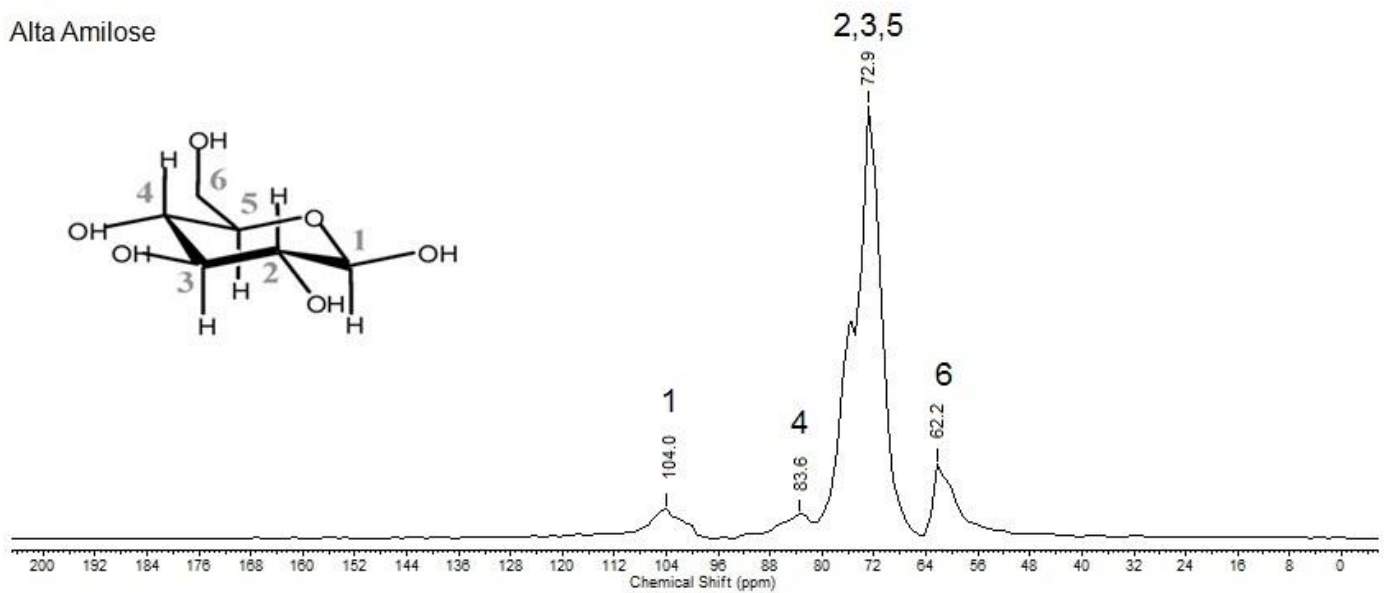
O espectro de RMN ^{13}C da Figura 48 apresentou todos os sinais referentes aos treze carbonos da NMS. Os sinais a δ 108,8-153,5 ppm foram atribuídos aos carbonos aromáticos da estrutura da NMS (C-1 a C-12) e o sinal a δ 41,8 ppm foi atribuído a metila ligada ao grupamento NHSO_2 (SILVERSTEIN et al 2006).

Figura 49: Espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C – Praziquantel (PZQ)

Praziquantel



O espectro de RMN ^{13}C da Figura 49 apresentou todos os sinais referentes aos dezenove carbonos do PZQ. Os sinais a δ 27,2 ppm , δ 31,1 ppm , δ 33,0 ppm , δ 38,8 ppm , δ 46,6 ppm , δ 49,5 ppm e δ 56,4 ppm foram atribuídos aos carbonos cíclicos, a δ 163,2 ppm e δ 175,9 ppm foram atribuídos às duas carbonilas e a δ 125,4 ppm, δ 128,3 ppm, δ 131,2 ppm e δ 138,0 ppm foram atribuídos aos carbonos aromáticos (HUSSEIN et al., 1998; SILVERSTEIN et al 2006).

Figura 50: Espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C – Alta Amilose

O espectro de RMN ^{13}C da Figura 50 apresenta todos os sinais referentes à estrutura da alta amilose. O sinal a δ 72,9 ppm, proveniente dos carbonos C-2, C-3 e C-5, os demais sinais foram atribuídos em aproximadamente δ 104,0 ppm, δ 83,6 ppm e δ 62,2 ppm são provenientes dos carbonos C-1, C-4 e C-6, respectivamente (TOZUKA et al., 2006; SILVERSTEIN 2006).

Os carbonos C-1 e C-4 são sensíveis às mudanças conformacionais, devido a influencia das características associadas à ligação glicosídica $\alpha(1-4)$ envolvida na deformação da hélice de seis glucose por giro, o que poderia ser atribuído a uma possível inclusão da molécula hóspede ou à presença da molécula entre a hélice (GIDLEY, BOCIEK, 1988; HARADA et al., 1993; LE BAIL et al., 2005).

O grupo hidroxila do carbono C-6 é mais acessível tornando esse carbono mais reativo que os demais (GOTLIEB, CAPELLE, 2005; CURY et al., 2008), sendo possível observar mudanças conformacionais no C-6 dos complexos de inclusão e atribuí-las à complexação do fármaco.

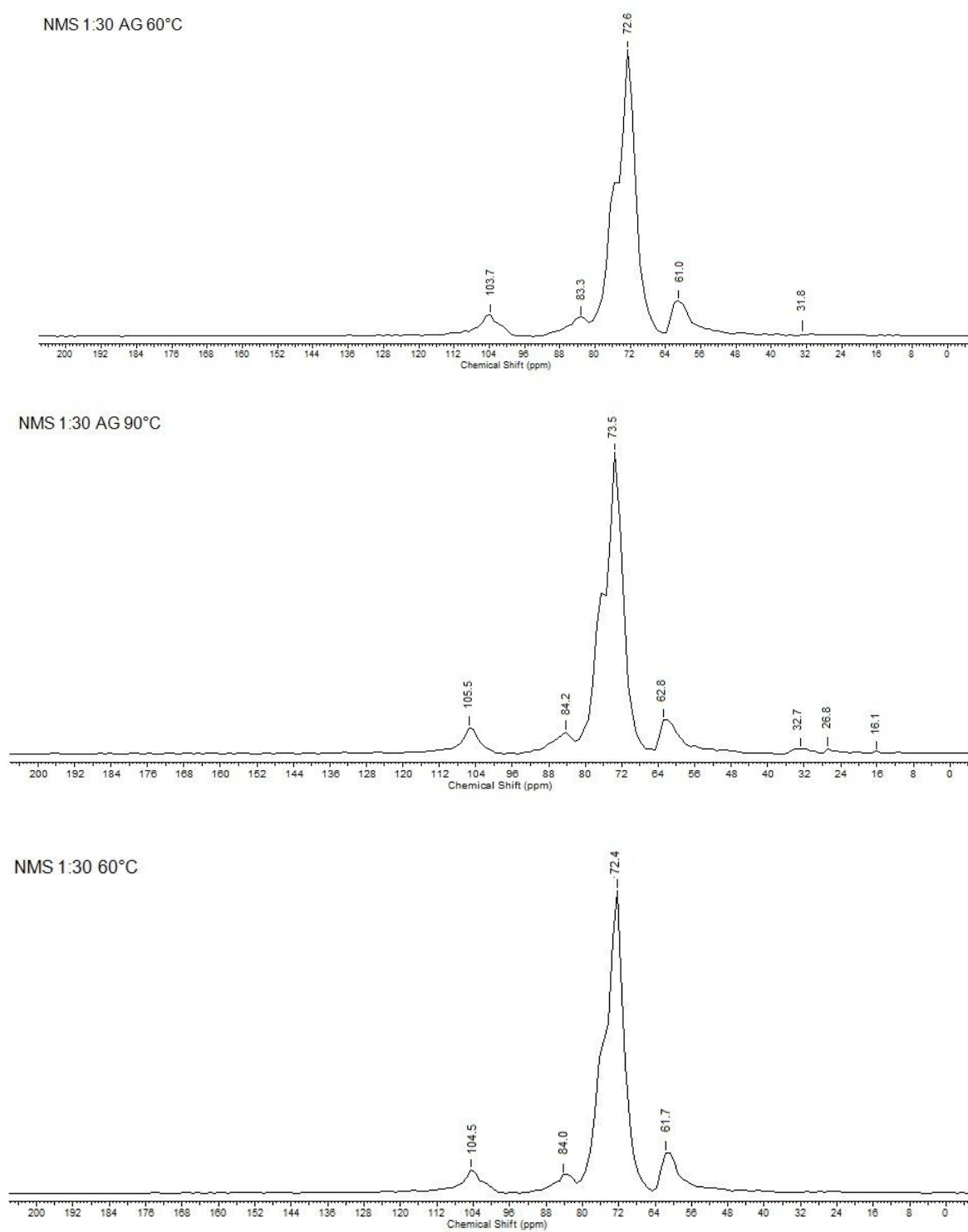
Os deslocamentos químicos da alta amilose, AG e dos complexos com NMS e PZQ são representados na Tabela 18.

Tabela 18: Deslocamentos químicos de ^{13}C da alta amilose, AG e dos complexos.

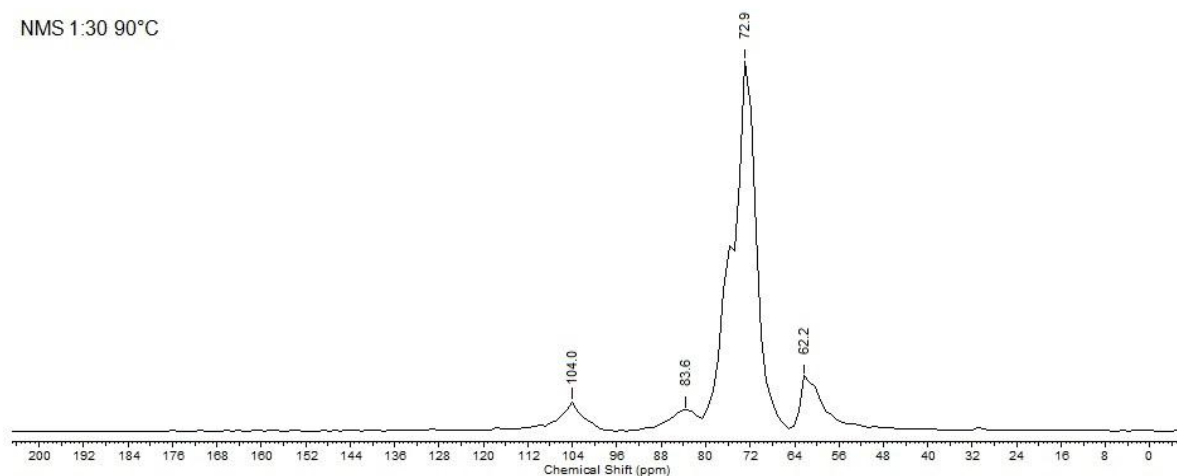
	Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C						
	Alta Amilose δ (ppm)				AG δ (ppm)		
	C-1	C-2, C-3 e C-5	C-4	C-6	C-2 a C-14	C-15	C-16
Alta Amilose	104,0	72,9	83,6	62,2	-----	-----	-----
AG	-----	-----	-----	-----	33,5	24,8	15,1
NMS 1:30AG60°C	103,7	72,6	83,3	61,0	31,8	-----	-----
NMS 1:30AG90°C	105,5	73,5	84,2	62,8	32,7	26,8	16,1
NMS 1:3060°C	104,5	72,4	84,0	61,7	-----	-----	-----
NMS 1:3090°C	104,0	72,9	83,6	62,2	-----	-----	-----
PZQ 1:5AG90°C	103,7	72,6	83,3	61,0	31,8	-----	-----
PZQ 1:15AG60°C	104,7	72,6	83,3	62,0	-----	-----	-----
PZQ 1:15AG90°C	103,7	72,6	83,3	62,0	-----	-----	-----
PZQ 1:1590°C	104,5	72,4	83,1	61,7	-----	-----	-----
PZQ 1:30AG60°C	104,5	72,4	83,1	61,7	33,52	-----	-----
PZQ 1:3060°C	104,5	72,4	83,1	61,7	-----	-----	-----

Os valores de deslocamento químicos apresentados na Tabela 18 demonstram houve uma interação da alta amilose com as moléculas hospedes devido ao deslocamento químico de todos os carbonos em comparação aos picos de absorção da alta amilose, exceto a amostra NMS 1:3090°C que não foi possível observar o deslocamento químico dos carbonos, sugerindo que nessa condição não foi adequada para a formação de complexo.

Os sinais dos deslocamentos químicos para os complexos com NMS também são representados nos espectros de RMN de ^{13}C na Figura 51.

Figura 51: Espectros de RMN CP/MAS de ^{13}C – Complexos com NMS

Cont. Figura 51



Comparando os espectros dos complexos (Figura 51) com o espectro da alta amilose (Figura 50) foi possível observar uma variação do deslocamento químico dos carbonos C-1, C-2, C-3, C-5; C-4 e C-6 (Tabela 18) exceto para a amostra NMS 1:3090 sugerindo que não houve a formação de complexos com NMS para esta amostra, confirmando os dados de DSC (item 5.5), DRX (item 5.6) e MEV-FEG (item 5.9) que também apontaram a presença de NMS não complexada.

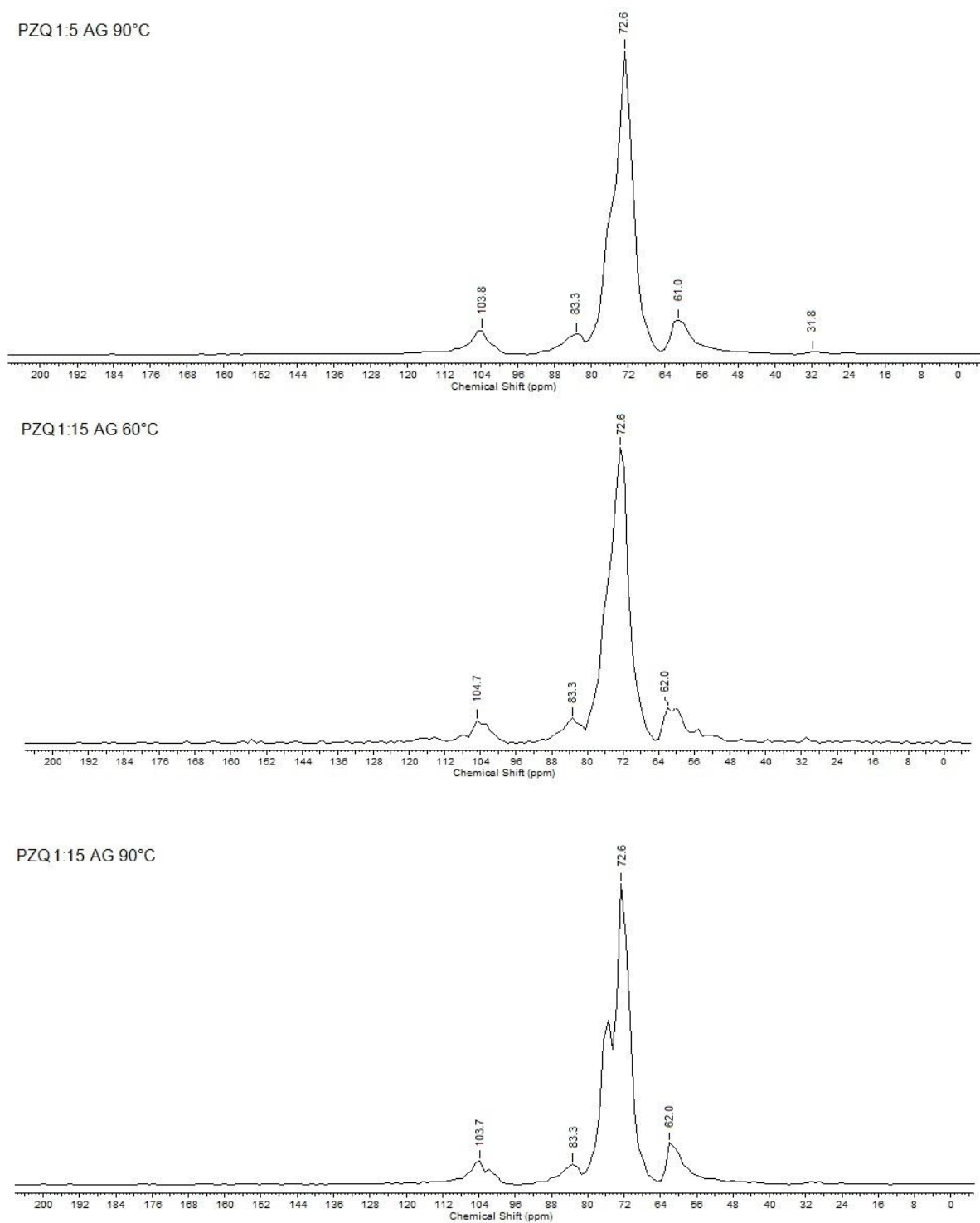
O deslocamento químico do C-6 mais pronunciado apresentado pela amostra NMS 1:30AG60°C (aproximadamente 1,2ppm) em relação ao C-6 da alta amilose, tais deslocamentos confirmam a ocorrência da formação dos complexos.

Foi possível observar um sinal a δ 31,8ppm na amostra NMS 1:30AG60°C e em δ 32,7ppm para a amostra NMS 1:30AG90°C estes sinais estão relacionado com a fração do AG complexado (SNAPES et al., 1998; LE BAIL et al.,2000). A interação do AG com os componentes dos complexos confirmam os dados de DSC (Figura 29), que foi possível observar que a presença do AG promoveu o deslocamento do ponto de fusão da NMS. Porém a amostra NMS 1:30AG90°C; também apresentou sinais em aproximadamente δ 26,8ppm e δ 16,1ppm que são atribuídos ao AG não complexado (SNAPES et al., 1998; LE BAIL et al.,2000).

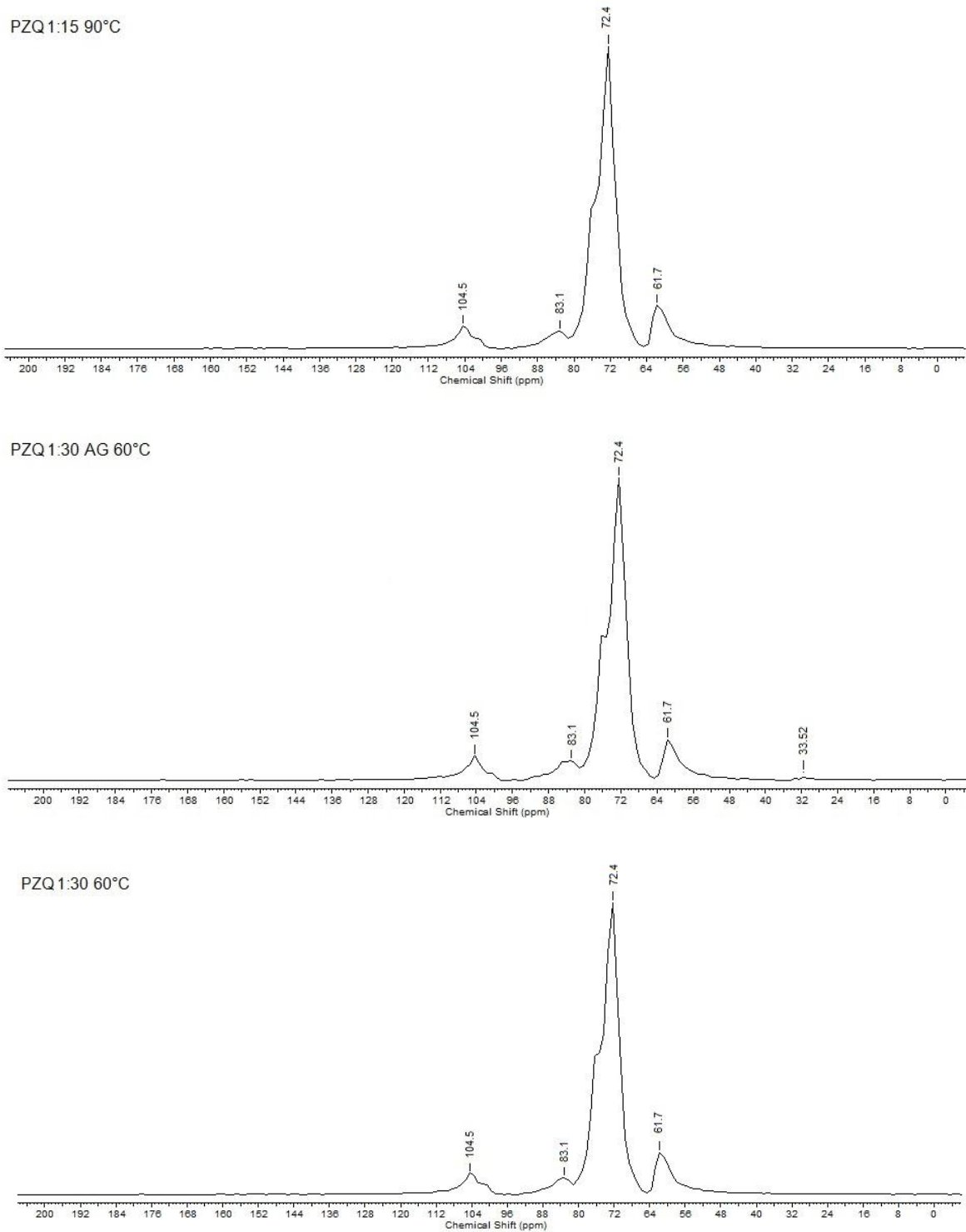
Com a análise dos dados de RMN em conjunto com os dados de DRX (item 5.6), podemos concluir que para a amostra NMS 1:30AG90°C, parte da NMS encontra-se complexada no interior da hélice do polímero e parte encontra-se entre as hélices da alta amilose, devido a presença de um pico em aproximadamente 5° (Figura 35) que foi atribuído ao empacotamento físico da NMS que não foi complexada.

Os eventos apresentados pelos complexos NMS 1:30AG60°C e NMS 1:3060°C foram associados a formação do complexo de inclusão. Esses dados estão de acordo com os resultados de DRX (item 5.6) que evidenciaram o desaparecimento e redução das intensidades de picos atribuídos aos componentes isolados e com o deslocamento do evento endotérmico de fusão da alta amilose bastante evidente apresentado na análise de DSC (item 5.5), confirmando a formação do complexo.

Os espectros de RMN de ^{13}C com PZQ são representados na Figura 52.

Figura 52: Espectros de RMN CP/MAS de ^{13}C – Complexos com PZQ

Cont. Figura 52



Comparando os espectros desses complexos (Figura 52) com o espectro da alta amilose (Figura 50) foi possível observar variações no deslocamento químico dos carbonos C-1, C-2, C-3, C-5, C-4 e C-6.

O deslocamento químico do C-6 foi mais evidente para a amostra PZQ 1:5AG90°C com deslocamento de 1,2ppm em relação ao C-6 da alta amilose. Os

deslocamentos químicos apresentados são indicativos da formação de complexos. Também foi possível observar para esta amostra um sinal a δ 31,8ppm que está relacionado com a fração do AG complexado (SNAPES et al., 1998; LEBAIL et al., 2000).

Os mesmos deslocamentos químicos foram observados para o complexo NMS 1:30AG60°C que demonstrou os melhores resultados comparado com os demais complexos preparados com NMS.

Os deslocamentos químicos apresentados pela amostra PZQ 1:5AG90°C confirmam as indicações de formação complexo das análises de DSC (item 5.5) e DRX (item 5.6), as quais evidenciaram desaparecimento e redução das intensidades de picos atribuídos aos componentes isolados e desaparecimento do pico endotérmico de fusão do PZQ com deslocamento de eventos endotérmicos, respectivamente. Os dados estão em concordância, ainda com os resultados do teor de fármaco complexado (%) (Figura 24), em que a amostra PZQ 1:5AG90°C apresentou 65,13%.

Para a amostra PZQ 1:15AG90°C os resultados de DSC (item 5.5) e DRX (item 5.6) indicaram a formação de complexo, no entanto essa amostra apresentou nos resultados de RMN os menores deslocamentos químicos sugerindo que nessa condição a complexação do PZQ no interior da hélice da alta amilose é inferior às demais amostras.

Os espectros de RMN das amostras PZQ 1:1590°C, PZQ 1:3060°C e PZQ 1:30AG60°C apresentaram os mesmos deslocamentos químicos para todos os carbonos das amostras analisadas, indicando a mesma forma de complexação do PZQ para essas amostras.

Porém, para a amostra PZQ 1:30AG60°C, também foi possível observar um sinal a δ 33,52ppm, de acordo com Le Bail e colaboradores (2000), sinais de ressonância a δ 31-32ppm indicam a presença de AG complexado, enquanto sinais entre δ 33-34ppm são atribuídos a AG na forma livre, sugerindo que a interação ocorre apenas entre o PZQ e a alta amilose, confirmando os dados de DSC (Figura 30-Tabela 11) que o pico endotérmico de fusão do AG é observado.

As amostras PZQ 1:5AG90°C, PZQ 1:30AG60°C e PZQ 1:3060°C através dos deslocamentos químicos analisados no RMN e em conjunto com os dados de DRX (item 5.6), que evidenciaram o desaparecimento e redução das intensidades de picos atribuídos aos componentes isolados, dos dados de DSC (item 5.5) que apresentaram o

deslocamento do evento endotérmico de fusão da alta amilose bastante evidente e os maiores valores de fármaco complexado (Figura 24), confirmam que essas condições são as mais adequadas para formação do complexo.

Todos os complexos analisados demonstraram sinais de ressonância de C-1 e C-4 (103-104ppm) correspondentes a estrutura do tipo V e confirmaram os resultados obtidos pela DRX (item 5.6) (GIDLEY, BOCIEK, 1988). A estrutura tipo V apresenta maior resistência enzimática tornando esses complexos promissores como sistemas de liberação controlada de fármacos.

5.11 Determinação da capacidade de absorção de líquidos

No desenvolvimento de sistemas de liberação controlada baseados em polímeros hidrofílicos é importante avaliar sua capacidade de absorção de líquidos, já que a taxa de liberação do fármaco é controlada pela taxa de difusão do fluido penetrante para o interior da matriz e do fármaco em solução, através do polímero geleificado. É importante salientar que a quantidade de água absorvida pelo polímero é função de sua hidrofilia, da estrutura de rede formada e do número de grupos ionizáveis presentes na estrutura polimérica (GEHRKE, LEE; 1990; GINANE et al., 1999; MAITI et al., 2011).

Assim sendo, a capacidade de absorção de líquido das amostras pode indicar diferenças entre as estruturas originadas em função do complexo formado, além de apresentar correlação com o comportamento de liberação do fármaco.

Os perfis de absorção de líquido dos complexos com NMS e PZQ foram avaliados até que o equilíbrio fosse alcançado (Tabela 19). As análises foram realizadas em meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2) e em tampão fosfato (pH 6,9) e são apresentados na Figura 53.

Figura 53: Perfil de absorção de líquido nos complexos com NMS e PZQ

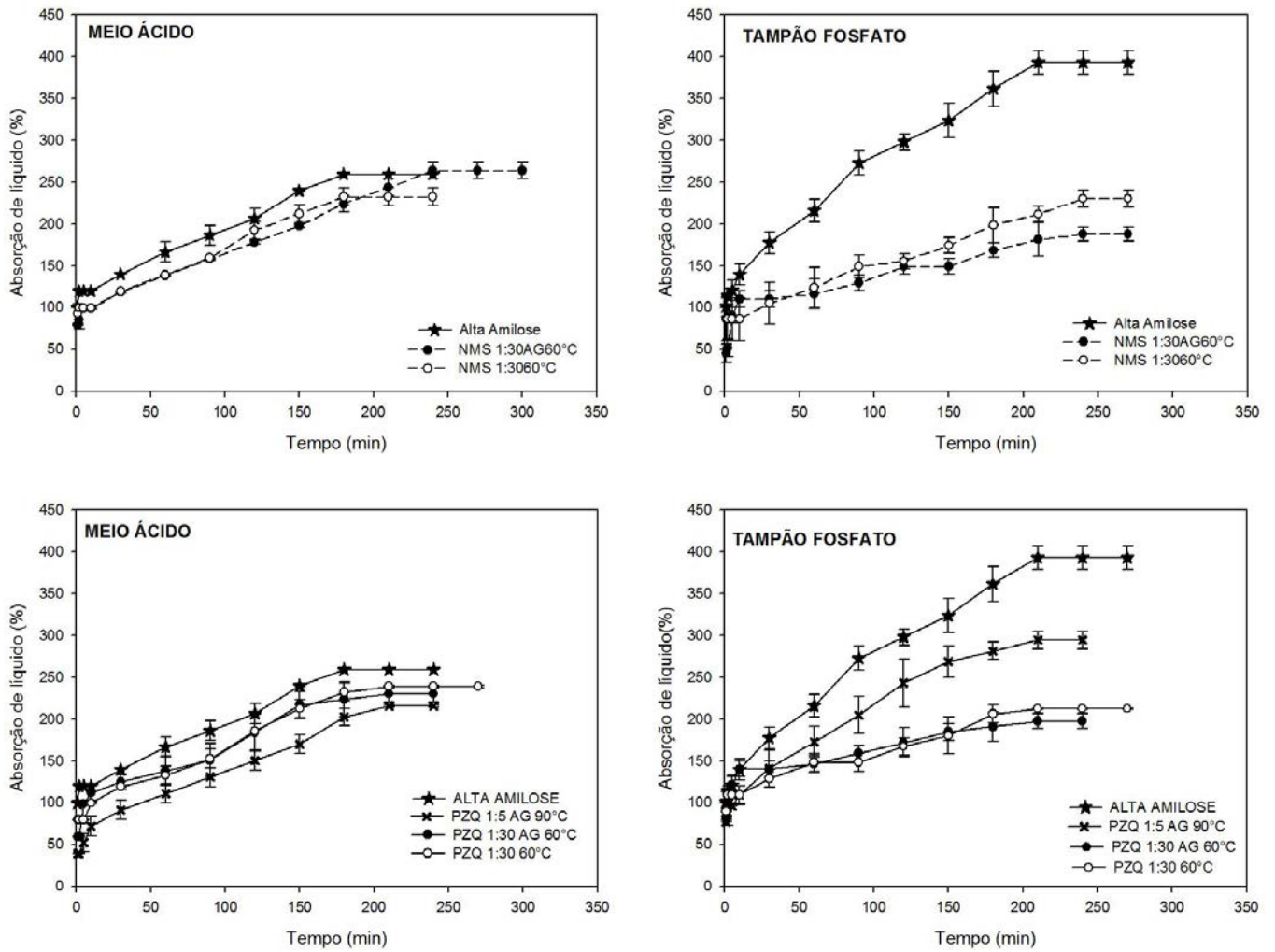


Tabela 19: Valores e tempo de equilíbrio de absorção de líquido das amostras

MEIO ÁCIDO		
AMOSTRAS	Tempo de Equilíbrio (min)	Absorção de líquido (%)
Alta Amilose	240	259,481 ± 0,518
NMS 1:30 AG 60°C	300	263,472± 9,776
NMS 1:30 60°C	240	232,064 ± 10,459
PZQ 1:5 AG 90°C	240	215,549 ± 1,062
PZQ 1:30 AG 60°C	240	230,247 ± 10,055
PZQ 1:30 60°C	270	238,892 ± 1,524
TAMPÃO FOSFATO		
AMOSTRAS	Tempo de Equilíbrio (min)	Absorção de líquido (%)
Alta Amilose	270	392,718 ± 14,033
NMS 1:30 AG 60°C	270	187,741± 8,560
NMS 1:30 60°C	270	230,212 ± 9,743
PZQ 1:5 AG 90°C	240	294,294 ± 10,586
PZQ 1:30 AG 60°C	240	197,387 ± 8,799
PZQ 1:30 60°C	270	212,357 ± 8,799

A absorção de líquido em polímeros aniônicos é dependente do pH e a medida que aumenta o pH do meio é esperado um aumento no volume de líquido absorvido (KHARE , PEPPAS, 1995; MULHBACHER et al., 2004).

Esse comportamento foi observado apenas para alta amilose (Figura 53) onde a absorção de líquido em pH ácido foi de 259,481% e com aumento do pH a absorção de líquido foi de 392,718%.

Esse comportamento pode ser atribuído, devido no meio ácido, há predomínio de íons H^+ , que leva à protonação dos grupamentos carboxílicos, reduzindo a repulsão eletrostática, diminuindo conseqüentemente, a retenção de líquido, já com o aumento do pH os grupos carboxílicos permanecem em sua forma ionizada, aumentando a hidrofília promovendo a expansão da rede polimérica por repulsão eletrostática, favorecendo a entrada de líquido (MULHBACHER, et al., 2004; BAJPAI et al., 2008; FAHMY, FOU DA, 2008; CHEN et al., 2009; SOUTO-MAIOR et al., 2010).

Em relação aos valores da Tabela 19, a absorção de líquido dos complexos com NMS (NMS 1:30AG60°C e NMS 1:3060°C) apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), tanto no meio ácido quanto em tampão fosfato, indicando a modificação estrutural na presença do AG.

Para os complexos com PZQ (Tabela 19), a presença do AG não influenciou o percentual de líquido absorvido, já que as amostras PZQ 1:30AG60°C e PZQ 1:3060°C não demonstraram diferenças significativas nos meios analisados ($p < 0,05$), porém a amostra PZQ 1:5AG90°C apresentou diferenças significativa ($p < 0,05$) nos meios analisados em relação aos outros complexos com PZQ, indicando a influência da proporção fármaco/polímero na capacidade de absorção de líquido.

A capacidade de absorção de líquido dos complexos foi inferior à da alta amilose, provavelmente a formação dos complexos levou à formação de uma estrutura mais cristalina. Com o aumento do pH houve uma diminuição na absorção de líquido, pelos complexos, comportamento distinto ao observado para alta amilose, que pode ser atribuído à formação de complexos com a presença de fármacos hidrofóbicos próximo a superfície, reduzindo a capacidade de absorção de líquido e sugerindo a formação de complexos com fármacos inter e intra-hélice (BECKER et al., 2001; DEBET, GIDLEY, 2006; GUNARATNE, CORKE, 2007).

5.12 Determinação dos perfis liberação *in vitro* dos fármacos

5.12.1 Seleção dos complexos de inclusão para teste de liberação *in vitro* dos fármacos

Através do conjunto de resultados foi possível observar que os complexos NMS 1:30AG60°C e NMS1:3060°C apresentaram os mais elevados valores de NMS complexada (52,16% e 43,18%, respectivamente), deslocamentos de eventos endotérmicos mais pronunciados (item 5.5) que os outros complexos com NMS e os picos característicos da NMS não complexada apareceram reduzidos nessas amostras, demonstrando que esses complexos apresentaram modificações estruturais e apresentam maior cristalinidade, tornando essas complexos os mais promissores para sistemas de liberação controlada de fármacos.

Para os complexos com PZQ todas as amostras apresentaram redução ou ausência de picos característicos do PZQ livre (item 5.6), indicando modificações estruturais nos complexos com PZQ, porém os maiores valores de fármaco complexado

foram obtidos pelos complexos PZQ 1:5AG90°C (65,13%) e PZQ 1:30AG60°C (68,16%), que também apresentaram deslocamentos de eventos endotérmicos bastante pronunciado, indicando maior cristalinidade e maiores variações de entalpias, sugerindo maior interação do fármaco com o polímero, tornando esses complexos com PZQ os mais promissores para liberação controlada de fármacos.

5.12.2 Teste de dissolução para determinação dos perfis liberação *in vitro* dos fármacos

Para um fármaco ser absorvido é necessário que ocorra sua dissolução após a administração, ou seja, suas moléculas devem ser liberadas da forma farmacêutica como uma dispersão molecular (RODRIGUES, SILVA, 2005; JAMBHEKAR, 2013; PREZOTTI, 2013).

Como a dissolução é uma etapa fundamental para a absorção, é importante avaliar a velocidade com que esse processo ocorre, e isso pode ser feito através da avaliação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco, que é indispensável no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas (MANADAS et al., 2002, PREZOTTI, 2013).

Os perfis de liberação dos fármacos a partir dos diferentes complexos em meio ácido (pH 1,2), são apresentados na Figura 54, onde pode-se observar que a complexação dos fármacos na amilose promoveu uma significativa redução das taxas de liberação (Tabela 20).

Figura 54: Perfis de liberação em meio ácido (pH 1,2)

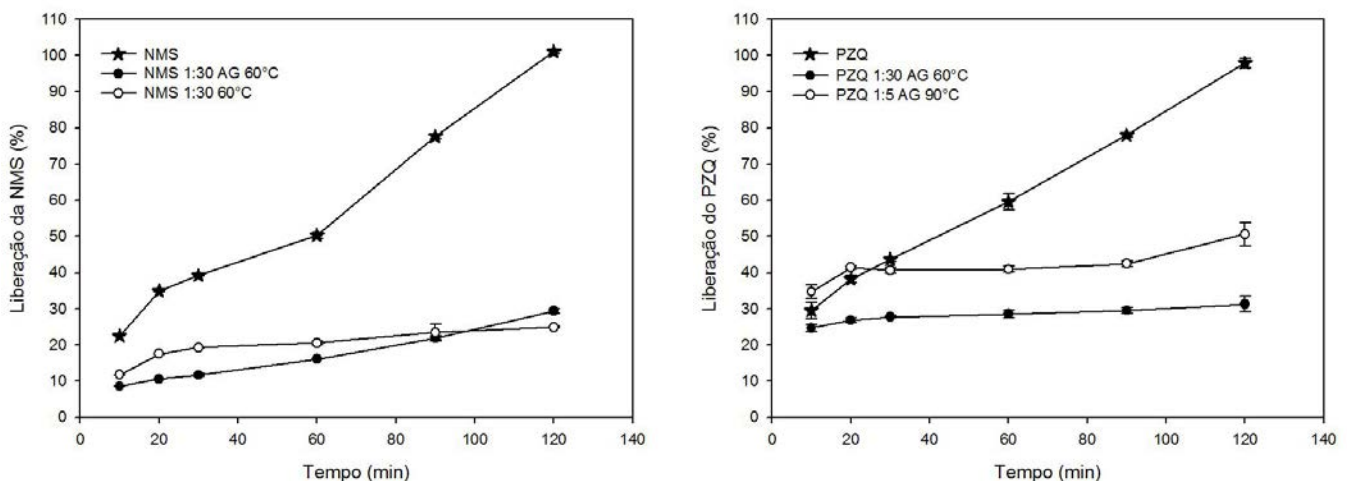


Tabela 20: Percentual de liberação dos fármacos complexados em meio ácido (pH 1,2) no tempo de 120 minutos

Amostras	Percentual de liberação
NMS	101,044 ± 0,710
NMS 1:30AG60°C	29,352 ± 0,620
NMS 1:3060°C	24,921 ± 0,176
PZQ	97,856 ± 1,389
PZQ 1:5AG90°C	50,612 ± 3,237
PZQ 1:30AG60°C	31,278 ± 2,107

De acordo com os resultados apresentados (Figura 54 e Tabela 20), a liberação dos fármacos (NMS e PZQ) se completa em 120 minutos de experimento em meio ácido.

Analisando-se os perfis de liberação (Figura 54) apresentados pelos complexos, nota-se que a taxa de liberação dos fármacos complexados foi inferior em relação aos fármacos livres. Nos primeiros 60 minutos de experimento os complexos com NMS liberaram 16,12% (NMS 1:30AG60°C) e 20,53% (NMS 1:3060°C), enquanto os complexos com PZQ liberaram 28,53% (PZQ 1:30AG60°C) e 40,94% (PZQ 1:5AG90°) e essa liberação manteve-se constante após 120 minutos (Tabela 20), onde a liberação dos fármacos complexados foram 29,35% e 24,92%, para os complexos NMS 1:30AG 60°C e NMS 1:3060°C, respectivamente e de 31,28% e 50,61 para os complexos PZQ 1:30AG60°C e PZQ 1:5AG90°C, respectivamente.

O perfil de liberação dos fármacos a partir dos complexos mostra que o processo de complexação com alta amilose proporciona o efetivo aprisionamento do fármaco, o que possibilita uma liberação mais lenta e gradual.

Os complexos com NMS e PZQ na proporção 1:30 apresentaram menores percentuais de liberação em meio ácido (Figura 54 e Tabela 20), esse comportamento pode ser atribuído à estrutura dos complexos formados.

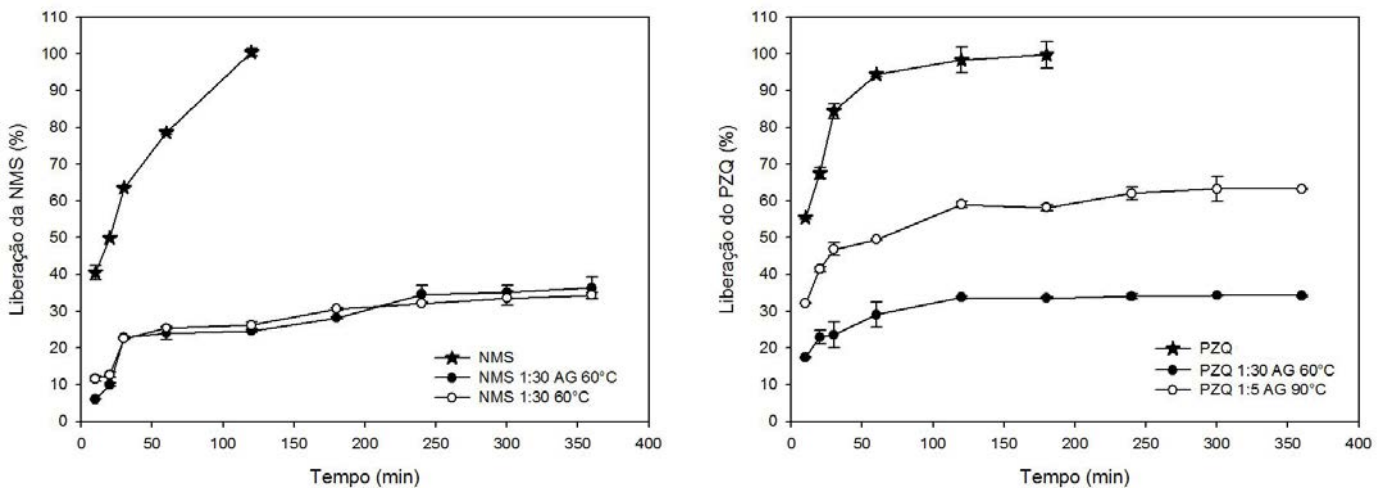
A estrutura formada pelos complexos com maior proporção de polímeros (1:30) proporcionou os maiores valores de teor de fármaco complexado (Figuras 22 e 24), devido ao maior número de sítios disponíveis para a complexação dos fármacos dentro da hélice de amilose, permitindo maior exposição do polímero ao meio de dissolução e

resultando em maiores percentuais na capacidade de absorção de líquido em meio ácido (Figura 53 e Tabela 19), em relação ao complexo PZQ 1:5AG90°C possibilitando a formação de uma espessa camada de difusão, reduzindo o percentual de liberação do fármaco no meio ácido (BIGUCCI et al., 2008).

A amostra PZQ 1:5AG90°C apresentou maior percentual de liberação de fármaco, porém também apresentou elevado teor de fármaco complexado (Figura 24), no entanto a menor proporção de polímero nesse complexo, provavelmente reduz os sítios disponíveis na alta amilose para complexação do PZQ, podendo haver fármaco inter e intra-hélice. Dessa forma, a presença de fármaco próximo à superfície do complexo explica os menores valores de absorção de líquido em meio ácido (Figura 53 e Tabela 19), e a menor massa de polímero deve proporcionar uma reduzida camada geleificada, aumentando a taxa de difusão das moléculas do fármaco através do complexo intumescido (EFENTAKIS, KOUTLIS, 2001).

Os perfis de liberação dos fármacos a partir dos diferentes complexos em tampão fosfato (pH 6,9) sem enzima, são apresentados na Figura 55.

Figura 55: Perfis de liberação em tampão fosfato sem enzima (pH 6,9)



Os percentuais de liberação dos fármacos em 360 minutos de experimento são exibidos na Tabela 21.

Tabela 21: Percentual de liberação dos fármacos complexados em tampão fosfato sem enzima (pH 6,9) no tempo de 360 minutos.

Amostras	Percentual de liberação
NMS	100,435 ± 1,084
NMS 1:30AG60°C	36,318 ± 3,016
NMS 1:3060°C	34,351 ± 0,951
PZQ	99,699 ± 3,091
PZQ 1:5AG90°C	63,222 ± 0,390
PZQ 1:30AG60°C	34,216 ± 0,315

De acordo com os resultados apresentados (Figura 55 e Tabelas 21) a liberação dos fármacos livres (NMS e PZQ) se completou em 120 minutos de experimento, já os fármacos complexados, no mesmo período, liberaram NMS 1:30AG60°C, 24,58% ; NMS 1:3060°C, 26,16%; PZQ 1:30AG60°C, 33,69% e PZQ 1:5AG90°C, 59,05%, demonstrando que o processo de complexação permitiu um aprisionamento dos fármacos, reduzindo sua taxa de liberação.

Os perfis de liberação das amostras em tampão fosfato sem enzima (Figura 55) foram semelhantes aos perfis de liberação em meio ácido (Figura 54), demonstrando que a complexação dos fármacos levou a uma liberação mais lenta e gradual. Os complexos com maior proporção de alta amilose (1:30) formam uma estrutura que permite a liberação de menores percentuais dos fármacos ao longo do experimento, o que pode ser associado a concentração elevada desse polímeros que proporciona maior complexação dos fármacos dentro da cavidade da amilose e ao entrar em contato com o fluido do meio de dissolução, origina uma camada gelatinosa consistente, retardando a liberação dos fármacos (NMS e PZQ). A influência da proporção de polímero na estrutura formada é evidenciada na liberação do PZQ no complexo com PZQ 1:5AG90°C, onde a concentração baixa da alta amilose originou uma camada gel com menor espessura e/ou viscosidade, permitindo uma maior liberação do PZQ (LOPES et al., 2005).

No entanto os complexos analisados com NMS e PZQ (Figura 55 e Tabela 21) após 360 minutos de experimento não permitiram a total liberação dos fármacos, confirmando os resultados de DSC (item 5.5) que evidenciaram maior cristalinidade

nesses complexos, que de forma geral, deve oferecer maior resistência ao processo de dissolução.

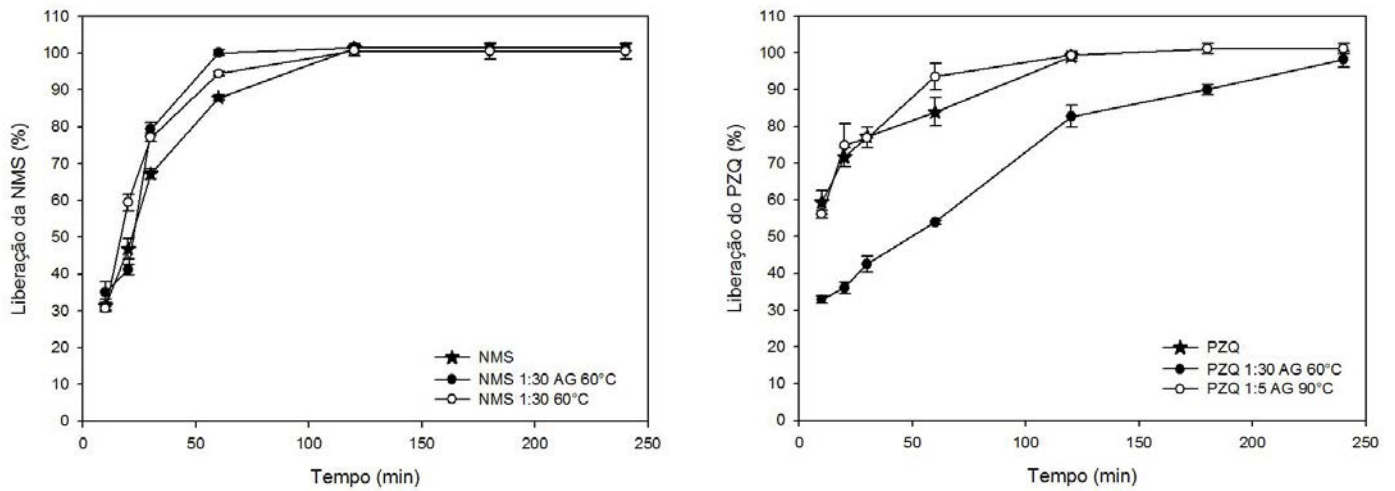
A formação de complexos com fármacos intra-hélice pode explicar a fração dos fármacos liberados nos meios analisados sem enzima, visto que esse aprisionamento deixa uma fração de fármaco mais próxima à superfície da amilose, facilitando sua liberação. Esse resultado confirma os resultados de DRX (item 5.6) nos quais, os complexos mesmo apresentando picos característicos de complexos de inclusão também apresentam alguns picos com intensidades reduzidas referentes aos fármacos. Comportamento semelhante foi observado por Lesmes e colaboradores (2008) em estudos de liberação do ácido esteárico a partir de complexos de inclusão com amido.

Uma importante característica dos complexos de inclusão com amilose utilizados em sistema de liberação é sua capacidade de liberar moléculas hospedes através da digestão enzimática pela pancreatina em porções do intestino delgado (LALUSH et al., 2005; FREIRE et al., 2009)

A taxa de digestão enzimática dos complexos depende do tipo de enzima digestiva utilizada. Estudos conduzidos por Lalush e colaboradores (2005) analisaram a digestão enzimática de complexos de inclusão com alta amilose e ácido linoleico utilizando as seguintes enzimas: pancreatina, α -amilase, amiloglicosidase e β -amilase e apenas a pancreatina possibilitou completa hidrólise (YOO, JANE, 2002, LALUSH et al. 2005; AHMADI-ABHARI, et al., 2013).

Nesse trabalho, a enzima utilizada para simular a digestão no intestino delgado foi a pancreatina, já que essa enzima por ser complexa e composta por amilase, lipase e protease é mais adequada para tal finalidade (FREIRE et al., 2009).

Os perfis de liberação dos fármacos complexados em tampão fosfato contendo pancreatina são exibidos na Figura 56.

Figura 56: Perfis de liberação em tampão fosfato com pancreatina (pH 6,9)

Os percentuais de liberação dos fármacos foram observados até a completa liberação e os resultados são exibidos na Tabela 22.

Tabela 22: Tempo de liberação dos fármacos complexados em tampão fosfato com pancreatina (pH 6,9)

Amostras	Tempo da liberação (min)
NMS	120
NMS 1:30AG60°C	60
NMS 1:3060°C	60
PZQ	120
PZQ 1:5AG90°C	60
PZQ 1:30AG60°C	240

De acordo com os resultados apresentados (Figura 56 e Tabela 22), a liberação total dos fármacos (NMS e PZQ) ocorreu em 120 minutos de experimento, no entanto, alguns complexos liberam os fármacos em 60 minutos de experimento, evidenciando que a liberação do fármaco ocorre devido à degradação enzimática dos complexos, já que os fármacos complexados após 360 minutos de experimento em tampão fosfato sem enzima não foram liberados totalmente.

Nos perfis de liberação (Figura 56), foi observado nos primeiros 10 minutos de experimento que os complexos na proporção 1:30 (NMS 1:30AG60°C, NMS 1:30 60°C

e PZQ 1:30AG60°C) permitiram a liberação de aproximadamente 30% dos fármacos (NMS e PZQ), enquanto o complexo PZQ 1:5AG90°C liberou 56,107% . Esse comportamento confirma os resultados observados no DSC (item 5.5) e os resultados da capacidade de absorção de líquido, que revelaram que essa proporção permitiu a formação de uma estrutura mais cristalina nos complexos o que possivelmente proporcionou uma maior resistência enzimática (PUTSEY et al., 2010; XU et al., 2013)

A hidrólise dos complexos de inclusão pode ocorrer em dois estágios: O primeiro estágio é em regiões amorfas, que são mais susceptíveis a ação enzimática, o segundo estágio ocorre nas regiões mais cristalinas (JANE, ROBYT, 1984; XU et al., 2013).

A hidrólise dos complexos pela ação da pancreatina foi contínua e em 60 minutos de teste houve a liberação total dos fármacos pelos complexos PZQ 1:5AG90°C, NMS 1:3060°C e NMS 1:30AG60°C (Figura 56 e Tabela 22), esse resultado indica que os complexos formados apresentam estruturas de amilose tipo V, confirmando os resultados de DRX (item 5.5) e estruturas com menor grau de cristalinidade, como do tipo I, tornando esses complexos com menor resistência enzimática. Comportamento semelhante foi observado por Bhosale e colaboradores (2010) em estudo com complexos de inclusão de amilose com ácido palmítico, em que a menor resistência enzimática foi atribuída a formação de complexos com mistura dos diferentes tipos de amilose (tipo V e tipo I).

O complexo PZQ 1:30AG60°C, provavelmente apresenta uma estrutura com alto grau de cristalinidade, confirmando os resultados de análise térmica, onde esse complexo assim como o PZQ 1:5AG90°C apresentaram valores de deslocamento do evento endotérmico de fusão da alta amilose bastante evidente (item 5.5). No entanto apenas o complexo na proporção 1:30 apresentou maior resistência enzimática permitindo uma liberação constante de PZQ por um período de 240 minutos, demonstrando que a proporção de polímero e as características dos fármacos podem influenciar a hidrólise dos complexos (KIM et al. 2013).

Os resultados dos perfis de liberação dos complexos em diferentes meios, indicam que os complexos preparados na proporção 1:30 promoveram uma significativa redução das taxas de liberação dos fármacos nos meios gástrico simulado e entérico sem enzima, liberando apenas 30% dos fármacos e a liberação total dos fármacos só foi atingida na presença de enzima, onde o complexo PZQ 1:30AG60°C mostrou-se mais resistente possibilitando a liberação mais lenta do fármaco.

5.13 Análise dos mecanismos de liberação *in vitro* dos fármacos

A interpretação quantitativa dos valores obtidos em um ensaio de dissolução é facilitada pelo uso de equações que traduzem matematicamente a curva de dissolução em função de alguns parâmetros relacionados à forma farmacêutica e devem, assim, contribuir para o esclarecimento do mecanismo de liberação do fármaco (COSTA, LOBO, 2001).

Diferentes modelos matemáticos (Tabela 1) foram aplicados aos dados de liberação (Figuras 54-56). A escolha do melhor modelo matemático de liberação pode ser baseada no valor do coeficiente de correlação r^2 . No entanto, este valor tende a tornar-se maior com a adição de mais parâmetros. Por isso, quando se compara modelos com vários parâmetros, é mais correto utilizar o coeficiente de correlação ajustado (COSTA, 2002).

Os parâmetros calculados para os modelos matemáticos aplicados aos dados de liberação da NMS e do PZQ são exibidos nas Tabelas 23, 24 e 25.

Tabela 23: Coeficiente de liberação *in vitro* dos fármacos nos complexos de inclusão em meio ácido (pH 1,2)

Modelos de Liberação	Meio ácido						
		NMS	NMS 1:30AG60°C	NMS 1:3060°C	PZQ	PZQ 1:30AG60°C	PZQ 1:5AG90°C
Baker e Lonsdale	r^2	0,8360	0,9286	0,3172	0,9160	Não converge	Não converge
	K	0,0016	0,0001	0,0001	0,0018		
Hixon and Crowell	r^2	0,9005	0,7671	Não converge	0,8664	Não converge	Não converge
	K	0,0047	0,0010		0,0052		
Higuchi	r^2	0,9206	0,9386	0,2022	0,9759	Não converge	Não converge
	K	8,1031	2,4029	2,6540	8,4132		
Primeira Ordem	r^2	0,8924	0,7846	Não converge	0,8995	Não converge	Não converge
	K	0,0172	0,0030		0,0195		
Korsmeyer-Peppas	r^2	0,9739	0,9497	0,9255	0,9959	0,9559	0,7049
	K	9,6877	1,7534	7,7632	11,5379	20,5815	27,7499
	N	0,4061	0,5735	0,2457	0,3989	0,08939	0,1100
Weibull	r^2	0,9971	0,9988	0,9812	0,9987	0,9576	0,7529
	B	2,1280	1,1570	3,2390	3,0330	1,6380	1,8490

Tabela 24: Coeficiente de liberação *in vitro* dos fármacos nos complexos de inclusão em tampão fosfato sem enzima

Modelos de Liberação	Tampão fosfato						
		NMS	NMS 1:30AG60°C	NMS 1:3060°C	PZQ	PZQ 1:30AG60°C	PZQ 1:5AG90°C
Baker e Lonsdale	r ²	0,9870	0,8135	0,5841	0,8854	Não converge	Não converge
	K	0,0036	0,00009	0,00009	0,0052		
Hixon and Crowell	r ²	0,8210	0,1307	Não converge	Não converge	Não converge	Não converge
	K	0,0096	0,0005				
Higuchi	r ²	0,8815	0,7779	0,4951	Não converge	Não converge	Não converge
	K	10,0349	2,1624	2,1521			
Primeira Ordem	r ²	0,9069	0,1976	Não converge	0,9371	Não converge	Não converge
	K	0,0348	0,0017		0,0652		
Korsmeyer-Peppas	r ²	0,9637	0,8810	0,9131	Não converge	0,9084	0,9444
	K	14,9058	5,0147	7,6224		13,7831	25,2459
	N	0,4202	0,3423	0,2619		0,1652	0,16126
Weibull	r ²	0,9980	0,9244	0,9439	0,9980	0,9892	0,9858
	B	1,824	2,287	60,2757	1,933	35,1720	27,3044

Tabela 25: Coeficiente de liberação *in vitro* dos fármacos nos complexos de inclusão em tampão fosfato com pancreatina

Modelos de Liberação	Tampão fosfato com pancreatina						
		NMS	NMS 1:30AG60°C	NMS 1:3060°C	PZQ	PZQ 1:30AG60°C	PZQ 1:5AG90°C
Baker e Lonsdale	r ²	0,9410	0,8396	0,8914	0,7164	0,9751	0,6219
	K	0,0033	0,0040	0,0040	0,0052	0,0015	0,0042
Hixon and Crowell	r ²	0,9828	0,6036	0,4870	Não converge	0,8265	Não converge
	K	0,0099	0,0066	0,0065		0,0046	
Higuchi	r ²	0,9041	0,3497	0,2132	Não converge	0,9323	Não converge
	K	10,2805	8,4133	8,3721		6,8944	
Primeira Ordem	r ²	0,9914	0,9286	0,9900	0,5331	0,8883	0,9029
	K	0,0352	0,0411	0,0447	0,0650	0,0167	0,0667
Peppas	r ²	0,9850	Não converge	Não converge	Não converge	0,9665	Não converge
	K	5,6964				15,5144	
	N	0,7203				0,3003	
Weibull	r ²	0,9992	Não converge	Não converge	0,9999	0,9937	Não converge
	B	106046,816			11,8689	377130,175	

A partir dos valores do coeficiente de correlação ajustado (r^2 ajustado), exibidos nas Tabelas 23 e 24, o modelo matemático que apresentou melhor correlação com os perfis de liberação nos meios simulados sem enzima foi o de Weibull.

O valor do expoente b da equação de Weibull é um indicativo do mecanismo de liberação dos fármacos através do polímero (PAPADOPOULOU et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2009).

Valores de b menores que 0,75 indicam difusão segundo Fick. Para valores de b entre 0,75 e 1 estão associados dois mecanismos, a difusão Fickiana e o transporte caso II (através do intumescimento), e para valores maiores que 1, a liberação do fármaco é provocada por um mecanismo complexo de liberação, onde vários processos, como

difusão, intumescimento e erosão (degradação), podem ocorrer simultaneamente (PAPADOPOULOU et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2009).

No modelo de Weibull, os valores de b para todos os complexos foram maiores que 1, indicando que a liberação dos fármacos complexados ocorre através de mecanismos complexos de liberação.

Em tampão fosfato com pancreatina apenas o complexo PZQ 1:30AG60°C seguiu o modelo de Weibull, e a liberação do PZQ foi através de um mecanismo complexo de liberação do fármaco ($b > 1$), confirmando a presença de estruturas mais cristalinas que confere a esse complexo uma maior resistência enzimática, e dessa forma, a liberação do PZQ é controlada por mecanismos complexos de liberação, como a difusão do PZQ através de zonas intumescidas da alta amilose e simultaneamente a erosão do complexo resultante da digestão enzimática.

Para os complexos NMS 1:30AG60°C, NMS 1:3060°C e PZQ 1:5AG90°C, o modelo matemático de Primeira Ordem foi o que melhor caracterizou os perfis de liberação dos fármacos (Tabela 25). O modelo matemático de Primeira Ordem indica que a liberação dos fármacos a partir dos complexos foi diretamente proporcional a sua concentração, por unidade de tempo, de modo que nos 60 minutos de experimento houve um “burst” liberando quase 100% dos fármacos (MULYE, TURCO, 1995; COSTA, LOBO, 2001; MANADAS et al., 2002; BALCERZAK, MUCHA, 2013)

Para estes complexos a ruptura da ligação polímero-fármaco permitiu a rápida liberação dos fármacos. Esse comportamento confirma a presença de estruturas com menor grau de cristalinidade, como a amilose do tipo I, tornando esses complexos com menor resistência enzimática.

6.0 CONCLUSÕES

A metodologia empregada neste trabalho para o desenvolvimento de complexos de inclusão de diferentes fármacos (NMS e PZQ) com a amilose foi eficiente, pois permitiu a formação dos complexos de inclusão, com elevados rendimento e teor de fármaco complexado.

A caracterização dos complexos por diferentes técnicas (DSC, DRX, RMN e capacidade de absorção de líquidos) evidenciaram a interação entre os fármacos e o polímero, bem como a formação de estruturas semicristalinas, relacionadas à complexos tipo V, com elevada resistência enzimática.

Os perfis de liberação *in vitro* demonstraram que os complexos preparados na proporção 1:30 permitiram a redução das taxas de liberação dos fármacos, de modo que aproximadamente 30% foi liberado nos meios ácido e tampão fosfato sem enzima e, em tampão fosfato, a liberação foi prolongada por até 360min. Na presença da enzima pancreatina, a total liberação dos fármacos a partir dos complexos PZQ 1:5AG90°, NMS 1:30AG60°C e NMS 1:30 60°C ocorreu em 60min, enquanto para o complexo PZQ 1:30 AG60°C esse tempo foi de 240min.

O modelo matemático que apresentou melhor correlação com os perfis de liberação em meio ácido e tampão fosfato sem enzima foi o de Weibull, indicando que a liberação dos fármacos ocorreu através de mecanismo complexo, no qual vários processos estão envolvidos, tais como a difusão, intumescimento e erosão dos complexos. Com a adição de pancreatina, apenas o complexo PZQ 1:30 AG 60°C seguiu o modelo de Weibull, enquanto os demais complexos seguiram o modelo de Primeira Ordem, evidenciando a aceleração das taxas de liberação dos fármacos causada pela erosão do polímero devido a degradação enzimática.

O conjunto de resultados demonstrou que os complexos de inclusão com amilose foram obtidos a partir de uma técnica simples e de baixo custo. Os perfis de liberação *in vitro* dos fármacos evidenciaram que esses complexos representam sistemas promissores para se alcançar a vetorização da liberação de fármaco para o intestino, uma vez que a liberação foi significativamente influenciada pela digestão enzimática dos complexos pela enzima pancreatina.

7.0 REFERÊNCIAS⁴

AHMADI-ABHARI, S.; WOORTMAN, A. J.J.; HAMER, R. J.; LOOS, K. Assessment of the influence of amylose-LPC complexation on the extent of wheat starch digestibility by size-exclusion chromatography. **Food Chem.**, v.141, p.4318-4323, 2013

AIGNER, Z., BERKESI, O., FARKAS, G., SZABÓ-RÉVÉSZ, P. DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex produced by co-grinding. **J. Pharm. Biomed.**, v.57, p.62-67, 2012.

AL-MARZOUQI, A.H.; ELWY, H.M.; SHEHADI, I.; ADEM, A. Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.49, p.227-233, 2009.

AL-MARZOUQI, A.H.; JOBE, B.; DOWAIDAR, A.; MAESTRELLI, F.; MURA, P. Evaluation of supercritical fluid technology as preparative technique of benzocaine-cyclodextrin complexes-Comparison with conventional methods. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.43, p.566-574, 2007.

AMIDON, G. L., LENNERNAS, H., SHAH, V. P., CRISON, J. R. A theoretical basic for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica: formas Farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, 2000. 568p.

ASHFORD, M. Biodisponibilidade - fatores físico-químicos e relacionados à forma farmacêutica. In: AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.17, p.245-263

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2^oed. Porto Alegre. Artmed, 2005.

BAJPAI, A.K.; SHUKLA, S.K.; BHANU, S.; KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n.11, p.1088-1118, 2008.

BALCERZAK, J.; MUCHA M. Analysis of model drug release kinetics from complex matrices of polylactide-chitosan. Analysis of model drug release kinetics from complex matrices of polylactide-chitosan. **Prog. Chem. Appl. Chit. and Its Deriv.** v. 15, p.117-126, 2010.

BARBER, T. A. **Pharmaceutical particulate matter: analysis and control**. Buffalo Grove: Interpharm, 1993. p.127-128, 267-298.

⁴ Segundo Norma ABNT 6023/2002

BECKER, A., HILL, S. E.; MITCHELL, J. R. Relevance of amylose–lipid complex to the behavior of thermally processed starches. **Starch/ Starke**, v.53, p.121–130, 2001.

BERTOLINI, A. C.; CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. Fécula e farelo de mandioca como substrato na produção de ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.18, n.2, p.224-229, 1998

BELLO-PÉREZ, L.A., MONTEALVO, M.G.M.; ACEVEDO, E.A. Almidón: definición, estructura y propiedades. In LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carboidratos em alimentos regionales iberoamericanos**. São Paulo: Edusp, 2006. Cap.1, p.17-46.

BERTOLINI, A.C.; CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. Fécula e farelo de mandioca como substrato na produção de ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.18, n.2, p.224-229, 1998.

BHOSALE, R. G.; ZIEGLER, G. R. Preparation of spherulites from amylose–palmitic acid complexes. **Carbohydr. Polym**, v.80, p.53-64, 2010.

BIAIS, B., LE BAIL, P.; ROBERT, P.; PONTOIRE, B.; BULEON, A. Structural and stoichiometric studies of complexes between aroma compounds and amylose. Polymorphic transitions and quantification in amorphous and crystalline areas. **Carbohydr. Polym.**, v. 66, n. 3, p. 306–315, 2006.

BIGUCCI, F.; LUPPI, B.; CERCHIARA, T.; SORRENTI, M.; BETTINETTI, G.; RODRIGUES, L.; ZECCHI, V. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.35, p.435-441, 2008.

BILLMEYER Jr, F.W.; **Textbook of polymer Science**, 3rd.ed, New York: John Wiley & Sons, 1984.

BOLTON, E.E., CHEN, J., KIM, S., HAN, L., HE, S., SHI, W., SIMONYAN, V., SUN, Y., THIESSEN, P.A., WANG, J., YU, B., ZHANG, J., BRYANT, S.H. PubChem3D: a new resource for scientists. **J. Cheminform.**, v.32, 2011

BRAGA, S.S.; RIBEIRO-CLARO, P.; PILLINGER, M.; GONÇALVES, I.S.; PEREIRA, F.; FERNANDES, A. C.; ROMÃO, C.C.; CORREIA, P.B.; TEIXEIRA-DIAS, J.J.C. Encapsulation of sodium nimesulide and precursors in β -cyclodextrin. **Org. Biomol. Chem.**, v.1, p.873-878, 2003

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em Dezembro de 2010.

BREWSTER, M. E.; LOFTOSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv. Drug. Del. Rev.** V.59, p.645-666, 2007.

BRITISH PHARMACOPEIA 2003. London: The Stationery Office, 2003.

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

BRUNTON, L. L; LAZO, J. S; PARKER, K. L. Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2006.

CALLISTER Jr., W. D. Ciência e Engenharia de Materiais: Uma introdução. 7ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

CANEVAROLO Jr. S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**, São Paulo: Artliber, 2004.

CAO, F; GUO, J; PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, v.31, n.8, p.747-756, 2005.

CARBINATTO, F.M.; CASTRO, A.D.; CURY, B.S.F.; MAGALHÃES, A.; EVANGELISTA, R.C. Physical properties of pectin–high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **Int. J. Pharm.** v. 423, n.2, p.281– 288, 2012.

CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A.D.; EVANGELISTA, R. C.; CURY, B. S. F. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. **Asian J. Pharm. Sci.**, 2014, doi:10.1016/j.ajps.2013.12.002.

CARBINATTO, F.M. **Matrizes poliméricas reticuladas de alta amilose e pectina para liberação controlada de fármacos**. 2010. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2010.

CARDOSO, M. B.; PUTAUX, J. L.; NISHIYAMA, Y.; HELBERT, W.; HYTCH, M.; SILVEIRA, N. P.; CHANZY, H. Single crystals of V-amylose complexed with R-naphthol. **Biomacromol.**, v.8, p.1319-1326, 2007.

CASTONUOVO, G.; ELIA, V.; VELLECA, F.; VISCARDI, G. Thermodynamics of the interaction of α -cyclodextrin with α , ω dicarboxylic acids in aqueous solutions. A calorimetric study at 25°C. **Thermochimica Acta.**, v.292, p.31-37, 1997.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. **Tecnologia, uso e potencialidade de tuberosas latino-americanas**. 2003, p.475-498. (Ciclodextrina: características e aplicações, v.3).

CHEBLI, C.;CARTILIER, L.; HARTMAN, N. G. Substituted amylose as a matrix for sustained-drug release:a biodegradation study. **Int. J. Pharm.**, v.122, p.183-189, 2001.

CHEETHAM, N.W.H.; TAO, L. Variation in crystalline type with amylase content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. **Carbohydr. Polym.**, v.36, p.277-284, 1998.

- CHEMSPIDER. Search and Share Chemistry. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>> Acesso em: 05 dez.2013.
- CHENG, L.; LEI, L., GOU, S. In vitro and in vivo evaluation of praziquantel loaded implants based on PEG/PCL blends. **Int. J. Pharm.**, v.387, p.129-138, 2010.
- CHUNG, H.J.; LIM, H.S.; LIM, S.T. Effect of partial gelatinization and retrogradation on the enzymatic digestion of waxy rice starch. **J. Cereal Sci.**, v. 43, n.3, p. 353-359, 2006.
- CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 10, p. 418-422, 1998.
- COHEN, R.; ORLOVA, Y.; KOVALEV, M.; UNGAR, Y.; SHIMONI, E. Structural and Functional Properties of Amylose Complexes with Genistein. **J. Agric. Food Chem.** v.56, p.4212-4218, 2008.
- CONDE-PETIT, B.; ESCHER, F.; NUESLI, J. Structural features of starch flavor complexation in food model systems. **Trends Food Sci. Technol.**, v.17, n.5, p.227-235, 2006.
- CONNORS, K. A. Measurement of Cyclodextrin complex stability constants. In: **Comprehensive Supramolecular Chemistry (Part II)** v.3, 205-241, 1996.
- CONNORS, K. A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. **Chem. Rev.**, v.97, p.1325-1357, 1997.
- COSTA, P.J.C. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, vol. 38, n.2, p. 141-153, 2002.
- COSTA, P., LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 13, p. 123-133, 2001.
- CROWDER, T. M. **A Guide to Pharmaceutical Science**, behavior of particles. Boca Raton: CRC Press LLC, 2003, p.1-45.
- CULLITY, B.D. Elements of X-Ray Diffraction. Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, 1956.
- CUI, R., OATES, C.G. The effect of retrogradation on enzyme susceptibility of sago starch. **Carbohydr. Polym.**, v.32, n.1, p.65-72, 1997.
- CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.1-9, 2007
- CURY, B. S. F.; CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: Physical parameters, cross-linking degrees and drug delivery relationships. **Int. J. Pharm.** v. 371, n. 1-2, p. 8-15, 2009.

CURY, B. S. F.; KLEIN, S.I.; EVANGELISTA, R.C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 1: synthesis and polymer characterization. **React. Funct. Polym.**, v.68, p.1200-1206, 2008.

CURY, B.S.F., **Reticulação da Alta Amilose: Processo de Obtenção, Caracterização e Avaliação do Desempenho em Sistemas de Liberação Prolongada de Fármacos.** 2005. 124f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista –Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2005.

DAHL, T. C.; SUE, I-L., T.; YUM, A. The effect of pancreatin on the dissolution performance of gelatin-coated tablets exposed to high-humidity conditions. **Pharm. Res.**, v.8, n.3, p.412-414, 1991.

DA SILVA, L. R.; VOLPATO, N. M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 38, n. 2, p.163-172, 2002.

DEBET, M. R. GIDLEY, M.J. Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. **Carbohydr. Polym.**, v. 64, p.452-465, 2006

DENARDIN, C. C.; DA SILVA, L.P. Starch granules structure and its regards with physicochemical properties. **Ciências Rural Santa Maria**, v.39, n.3, p.945-954, 2009.

DJEDAINI, F.; PERLY, B. Nuclear Magnetic Resonance of cyclodextrins, derivatives and inclusion compounds. In: **New Trends in Cyclodextrins and Derivatives.** Paris: Ed. Santé, p.215-246, 1991.

EERLINGEN, R. C., CILLEN, G., DELCOUR, J. A. Enzyme-resistant starch. IV. Effect of endogenous lipids and added sodium dodecyl sulfate on formation of resistant starch. **Cereal Chemistry**, v.71, p.170-177, 1994.

EFENTAKIS, M.; KOUTLIS, A. Release of Furosemide from Multiple-Unit and Single-Unit Preparations Containing Different Viscosity Grades of Sodium Alginate. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.6, n.1, p.91-98, 2001.

ELIASSON A. C. **Starch-Lipid Interactions and Their Relevance in Food Products;** **Woodhead:** New York, 2004; p. 441-460.

ENSIGN, L.M. CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.557-570, 2012.

EVANGELISTA, R. C. Formas farmaceuticas solidas de liberacao controlada (prolongada). **Fármacos & Medicamentos**, n. 02, p.14-22, 2000.

FAHMY, H. M.; FOUUDA, M. M. G. Crosslinking of alginic acid/chitosan matrices using polycarboxylic acids and their utilization for sodium diclofenac release. **Carbohydr. Polym.**, v.73, n.4, p. 606–611, 2008.

FALLAVENA, P. R. **Estudos da constante de dissociação e da estabilidade térmica e fotoquímica da nimesulida**, 1998. 112p., Tese (Doutorado em Farmácia)- Curso de Pós Graduação Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.

FALLAVENA, P. R.; SCHAPOVAL, E. E. S. pKa determination of nimesulide in methanol – water mixtures by potentiometric titrations. **Int. J. Pharm.**, v. 158, p. 109-112, 1997.

FANTA, G. F.; FELKER, F. C.; SHOGREN, R. L. Formation of crystalline aggregates in slowly-cooled starch solutions prepared by steam jet cooking. **Carbohydrate Polymers**, v.48, p161–170, 2002

FANTA, G. F.; KENAR, J. A.; BYARS, J. A., FELKER, F. C.; SHOGREM, R. L. Properties of aqueous dispersions of amylose–sodium palmitate complexes prepared by steam jet cooking. **Carbohydr. Polym.** , v.81, p.645-651, 2010.

FANTA, G. F., SHOGREN, R. L., SALCH, J. H. Steam jet cooking of high-amylose starch–fatty acid mixtures. An investigation of complex formation. **Carbohydr. Polym.**, v.38, p.1–6, 1999.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 2010.

FASANO, A. Innovative strategies for the oral delivery of drugs and peptides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 152-157, 1998.

FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D.; BERGQUIST, N. R.; TODD, M. H. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 509-515, 2003.

FERNANDES, A.; IVANOVA, G.; BRÁS, N. F.; MATEUS, N.; RAMOS, M. J.; RANGEL, M.; DE FREITAS, V. Structural characterization of inclusion complexes between cyanidin-3-*O*-glucoside and β -cyclodextrin. **Carbohydr. Polym.**, v.102, p.269-277, 2014.

FLEGLER, S. L.; HECKMAN, J. W. Jr.; KLOMPARENS, K. L. **Scanning and Transmission electron microscopy an Introduction**, New York: Oxford University Press, 1993.

FRANZINI, C. M. Complexos de inclusão de anfotericina B com derivados de ciclodextrinas e sua incorporação em microemulsões lipídicas biocompatíveis. 2010. 154f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista –Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2010.

FREIRE, A. C.; PODCZECK, F.; VEIGA, F.; SOUSA, J. Starch-based coatings for colon-specific delivery. Part II: Physicochemical properties and in vitro drug release from high amylose maize starch films. **Eur. J. Pharm. Biopharma.**, v. 72, p. 587-594, 2009.

FREZZA, T. F.; MADI, R. R.; BANIN, T. M.; PINTO, M. C.; SOUZA, A. L. R.; GREMIÃO, M. P. D.; ALLEGRETTI, S. M. Efeito do praziquantel incorporado a

lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.2, p.209-214, 2007

FRÖMMING K.H., SZEJTLI J. **Topics in inclusion science - cyclodextrins in pharmacy**, 1st ed, Hungria, Kluwer Academic Publishers, 1994, 59p.

FRIEND, D. R. Drug Delivery to the Small Intestine. **Current Gastroenterology Reports**, v.6, p.371-376, 2004

GALLOWAY, G.I.; BILIADERIS, C.G.; STANLEY, D. W. Properties and structure of amylose-glyceryl monostearate complexes formed in solution or on extrusion of wheat-flour. **J. Food Sci.**, v.54, p.950-957, 1989.

GEHRKE, S. H.; LEE, P. I. Hidrogels for drug delivery systems. In: TYLE, P. *Specialized drug Delivery Systems. Manufacturing and production technology*. New York: Marcel Dekker, 1990, p. 333-392. (Drug and the Pharmaceutical Science, v. 41).

GIDLEY, M.J.; BOCIEK, S.M. ¹³C CP/MAS NMR-studies of amylase inclusion complexes, cyclodextrins, and the amorphous phase of starch granules. Relationships between glycosidic linkage conformation and solid-state c-13 chemical shifts. **J. Am. Chem. Soc.**, v.110, p.3820-3829, 1988

GINANI, M. F; NAVARRO, M. V; NASCIMENTO, E. G; OLIVEIRA, U.O.B. Estudo da influencia da natureza de reticulantes e aditivos orgânicos sobre o comportamento de geis de quitosana. **Quimica Nova**. v.22, p.801-804,1999.

GIORDANO, F., NOVAK C., MOYANO J.R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochim. Acta**, v.380, n.2, p.123-151, 2001.

GODET, M.C., BIZOT, H., BULEON, A. Crystallization of amylose e fatty acid complexes prepared with different amylose chain lengths. **Carbohydr. Polym.**, v. 27, p. 47-52, 1995.

GODET, M.C.; BOUCHET, B.; COLONNA, P.; GALLANT, D.J.; BULÉON, A. Crystalline amylose fatty acid complexes: morphology and crystal thickness. **J. Food Sci.**, v.61, p.1196-1201, 1996.

GOLDSTEIN, J., **Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis**. 3^a ed.; Kluwer Academic/Plenum: New York, 2003.

GOODMAN, L.; GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ed. São Paulo: Editora Mc Graw Hill, 1436p.,2007.

GORNAS, P.; NEUNERT, G.Z.; SKI, K.B. Beta cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modeling study. **Food Chem.**, v.114, p.190-196, 2009.

GOTLIEB, K.F.; CAPELLE, A. **Starch derivatization-Fascinating and unique industrial opportunities**, Wageningen Academic Publishers, 2005, 160p.

- GREENBERG, R. M. Are Ca^{2+} channels targets of praziquantel action? **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1-9, 2005.
- GREGORIADIS, G. Targeting of drugs: implications in medicine. **The Lancet**, v. 318, n. 8240, p. 241-247, 1981.
- GUDMUNDSSON, M., ELIASSON, A. C. Retrogradation of amylopectin and the effects of amylose and added surfactant/emulsifiers. **Carbohydr. Polym.**, v.13, p.295-315, 1990.
- GUNARATNE, A.; CORKE, H. Influence of unmodified and modified cycloheptaamylose (β -cyclodextrin) on transition parameters of amylose–lipid complex and functional properties of starch. **Carbohydr. Polym.**, v.68, p.226–234, 2007
- HAAN, P.; LERK, C. F. Oral controlled release dosage forms. A review. **Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition**, v. 6, n. 2, p. 57-67, 1984/04/01 1984.
- HARADA, A.; LI, J.; KAMACHI, M. Preparation and Properties of Inclusion Complexes of Poly(ethyleneglycol) with α -Cyclodextrin. **Macromolecules.**, v.26, p. 5698-570, 1993.
- HEINEMANN, C., ZINSLI, M., RENGGLI, A., ESCHER, F., CONDE-PETIT, W. Influence of amylose-flavor complexation on build-up and breakdown of starch structures in aqueous food model systems. **Food Sci. Technol.**, v.38, p.885-894, 2005.
- HELBERT, W.; CHANZY, H. Single-crystals of V-amylose complexed with *n*-butanol or *n*-pentanolstructural features and properties. **Int. J. Biol. Macromol.** v.16, n.4, p.207-213, 1994.
- HUSSEIN, I., EL-SUBBAGH A., AL-BADR A. **Praziquantel.**, Copyright by Academic Press, Inc.v.25, 1998, P.463-500
- IMMEL, S.; LICHTENTHALER, F., W. The hydrophobic topographies of amylose and its blue iodine complex. **Starch-Stärke**, v. 52, p. 1–8, 2000.
- ISHA, C.; NIMRATA, S.; RANA, A. C.; SURBHI, G. Oral sustained release drug delivery system: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 57-62, 2012.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) Harmonised Tripartite Guideline: **Validation of analytical procedures: methodology.** 1996, p.1-8.
- JACOBS, H., DELCOUR, J. A. Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2895-2905, 1998.
- JACOBS, H., MISCHENKO, N., KOCH, M. H. J., EERLINGEN, R. C., DELCOUR, J. A., REYNAERS, H. Evaluation of the impact of annealing on gelatinization at intermediate water content of wheat and potato starches: a differential scanning

calorimetry and small angle X-ray scattering study. **Carbohydr. Res.**, v. 306, p.1-10, 1998.

JAMBHEKAR, S. S. Physicochemical and Biopharmaceutical Properties of Drug Substances and Pharmacokinetics. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A., et al (Ed.). **Foye's Principles of Medicinal Chemistry** 7.ed., 2013. cap. 3, p.61-105.

JANE, J. L.; ROBYT, J. F. Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of α -amylases, and a new method for preparing amylopectins. **Carbohydr. Res.**, v.132, p.105-118, 1984.

JESUS, M. B.; PINTO, L. M. A.; FRACETO, L. F.; TAKAHATA, Y.; LINO, A. C. S.; JAIME, C.; PAULA, E. Theoretical and experimental study of a praziquantel and β -cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and ^1H -nuclear magnetic resonance. **J. Pharm. Biomedical Analysis**, v.41, p. 1428–1432, 2006.

JESUS, M.B. **Preparação, caracterização e avaliação da formulação anti-helmíntica de praziquantel em beta-ciclodextrina**. 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Instituto de Biologia) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

JOUQUAND, C.; DUCRUET, V.; LE BALI, P. Formation of amylose complexes with C6-aroma compounds in starch dispersions and its impact on retention. **Food Chem.**, v.96, n.3, p.461-470, 2006.

KARKALAS, J., MA, S., MORRISON, W., PETHRICK, R. A. Some factors determining the thermal properties of amylose inclusion complexes with fatty acids. **Carbohydr. Res.**, v.268, p.233–247, 2005.

KAWAI, K., TAKATO, S., SASAKI, T., KAJIWARA, K. Complex formation, thermal properties, and in-vitro digestibility of gelatinized potato starch fatty acid mixtures. **Food Hydrocolloid.**, v.27, p.228-234, 2012.

KHARE, A.R., PEPPAS, N.A.. Swelling/deswelling of anionic copolymer gels. **Biomaterials**, v.16, 559–567, 1995.

KIBAR, E.A.A.; GONENÇ, J.; US, F. Gelatinization of waxy, normal and high amylose corn starches. **Gida**, v.35, n.4, p.237-244, 2010.

KIM, J-Y.; SEO, T-R.; LIM, S. T. Preparation of aqueous dispersion of β -carotene nano-composites through complex formation with starch dextrin. **Food Hydrocol.**, v.33, p.256-263, 2013.

KIM, S.; KIM, J.; JEON, O.; KWON, I.C.; PARK, K. Engineered polymers for advanced drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.71, p.420-430, 2009.

KONG, Y.; HAY J.N. The enthalpy of fusion and degree of crystallinity of polymers as measured by DSC. **Eur. Polym. J.**, v.39, p. 1721–172, 2003

KONG, L.; ZIEGLER, G. R. Formation of starch-guest inclusion complexes in electrospun starch fibers. **Food Hydrocolloid.** v.38, p.211-219, 2014.

- KUBIK, S., WULFF, G. Characterization and chemical modification of amylose complexes. **Starch-Stärke**, v.45, p. 220–225, 1993.
- KUMAR, M. N. V. R.; DOMB, A. J. Controlled drug delivery. In: WNEK, G. E.; BOWLIN, G. L., (Eds.). **Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering**. New York: Marcel Dekker, 2004. v.1, p.467-477.
- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANING, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste, 2001. p.1517.
- LALUSH, I.; BAR, H.; ZAKARIA, I.; EICHLER, S.; SHIMONI, E. Utilization of amylose-lipid complexes as molecular nanocapsules for conjugated linoleic acid. **Biomacromol.**, v.6, n.1, p.121-130, 2005.
- LAY MA, U. V.; FLOROS, J. D.; ZIEGLER, G. R. Formation of inclusion complexes of starch with fatty acid esters of bioactive compounds. **Carbohydr. Polym.**, v.83, n.4, p.1869-1878, 2011.
- LE BAIL, P.; MORIN, F. G.; MARCHESSAULT, R. H. Characterization of a crosslinked high amylose starch excipient. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 26, n. 2-3, p. 193-200, 1999.
- LE BAIL, P.; BULEON, A.; SHIFTAN, D.; MARCHESSAULT, R.H. Mobility of lipid in complexes of amylase-fatty acids by deuterium and ^{13}C state NMR. **Carbhyd. Polym.**, v.43, p.317-326, 2000.
- LE BAIL, P., RONDEAU, C., BULEON, A. Structural investigation of amylose complexes with small ligands: Helical conformation, crystalline structure and thermostability. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.35,p.1–7., 2005
- LESMES, U.; BARCHECHATH, J.; SHIMONI, E. Continuous dual feed homogenization for the production of starch inclusion complexes for controlled release of nutrients. **Inn. Food Sci. Emerg. Technol.**, v.9, p.507-515, 2008.
- LESMES, U.; COHEN, S. H.; SHENER, Y.; SHIMONI, E. Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. **Food Hydrocolloid.**, v.23, p.667-675, 2009.
- LIMA, A. C. **Preparação de dispersões sólidas de praziquantel com polivinilpirrolidona pelo processo do fluido supercrítico**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- LAM, P.L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. **J. Control. Rel.**, v.178, p.25-45, 2014.
- LIU, L.; FISHMAN, M. L.; KOST, J.; HICKS, K. B. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3333-3343, 2003.

- LIU, Y., WANG, X., WANG, J-K, CHING, C.B. Structural Characterization and Enantioseparation of the Chiral Compound Praziquante. **J. Pharm. Sci.**, v. 93, n°12, p.3039-3046, 2004.
- LOPES, C. M.; LOBO J. M. S.; COSTA P.; Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.41, n.2, p.143-154, 2005.
- LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.31, n.2, p.117-124, 2010.
- LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO M. T.; LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. S.; ROLIM-NETO, P. J.; Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin Am. J. Pharm.**, v.26, p.784-793, 2007.
- LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de polímeros: Determinação de peso molecular e análise térmica.** Rio de Janeiro: e-papers, 366p., 2001
- MAITI, S.; RANJIT, S.; MONDOL, R.; RAY, S.; SA, B. Al³⁺ ion cross-linked and acetalated gellan hydrogel network beads for prolonged release of glipizide. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 164-172, 2011.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian J. Pharm. Sci**, v. 38, p. 375-400, 2002.
- MARTÍNEZ L, VILLALOBOS R, SÁNCHEZ M, CRUZ J, GANEM A, MELGOZA LM. Monte Carlo simulations for the study of drug release from cylindrical matrix systems with an inert nucleus. **Int J Pharm.**, v.369, p.38-46, 2009.
- MASUDA, H.; HIGASHITANI, K. YOSHIDA, H. Powder Technology Handbook, 3th, Boca Raton: CRC Press LLC, 2006, DOI: 10.1201/9781439831885.ch1.
- MATSUMOTO, J. Adverse effect of praziquantel treatment of *Schistosoma japonicum* infection: involvement of host anaphylactic reactions induced by parasite antigen release. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, p.461-471, 2002.
- MAZZARINO, L.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e caracterização farmacotécnica de formas farmacêuticas semi-sólidas contendo nimesulida. **Latin Am. J. Pharm.**, v. 26, n.3, p. 415-419, 2007.
- MENEGUIN, A.B; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydr. Polym.**, v.99, p.140-149, 2014.

- MENEGUIN, A.B. **Obtenção e caracterização de filmes de misturas de amido resistente e pectina como estratégia para liberação cólon específica de fármacos.** 2012.99 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista –Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2012.
- MEYER, E.; HUG, H. J.; BENNEWITZ, R. **Scanning probe microscopy.** Switzerland, 2004.
- MIKLI, V., KAERDI, H., KULU, P., BESTERCI, M. Characterization of powder particle morphology. *Proc. Estonian Acad. Sci. Eng.*, v. 7, p. 22-34, 2001.
- MILOJEVIC, S.; NEWTON, J. M.; CUMIMINGS, J. H.; GIBSON, G. R.; BOTHAM, R. L.; RING, S. G.; StOCKHAM, M.; ALLWOOD, C. Amylose as a coating for drug delivery to the colon: preparation and in vitro evaluation using 5-aminosalicylic acid pellets. *J. Controlled Release*, v.38, n.1, p.75-84, 1996.
- MORITA, R.; HONDA, R.; TAKAHASHI, Y. Development of oral controlled release preparation, a PVA swelling controlled release system (SCRS) I. Design of SCRS and its release controlling factor. *J. Control. Release*, v.63, p.297-304, 2000.
- MORRISON, W. R. Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. *Cereal Food World*, v.40, p.437-446, 1995.
- MOURÃO, S. C. **Preparação e caracterização de lipossomas contendo praziquantel.** 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.
- MUA, J.P., JACKSON, D.S. Fine structure of corn amylose and amylopectin fractions with various molecular weights. *J. Agric. Food Chem.*, v.45, p.3840–3847, 1997.
- MULHBACHER, J.; ISPAS-SZABO,P.; MATEESCU, M. A. Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release II. Swelling properties and mechanistic study. *Int. J. Pharm.*, v.278, p.231-238, 2004
- MULYE, N. V., TURCO, S. J. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dihydrate matrices. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v.21, p.943-953, 1995
- NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P.; ARAÚJO, H. C. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. *Quim. Nova*, v. 22, n. 1, p.5-10, 1999.
- O’CONNOR, R. E.; SCHWARTZ, J. B. Powder. In: GENNARO, A. R (Ed.). **Remington: The science and practice of pharmacy.** 20.ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 2000. Cap. 37, p. 685.
- PAIVA, R.E.F.;ABBEHAUSEN, C.; BERGAMINI, F.R.G • ANDRE L. THOMPSON ; ALVES, D.A.; LANCELLOTTI, M.;CORBI, P. P. Investigating the inclusion of the Ag(I)-nimesulide complex into β -cyclodextrin: studies in solution and in the solid state. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2013. DOI 10.1007/s10847-013-0348-4.

- PAPADOPOULOU, V., KOSMIDIS, K., VLACHOU, M., MACHERAS P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **Int. J. Pharm.** v.309, p.44–50, 2006.
- PAREKH, P.; SINGH, K.; MARANGONI, D. G.; BAHADUR, P. Micellization and solubilization of a model hydrophobic drug nimesulide in aqueous salt solutions of Tetronic® T904. **Colloid. Surface. B: Biointerface.**, v. 83, n.1, p.69-77, 2011
- PASSERINI, N.; ALBERTINI, B.; PERISSUTTI, B.; RODRIGUES, L. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. **Int. J. Pharm.**, v.318, p.92-102, 2006.
- PINTO, J.F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. **Int. J. Pharm.**, v.395, p.44-52, 2010.
- PREZOTTI, F. G.; MENEGUIN, A.B; EVANGELISTA, R. C.; CURY, B. S. F. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.38, n.11, p.1354-1359, 2012.
- PREZOTTI, F. G. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos.** 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.
- PUTSEYS, J. A.; LAMBERTS, L.; DELCOUR, J. A. Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. **J. Cereal Sci.**, v.51, p.238-247, 2010.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia. Agentes antiinflamatórios e imunossupressores.** 4 ed. Ed. Guanabara Koogan, 2000. p. 189-203.
- RAPPENECKER, G., ZUGENMAIER, P. Detailed refinement of the crystal structure of V_h-amylose. **Carbohydr. Res.**, v.89, p.11–19, 1981.
- RECIFE, A. C. D. **Amido retrogradado como excipiente de comprimidos para liberação controlada de fármacos: obtenção e caracterização.** 2013. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista –Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2013.
- RIBEIRO L, LOFTSSON T, FERREIRA D, VEIGA F. Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine-sulfobutyl ether β - cyclodextrin binary and ternary complexes. **Chem Pharm Bull.** v.51, p.914-922, 2003.

- RODRIGUES, P. O.; SILVA, M. A. S. Avaliação in vitro de medicamentos de liberação prolongada: aplicação de métodos estatísticos, modelos dependentes e independentes de análise. **Rev. Col. Cien. Quím. Farm.**, v. 34, n. 1, p. 13, 2005.
- RUTSCHMANN, M. A.; HEINIGER, J.; PLISKA, V.; SOLMS, J. Formation of inclusion complexes of starch with different organic-compounds. 1. Method of evaluation of binding profiles with menthone as an example. **Lebensm-Wiss. Technol.**, v.22, n.5, p.240-244, 1989.
- RYMDÉN, R., CARLFORS, J., STILBS, P. Substrate binding to cyclodextrins in aqueous solution: A multicomponent self-diffusion study. **Journal of inclusion phenomena**, v.1, n.2, p.159–167, 1983.
- SANTUS, G.; BAKER, R. W. Pharmaceuticals, Controlled Release of. In: EDITOR-INCHIEF: ROBERT, A. M. (Ed.). **Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)**. New York: Academic Press, 2003. p.791-803. ISBN 978-0-12-27410-7.
- SAJEESH, S.; SHARMA, C. P. Cyclodextrin–insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. **Int. J. Pharm.**, v.325 p.147-154, 2006.
- SALTÃO,R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.37, n.1, p.1-17, 2001
- SARKO, A., BILOSKI, A., Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. 10. Crystal-structure of the KOH-amylose complex. **Carbohydrate Research**, v.79,p. 11-21. 1980.
- SASAKI, T.; YASUI, T.; MATSUKI, J. Effect of amylose content on gelatinization, retrogradation and pasting properties of starch from waxy and non waxy wheat and their F1 seeds. **Cereal Chem.**, v.77, n.1, p.58-63, 2000.
- SENEVIRATNE, H. D.; BILIADERIS, C. G. Action of alpha-amylases on amylose-lipid complex superstructures. **J. Cereal Sci.**, v.13, p.129-143, 1991.
- SHOGREN, R. L.; FANTA, G. F.; FELKER, F. C. X-ray diffraction study of crystal transformations in spherulitic amylose/lipid complexes from jet-cooked starch. **Carbohydr. Polym.** v.64, n.3, p.444-451, 2006.
- SHUHUA, X.. Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to praziquantel and the artemisinins. **Acta Trop.**, v. 96, p. 153- 167, 2005.
- SIEPMANN, F., SIEPMANN, J., WALTHER, M., MACRAE, R.J., BODMEIER, R. Polymer blends for controlled release coatings. **J. Control. Rel.**, v. 125, p.1–15, 2008.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 7ed., LTC editora, Rio de Janeiro, 2006, 490p.

- SINGH, A., SINGH, P., KAPOOR, V.K. **Nimesulide. analytical profiles of drug substances and excipients**, v. 28. Academic Press, 2001, p.198-249
- SINGH, J., KAUR, L., MCCARTHY, O.J. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. **Food Hydrocolloid.**, v.21, p.1-22, 2007.
- SINGH, J., LELANE, C., STEWART, R.B., SINGH, H. Formation of starch spherulites: Role of amylose content and thermal events. **Food Chem.** V.121, p.980-989, 2010.
- SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B.S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry.** v.81, p.219-231, 2003.
- SINGH, S.; SHARDA, N.; MAHAJAN, L. Spectrophotometric determination of pKa of nimesulide. **Int. J. Pharm.**, v. 176, p. 261-264, 1999.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Principles of Instrumental Analysis.** 6th ed. Thomson Brooks/Cole. 2007, p.169-173.
- SNAPE, C.E.; MORRISON, W. R.; MAROTO-VALER, M. M.; KARKALAS, J.; PETHRICK, R. A. Solid state ¹³C NMR investigation of lipid ligands in V-amylose inclusion complexes. **Carbohydr. Polym.** v.36, p.225-237, 1998.
- SOARES, G. A.; CASTRO, A. D. D.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Blends of crosslinked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydr. Polym.**, v. 91, n. 1, p. 135-142, 2013.
- SOUTO-MAIOR, J. P.; REIS, A. V.; PEDREIRO, L. N.; CAVALCANTI, O. A. Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. **Polym. Int.**, n. 59, n.1, p. 127-135, 2010.
- STANIFORTH, J. N. Analise do tamanho de particula. In: AUTON, M. E., **Delineamento de formas farmacêuticas.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.163-176.
- SZCZODRAK, J., POMERANZ, Y. Starchelipid interactions and formation of resistant starch in high-amylose barley. **Cereal Chemistry**, v.69, p.626-632, 1992.
- SZEJTLI, J. Introduction and General overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews.** p.1743-1753, 1998.
- SZEJTLI J. Past, present, and future of cyclodextrin. **Pure Appl. Chem.**, v.76, n.10, p.1825-1845, 2004.
- TAKAHASHI, A. I. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas.** 2009. 99f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) Universidade de São Paulo, 2009.

- TAPANAPUNNITIKUL, O.; CHAISERI, S.; PETERSON, D. G.; THOMPSON, D. B. Water solubility of flavor compounds influences formation of flavor inclusion complexes from dispersed highamylose maize starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.1, p.220-226, 2008
- TESTER, R. F., DEBON, S. J. J. Annealing of starch e a review. **Int. J. Biological Macromolecules**, v.27 , p.1-12, 2000.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch - composition, fine structure and architecture. **J. Cereal Sci.**, v.39, p.151-165, 2004.
- THANING, J., STEVENSSON, B., OSTERVALL, J., NAIDOO, K. J., WIDMALM, G., MALINIAK, A. NMR studies of molecular conformations in -cyclodextrin. **Journal of Physical Chemistry B**, v.112, n.29, p.8434–8436, 2008
- THE MERCK INDEX. An Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals.10th.ed. New Jersey: Merck & Co, 1983.
- THE MERCK INDEX. 13th.ed. New Jersey: Merck & Co, p. 1174, 2001.
- TORCHILIN, V. P. Drug targeting. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 11, Supplement 2, n. 0, p. S81-S91, 2000.
- TOZUKA, Y.; TAKESHITA, A.; NAGAE, A.; WONGMEKIAT, A.; MORIBE, K.; OGUCHI, T.; YAMAMOTO, K. Specific inclusion mode of guest compounds in the amylose complex analyzed by solid state NMR spectroscopy. **Chem. Pharm. Bull.**, v.54, p.1097-1101, 2006.
- TUFVESSON, F., SKRABANJA, V., BJÖRCK, I., ELMSTÅHL, H. L., ELIASSON, A. C. Digestibility of starch systems containing amyloseglycerol monopalmitin complexes. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.34, p.131-139, 2001.
- TUFVESSON, F.; WAHLGREN, M.; ELIASSON, A-C. Formation of Amylose-Lipid Complexes and Effects of Temperature Treatment. Part 1. Monoglycerides **Starch/Stärke**, v. 55, p.61-71, 2003a.
- TUFVESSON, F.; WAHLGREN, M.; ELIASSON, A-C. Formation of Amylose-Lipid Complexes and Effects of Temperature Treatment. Part 2. Fatty Acids. **Starch/Stärke**, v. 55, p.138-149, 2003b.
- UCHINO, T.; TOZUKA, Y.; OGUCHI, T.; YAMAMOTO, K. Inclusion compound formation of amylose by sealed-heating with salicylic acid analogues. **J. Inclusion Phenomena Macrocycl. Chem.**, v.43, n.1-2, p.31-36, 2002.
- UCHINO, T.; TOZUKA, Y.; OGUCHI, T.; YAMAMOTO, K. The change of the structure of amylose during the inclusion of 2-naphthol in sealed-heating process. **J. Incl. Phenom.**, v.39, n.1-2, p.145-149, 2001.
- UHRICH, K. E.; CANNIZZARO, S. M.; LANGER, R. S.; SHAKESHEFF, K. M. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. **Chem. Rev.**, v.99, p.3181-3198, 1999.

UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (USP) 34th **Chapter <1225>Validation of compendial procedures**, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP), 29th ed. Rockville: United State Pharmacopeial Convention, 2006, p.1783.

VANDEPUTTE, G.E.; DELCOUR, J.A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. **Carbohydr. Polym.**, v.58, p.245-266, 2004.

VENTURINI, G.C. et al. Propriedades e Aplicações Recentes das Ciclodextrinas. **Quím. Nova.**, v.31, n.2, p. 360-368, 2008.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie: für Studium und Beruf**. 9 ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 2000.

WAGNER, M. **Thermal Analysis in Practice**. Schwerzenbach, Suíça: Mettler Toledo Collected Applications, 327p, 2009.

WEY, C.; XU, B.; QIN, F.; YU, H.; CHEN, C.; MENG, X.; ZHU, L.; WANG, Y.; GU, M.; LIU Q. C-type starch from high-amylose rice resistant starch granules modified by antisense RNA inhibition of starch branching enzymers. **J. Agric. Food Chem.**, p.1383-7388, 2010.

WHISTLER, R.L., BEMILLER, J.N., PASCHALL, E.F. **Starch chemistry and technology**. 2.ed. Florida : Academic Press, 1984. p. 143-149.

WILSON P. J.; BASIT, A.W. Exploiting gastrointestinal bacteria to target drugs to the colon: an in vitro study using amylose coated tablets. **Int. J. Pharm.**, v.300, p.89-94, 2005.

XU, J.; ZHAO , W.; NING, Y.;BASHARI, M.; WU, F.;CHEN, H.;YANG, N.; JIN, Z.; XU, B.; ZHANG, L.; XU, X. Improved stability and controlled release of ω 3/ ω 6 polyunsaturated fatty acids by spring dextrin encapsulation. **Carbohydr. Polym.**, v.92, p.1633-1640, 2013.

YANG, Y.; GU, Z.; ZHANG, G. Delivery of Bioactive Conjugated Linoleic Acid with Self-Assembled Amylose-CLA Complex. **J. Agric. Food Chem**, v.57, p.7125-7130, 2009.

YOO, S. H.; JANE, J. L. Molecular weights and gyration radii of amylopectin determined by high-performance size exclusion chromatography equipped with multi-angle-laser-light-scattering and refractive index detectors. **Carbohydr. Polym.**, v.49, p.307–314, 2002

YU, S. H.; MI, F. L.; WU, Y. B.; PENG, C. K.; SHYU, S. S.; HUANG, R. N. Antibacterial activity of chitosan-alginate sponges incorporating silver sulfadiazine: Effect of ladder-loop transition of interpolyelectrolyte complex and ionic crosslinking on the antibiotic release. **J. Appl. Polym. Sci.**, v98, n.2, p.538-549, 2005

ZABAR, S., LESMES, U., KATZ, I., SHIMONI, E., BIANCO-PELED, H. Structural characterization of amylose-long chain fatty acid complexes produced via the acidification method. **Food Hydrocolloid.**, v.24, p.347-357,2010.

ZHAO, F., MALAYEV, V., RAO, V., HUSSAIN, M. Effect of sodium lauryl sulfate in dissolution media on dissolution of hard gelatina capsule shells. **Pharm. Res.** v., 21, n.1, p.144-148, 2004.