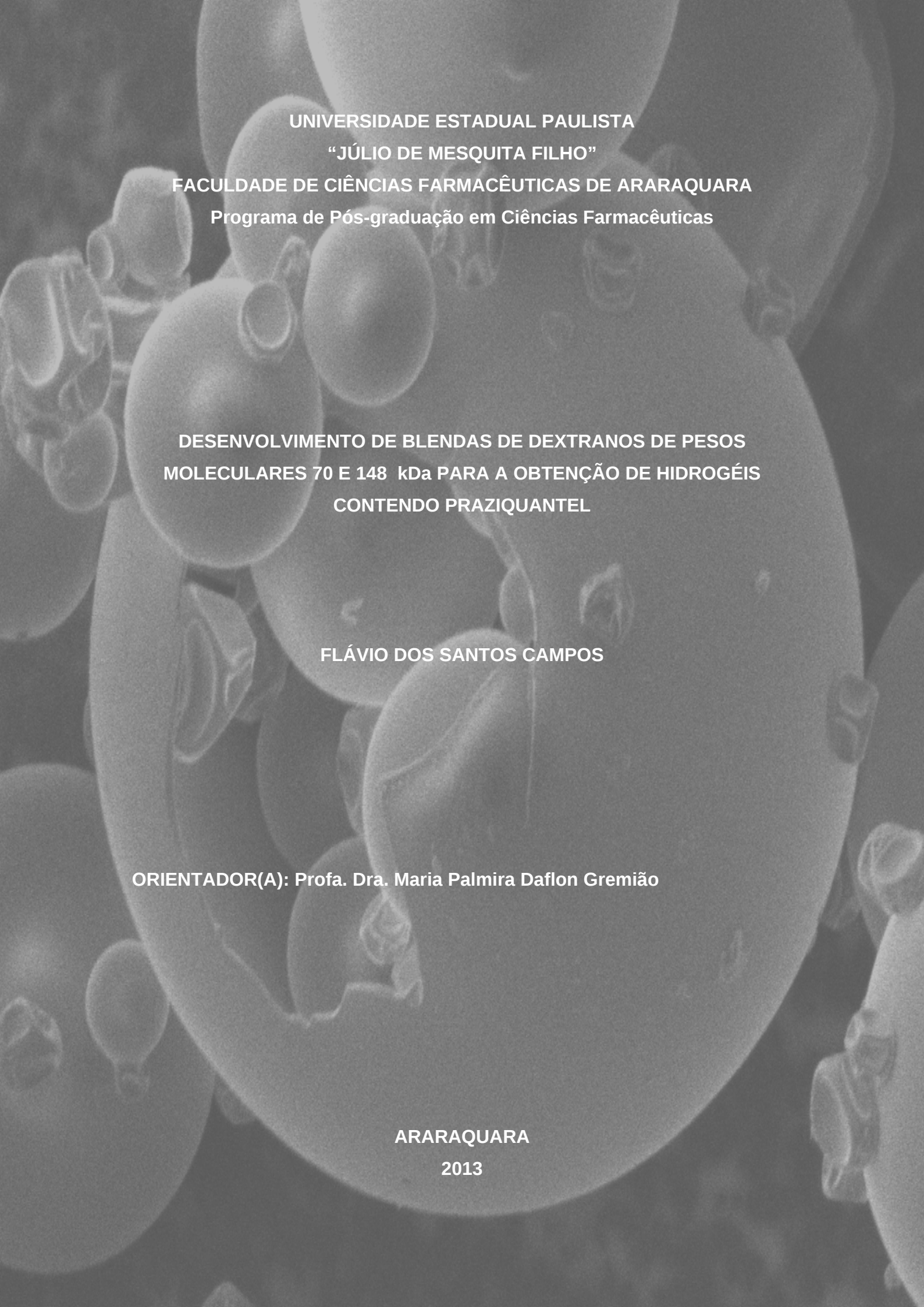




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

DESENVOLVIMENTO DE BLENDS DE DEXTRANOS DE PESOS
MOLECULARES 70 E 148 kDa PARA A OBTENÇÃO DE HIDROGÉIS
CONTENDO PRAZIQUANTEL

FLÁVIO DOS SANTOS CAMPOS

ORIENTADOR(A): Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**DESENVOLVIMENTO DE BLENDS DE DEXTRANOS DE PESOS
MOLECULARES 70 E 148 kDa PARA A OBTENÇÃO DE HIDROGÉIS
CONTENDO PRAZIQUANTEL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTANDO: Flávio dos Santos Campos

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA

2013

Ficha Catalográfica

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

C198d Campos, Flávio dos Santos
Desenvolvimento de Blendas de Dextranos de Pesos Moleculares 70 e 148 kDa para a obtenção de Hidrogéis contendo Praziquantel / Flávio dos Santos Campos. – Araraquara, 2013
102 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião

1. Praziquantel. 2. Dextrano. 3. Blenda. 4. Hidrogel. 5. Modulação dos perfis de intumescimento e liberação. 6. Estudo de Atividade Esquistossomicida In Vivo. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

FLÁVIO DOS SANTOS CAMPOS

**DESENVOLVIMENTO DE BLENDS DE DEXTRANOS DE PESOS
MOLECULARES 70 E 148 kDa PARA A OBTENÇÃO DE HIDROGÉIS
CONTENDO PRAZIQUANTEL**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 29/08/2013, considerou o candidato

Flávio dos Santos Campos

() REPROVADO

(X) APROVADO

1) Examinador (*Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro*)

2) Examinadora (*Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti*)

3) Examinadora (*Profa. Dra. Mara Cristina Pinto*)

4) Examinadora (*Profa. Dra. Adélia Emília de Almeida*)

5) Presidente (*Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião*)

Flávio dos Santos Campos

Para Sempre

*Por que Deus permite
que as mães vão-se embora?
Mãe não tem limite,
é tempo sem hora,
luz que não apaga
quando sopra o vento
e chuva desaba,
veludo escondido
na pele enrugada,
água pura, ar puro,
puro pensamento.*

*Morrer acontece
com o que é breve e passa
sem deixar vestígio.
Mãe, na sua graça,
é eternidade.
Por que Deus se lembra
- mistério profundo -
de tirá-la um dia?
Fosse eu Rei do Mundo,
baixava uma lei:
Mãe não morre nunca,
mãe ficará sempre
junto de seu filho
e ele, velho embora,
será pequenino
feito grão de milho.*

Carlos Drummond de Andrade

*Dedico esse trabalho
em memória de minha mãe,
Iêda de Fátima Sousa Campos*

Agradecimentos

À Deus,

Ao meu pai, José dos Santos Campos Filho, por todo o apoio que me foi oferecido de todas as maneiras possíveis e por tudo que pode fazer por mim em mais essa etapa de minha vida,

À minha orientadora, Maria Palmira Daflon Gremião, pela atenção, paciência e confiança dedicados, pelo exemplo meu crescimento como profissional, pelo conhecimentos e sabedoria transferidos e pelo exemplo de pessoa e profissional que é,

Ao meu amigo, Ademir Salvi Junior, pela grande e sincera amizade, pelos ouvidos, conselhos, otimismo e risos nos momentos de dificuldade, por me fazer ver por uma perspectiva melhor os momentos difíceis da vida e pelos momentos de loucura e diversão,

À minha aluna de iniciação científica, Laís Zuzzi Ferrari, pelo dedicação, trabalho e ajuda dispensados,

Às minhas amigas, Ana Luíza Ribeiro de Souza e Charlene Priscila Kjill, pela amizade e ajuda que me foram oferecidas,

À minha amiga, Fernanda Kolenyak dos Santos, pela amizade, paciência, parceria e ajuda que me foram dispensados,

À minha amiga, Márcia Helena Oyafuso, pela amizade e ajuda que me foram oferecidas,

Ao Laboratório de Parasitologia do Departamento do Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial, a profa. Dra. Silmara Marques Allegretti e a amiga e doutoranda, Rosimeire Nunes de Oliveira, pelo auxílio nos experimentos realizados em sua instituição e pela ajuda oferecida após,

Ao Laboratório de Ressonância Nuclear do Departamento de Química da UFSCar, em especial, ao prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira e Sheraz Ahmad Khan Tanoli, pelo conhecimento adquirido e ajuda oferecidos,

Agradecimentos

Ao Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNESP/Araraquara, em especial, ao amigo, Douglas Cassimiro Lopes e ao prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro, pelos conhecimentos e pela ajuda ofertada,

Ao Laboratório de Química Farmacêutica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, em especial, ao técnico, Mateus Scontri,

Ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura e ao técnico, Tarek Fernandes, pela ajuda dispensada,

Ao professor Dr. Marlus Chorilli, pelas sugestões dadas no meu Exame de Qualificação,

À professora Dra. Adélia Emília de Almeida, pela ajuda oferecida, durante todo meu doutorado e pelas sugestões dadas na minha Defesa de Tese,

À professora Dra. Mara Cristina Pinto pela ajuda na análise estatística dos estudos in vivo e pelas sugestões dadas em minha Defesa de Tese,

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), especialmente, as técnicas de Laboratório Margarete, Natália e Fátima, pela ajuda dada na realização de meus experimentos e aos amigos do Laboratório de Farmacotécnica, Gustavo, Priscileila, Flávia, Leonardo Miziara, Cristina Pissinato, Vanessa, Karisa, Gisela, Giovana Calixto, Jéssica, Roberta, Fabiôla, Liliane e agregados, Alexandre e Yuri,

Aos amigos, Andreia Bagliotti Meneguim e Caio Castilho, pela amizade, carinho, apadrinhamento e momentos de descontração,

Às amigas, Aline Martins dos Santos, Andressa Terumi Fujimura, Fernanda Mansano Carbinatto, Lilian Barbassa, Valéria Cardoso e ao amigo, Bruno Fonseca Santos pela amizade, ajuda na minha preparação para a Defesa de Teses, torcida, incentivo e pelos momentos de descontração vividos pelas bandas de Araraquara, jamais os esquecerei.

"Nada é mais fatal para o progresso da mente humana do que achar que nossas visões da ciência são definitivas, que nossos triunfos são completos, que não há mistérios na natureza, e que não há mundos novos a conquistar."

*Humphry Davy, químico inglês
(1778 - 1829)*

RESUMO

A esquistossomose é uma das principais doenças parasitárias nos trópicos e subtropicais, causada pelo *Schistosoma mansoni*. Uma alternativa para o tratamento desta doença é a quimioterapia, especialmente com praziquantel (PZQ), o qual é altamente permeável, porém apresenta baixa solubilidade em água, o que interfere na sua biodisponibilidade. Muitas estratégias utilizam polímeros no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos com intuito de modificar as propriedades farmacotécnicas e biofarmacêuticas. Dentre elas, destacam-se os hidrogéis de dextrano, que apresenta várias propriedades vantajosas, algumas delas são: baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Em trabalho anterior, foram desenvolvidos hidrogéis de dextrano 70 (DEX-70) e 148kDa (DEX-148) contendo praziquantel por um método simples, econômico, de fácil execução, sem a utilização de reticulantes químicos, o que gerou perfis de liberação diferentes do fármaco incorporado, graças a capacidade de intumescimento dos hidrogéis formados com cada um dos polímeros. Com base no observado neste trabalho avaliamos a utilização de blendas, que pode apresentar uma vantagem tecnológica importante, desenvolvendo novos materiais com propriedades diferentes, sem perder suas características e agregando suas propriedades vantajosas que podem ser usadas no desenvolvimento de sistemas de liberação, para a modulação das propriedades farmacotécnicas e biofarmacêuticas, de forma a desenvolver uma nova plataforma tecnológica em termos de Sistemas de liberação de fármacos. Os hidrogéis foram caracterizados, empregando o RMN- ^1H , o qual constatou uma interação entre dextrano e praziquantel no hidrogel 1:1:1 (PZQ:DEX-70:DEX-148). A difração de Raios-X, juntamente com o DSC, mostrou que parte do fármaco está disperso na matriz polimérica na forma de cristalitos, ajudando a melhorar sua solubilidade, como comprovado pelo estudo de solubilidade. Nos estudos *in vivo*, as amostras 1:2:1 e 1:2:2, foram as que se mostraram mais efetivas. Por fim, constatou-se que o preparo de blendas de dextrano, contendo praziquantel, para obtenção de hidrogéis melhorou as propriedades biofarmacêuticas do praziquantel e sua atividade sobre os vermes de *S. mansoni*.

Palavra-Chaves: Praziquantel. Dextrano. Blenda. Hidrogel. Modulação dos perfis de intumescimento e liberação. Estudo de Atividade Esquistossomicida *In Vivo*.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a major parasitic diseases in the tropics and subtropics, caused by *Schistosoma mansoni*. An alternative treatment for this condition is chemotherapy, especially with praziquantel (PZQ), which is highly permeable, but has a very low solubility in water, which interferes with its bioavailability. Many strategies have been use polymers in the development of systems for controlled drug release in order to modify pharmacotechnical and biopharmaceutical properties. Amongst them, highlight the dextran hydrogels, which present various advantageous properties, some of them are: low toxicity, biocompatibility and biodegradability. In previous studies, dextran 70 (DEX-70) and 148kDa (DEX-148) hydrogels containing praziquantel had been developed by a simple, economical, of easy execution, without the use of chemical crosslinking, which generated different release profiles of drug incorporated, due swelling capacity of the hydrogels formed from each one of polymers. Based on observed in this study, the utilization of blends, which can present a major technological advantage by developing new materials with different properties, without losing its characteristics and adding their advantageous properties that can be used in the development of delivery systems, was evaluated, to provide a modulation of its pharmacotechnical and biopharmaceutical properties in order to develop a new technological platform in terms of systems for drug delivery. Hidrogels were characterized, employing ^1H -NMR, which found an interaction between dextran and praziquantel into 1:1:1 (PZQ:DEX-70:DEX-148) hydrogel. The X-ray diffraction along with DSC showed that part of drug is dispersed in the polymer matrix in the form of crystallites, helping to improve its solubility, as evidenced by solubility studies. In *in vivo* studies, the sample 1:2:1 and 1:2:2, were the ones that were more effective. Finally, it was found that preparation of dextran blends containing praziquantel, to obtain hydrogels improved the biopharmaceutical properties of praziquantel and its activity on worms of *S. mansoni*.

Keywords: Praziquantel. Dextran. Blend. Hydrogel. Modulation of swelling and release profiles. *In vivo* schistosomicidal activity study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formula molecular e estrutural do Praziquantel	22
Figura 2 - Formula estrutural do dextrano	27
Figura 3 - Concentração de praziquantel incorporado às formulações.	44
Figura 4 - Concetração de PZQ solubilizado em água após 24 hs a 25°C.	47
Figura 5 - Espectro no Infravermelho do Praziquantel	48
Figura 6 - Espectros no Infravermelho dos Dextranos 70 e Dextrano 148	49
Figura 7 - Espectro no Infravermelho da mistura física 1:1:1 (PZQ:DEX-70:DEX-148)	50
Figura 8 - Espectro no Infravermelho da mistura física 1:2:1 (PZQ:DEX-70:DEX-148)	51
Figura 9 - Espectro no Infravermelho da mistura física 1:2:2 (PZQ:DEX-70:DEX-148)	51
Figura 10 - Espectro no Infravermelho do hidrogel 1:1:1 (PZQ:DEX-70:DEX-148)	52
Figura 11 - Espectro no Infravermelho do hidrogel 1:2:1 (PZQ:DEX-70:DEX-148)	52
Figura 12 - Espectro no Infravermelho do hidrogel 1:2:2 (PZQ:DEX-70:DEX-148)	53
Figura 13- Espectro de RMN- H^1 do Praziquantel	54
Figura 14- Espectro de RMN- H^1 do Dextrano 70	54
Figura 15- Espectro de RMN- H^1 (A), espectro de referência (B) e espectro de STD-RMN do hidrogel 1:1:1 (C)	56
Figura 16- Espectro de RMN- H^1 (A), espectro de referência (B) e espectro de STD-RMN do hidrogel 1:2:1 (C)	57
Figura 17- Espectro de RMN- H^1 (A), espectro de referência (B) e espectro de STD-RMN do hidrogel 1:2:2 (C)	58
Figura 18- Espectro de DOSY-RMN 2D do dextrano 70	60
Figura 19- Espectro de DOSY-RMN 2D do praziquantel	60
Figura 20- Espectro de DOSY-RMN 2D do praziquantel	61
Figura 21- Espectro bidimensional de ROESY do hidrogel 1:1:1	62
Figura 22- Fotomicrografias do praziquantel obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 1000 vezes (A) e 5000 vezes (B)	63
Figura 23- Fotomicrografias do dextrano 70 kDa obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 100 vezes (A) e 1000 vezes (B)	64
Figura 24- Fotomicrografias do dextrano 148 kDa obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 100 vezes (A) e 1000 vezes (B)	64
Figura 25- Fotomicrografias da mistura física 1:1:1 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 1000 vezes e 2000 vezes.	65
Figura 26- Fotomicrografias da mistura física 1:2:1 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 1000 vezes e 2000 vezes.	65
Figura 27- Fotomicrografias da mistura física 1:2:2 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 200 vezes e 500 vezes.	66

Figura 28- Fotomicrografias do hidrogel 1:1:1 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 5000 vezes e 10000 vezes.	67
Figura 29- Fotomicrografias do hidrogel 1:2:1 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 100, 300, 1000, 2000 e 5000 vezes.	67
Figura 30- Fotomicrografias do hidrogel 1:2:2 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 200, 1000, 2000 e 5000 vezes.	68
Figura 31 - Curva de DSC do praziquantel	69
Figura 32 - Curvas de DSC dos dextranos 70 kDa (A) e 148 kDa (B)	70
Figura 33 - Curvas de DSC das misturas físicas 1:1:1 (A), 1:2:1 (B), 1:2:2 (C) e praziquantel (D)	71
Figura 34 - Curvas de DSC dos hidrogéis 1:1:1 (A), 1:2:1 (B), 1:2:2 (C) e praziquantel (D)	
Figura 35 - Difratoograma dos dextranos 70 kDa e 148 kDa	75
Figura 36 - Difratoogramas do praziquantel, hidrogéis (1:1:1, 1:2:1 e 1:2:2) e misturas físicas (MF1:1:1, MF1:2:1, MF1:2:2)	76
Figura 37- Perfil de intumescimento dos polímeros livres e nas blendas 1:1 e 2:1	77
Figura 38- Perfil de intumescimento das misturas físicas	78
Figura 39- Perfil de intumescimento dos hidrogéis	79
Figura 40- Perfis de intumescimento da blenda 1:1, misturas físicas e hidrogéis 1:1:1	79
Figura 41- Perfis de intumescimento da blenda 2:1, mistura física e hidrogel 1:2:1	80
Figura 42- Perfis de intumescimento da blenda 1:1, mistura física e hidrogel 1:2:2	80
Figura 43 Perfil de Liberação dos hidrogéis e fármaco livre	81
Figura 44 – Quantidade de vermes adultos de cada sexo	84
Figura 45 – Oograma	85
Figura 46 – Redução de ovos por grama de fezes (OPG)	86
Figura 47 – Curva analítica média final	99

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Dados do DSC	74
Tabela 2 – Efeito das doses de PZQ livre e incorporado aos hidrogéis sobre a população de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> após 45 dias do tratamento	83
Tabela 3 – Efeito das doses de PZQ livre e incorporado aos hidrogéis sobre os ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> após 45 dias do tratamento	85
Tabela 4 – Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão (n=3)	100
Tabela 5 – Percentual de recuperação de PZQ das dispersões sólidas (n = 3)	101
Tabela 6 – Limites de Detecção e Quantificação do PZQ em 263nm (n=3)	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BCS	<i>Biopharmaceutics Classification System</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DEX-148	Dextrano 148 kDa
DEX-70	Dextrano 70 kDa
GSA	Glicolato Sódico de amido
HG	Hidrogel
IB	Instituto de Biologia
IV	Infravermelho
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MF	Mistura Física
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	Polietileno Glicol
PVP	Polivinilpirrolidona
PZQ	Praziquantel
RF	Redução de Fêmeas
RM	Redução de Machos
RO	Redução de ovos
RV	Redução de Vermes Vivos
SLN	<i>Solid Lipid Nanoparticle</i>
TGI	Trato Gastrointestinal
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

K	Graus Kelvin
kDa	Kilo Daltons
ΔH	Variação de Entalpia
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
Praziquantel	20
Sistema de Liberação Controlada de Fármacos	24
Dextrano	26
Hidrogéis	28
OBJETIVO	32
MATERIAIS E MÉTODOS	33
MATERIAIS	33
Substâncias e reagentes	33
Equipamentos analíticos e acessórios	33
MÉTODOS	35
PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS COM BLENDS E MISTURAS FÍSICAS	35
DETERMINAÇÃO DE TEOR DO PRAZIQUANTEL	35
AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO PRAZIQUANTEL INCORPORADO NAS AMOSTRAS	36
CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	36
Determinação Espectroscópica de Absorção na Região do Infravermelho com transformada de Fourier	36
Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN- H^1	37
Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio com Transferência de Diferença de Saturação – STD-RMN	37
Espectroscopia Ordenada de Difusão – DOSY	38
Espectroscopia de Efeito Overhauser de quadro rotativo 2D - ROESY	39
Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	39
Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC	39
Difração de raios-X	40
DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE INTUMESCIMENTO	40
AVALIAÇÃO DA DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i> DO PRAZIQUANTEL	40

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VIVO</i>	41
Modelo Biológico	41
Parasitas e Animais	41
Ensaio <i>in vivo</i> com <i>Schistosoma mansoni</i>	42
Análises dos Tratamentos	42
Recuperação dos Vermes Adultos de <i>S. mansoni</i>	42
Oograma	43
Contagem de Ovos eliminados nas fezes (OPG)	43
Análises Estatísticas	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PRAZIQUANTEL	44
AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO PRAZIQUANTEL INCORPORADO NAS AMOSTRAS	45
CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	47
Espectroscopia na região de Infravermelho	47
Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN- H^1	53
Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	62
Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC	68
Difração de Raios –X	74
DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE INTUMESCIMENTO	76
AVALIAÇÃO DA DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i> DO PRAZIQUANTEL	81
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VIVO</i>	83
CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXO	98
ANEXO A - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA EMPREGADA PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR E DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA	98
A1. Especificidade	98
A2. Linearidade	99
A3. Precisão	100

A4. Recuperação	100
A5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	101

1. INTRODUÇÃO

O praziquantel (PZQ) é o único fármaco para o tratamento das esquistossomoses. Este fármaco apresenta eficácia terapêutica sobre todas as espécies de *Schistosoma* e atua, principalmente, sobre as formas adultas do parasita (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; ENK, 2008). A esquistossomose é uma doença debilitante, negligenciada e relacionada a pobreza, considerada, atualmente, epidêmica em 76 países e territórios, ocorrendo principalmente na Ásia, África, América do Sul e Oriente Médio, onde cerca de 200 milhões de pessoas, segundo dado da Organização Mundial da Saúde (OMS), e mais de 800 milhões correm o risco de infecção (NOVAES, SOUZA e DE ARAÚJO, 1998; BALEN et al, 2006; DUAN et al, 2012). O PZQ apresenta um amplo espectro de atividade, contudo, é altamente permeável no trato gastrointestinal (TGI) e possui baixa solubilidade em água, fator limitante para apresentar uma boa biodisponibilidade (MERCK INDEX, 2006; PASSERINI, 2006).

No sentido de contornar limitações como a acima descrita, muitas estratégias vêm sendo estudadas com intuito de modificar as propriedades farmacotécnicas de substâncias ou para melhorar o direcionamento e as biofarmacêuticas do fármaco, prolongar sua ação, controlar a liberação ou diminuir a toxicidade dos fármacos. O uso de polímeros no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos tem sido intensamente pesquisado e alguns autores preveem grande desenvolvimento na interface entre a química de polímeros e as ciências biomédicas (DUNCAN, 2003; TAKAKURA e HASHIDA, 1995; ETTMAYER et al, 2004). Os polímeros vêm sendo aplicados em diversos campos biomédicos como a engenharia de tecidos, a implantação de dispositivos médicos, os órgãos artificiais, as próteses, na oftalmologia, na odontologia, na reparação de ossos e em muitos outros campos. Na área farmacêutica, os sistemas de liberação baseados em polímeros permitem uma liberação controlada de fármacos e tornam possível o direcionamento dos fármacos para o interior de regiões de inflamações ou tumores (JAGUR-GRODZINSKI, 1999). Dentre os vários sistemas de liberação que utilizam os polímeros no campo farmacêutico temos microsferas, nanopartículas, nanopartículas lipídicas sólidas, sistemas

transdérmicos, lipossomas, dispersões sólidas e os hidrogéis (CASSANO, 2009; CASADEI, 2009; CHEUNG, 2005; HAMIDI, 2008; HOARE e KOHANE, 2008; JIANG, 2006; VAN THIENEN, 2007).

A sempre crescente tecnologia dos hidrogéis tem levado a grandes avanços na área farmacêutica e biomédica. Os hidrogéis podem ser definidos como redes poliméricas com configuração tridimensional capazes de incorporar grandes quantidades de água ou fluidos biológicos (HAMIDI, 2008; PEPPAS, 2000). As redes são compostas de homopolímeros ou copolímeros e pouco solúveis em água devido à reticulações químicas ou físicas (PEPPAS, 2000). Os hidrogéis podem ser chamados de “reversíveis” ou “físicos”, quando as redes se mantêm unidas por entrelaçamentos e/ ou forças secundárias, incluindo forças iônicas, ligações de hidrogênio ou hidrofóbicas. Os hidrogéis denominados “permanentes” ou “químicos” são aqueles reticulados covalentemente (MAIA, 2009). Os hidrogéis exibem uma compatibilidade termodinâmica com a água que permite a eles intumescer em meio aquoso (PEPPAS, 2000). Sua afinidade a água é atribuída à presença de grupos hidrofílicos como hidroxilas (-OH), amidas (-CONH-, -CONH₂-) ou ácidos sulfônicos (-SO₃H) nas estruturas dos polímeros que formam hidrogéis. Devido à contribuição desses grupos e domínios na rede, o polímero é assim hidratado em diferentes graus (algumas vezes mais que 90% do peso), dependendo da natureza do ambiente aquoso e composição do polímero (HAMIDI, 2008).

O conteúdo de água absorvida por um hidrogel é dependente de suas características físico-químicas. Estas estruturas têm em comum propriedades físicas que se assemelham mais aos dos tecidos vivos que qualquer outra classe de biomateriais, as quais são atribuídas ao seu conteúdo de água, sua consistência e tensão interfacial baixa com água e fluídos biológicos (HAMIDI, 2008).

Os hidrogéis preparados a partir de polímeros de origem natural oferecem várias vantagens, algumas delas são: baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade (HAMIDI, 2008). Exemplos de polímeros naturais utilizados na preparação de hidrogéis para liberação de fármacos são polissacarídeos, como o ácido poli (algínico), o amido modificado, o dextrano, a celulose ou polipeptídios e proteínas, como a gelatina ou a albumina (ADRIANOV e PAYNE, 1998). Dentre

os polímeros já citados, um dos mais utilizados e pesquisados é o dextrano, devido a uma série de propriedades inerentes a todos os polissacarídeos, as quais possui e que o tornam apropriado para o uso biomédico e farmacêutico.

O dextrano é um polissacarídeo que encontra ampla utilização no meio farmacêutico. Ele é solúvel em água, inerte em sistemas biológicos e não afeta a viabilidade celular (PITARRESI et al, 2003), além de possuir grupos funcionais como hidroxilas livres tornando acessível sua modificação química (LIU e CHAN-PARK, 2009). A ligação característica α -1,6- glicosídica é hidrolizada pelas dextranases, enzimas produzidas em vários órgãos do corpo humano, incluindo fígado, baço, rim e colón e por bactérias intestinais anaeróbicas Gram-negativas. (MAIA et al, 2009; PITARRESI, 2003).

O dextrano apresenta uma série de aplicações dentro das áreas farmacêutica e biomédica. Uma dessas, dentro da área biomédica, é o uso clínico na prevenção da oclusão vascular, como expansor de volume do plasma, e na terapia anticoagulante. Uma solução 32% de dextrano 70kDa foi utilizada para prevenir adesão peritoneal na década de 1980, provando sua biocompatibilidade (ITO et al, 2007). Um outro exemplo que pode ser citado é o trabalho desenvolvido por Liu e Chan-Park (2009), no qual o polímero foi empregado na engenharia de tecidos. Dentro do setor farmacêutico, temos como exemplo o trabalho realizado por Pitarresi e colaboradores (2003), no qual é proposta a síntese e caracterização de um novo hidrogel por reticulação fotoinduzida de dextrano e poliaminoácidos.

Em trabalho realizado por Campos (2009) foram desenvolvidos hidrogéis de dextrano 70 e 148kDa contendo praziquantel por um método simples, econômico, de fácil execução, sem a utilização de reticulantes químicos, que gerou perfis de liberação diferentes do fármaco incorporado, influenciados pela capacidade de intumescimento dos hidrogéis formados com cada um dos polímeros (CAMPOS, 2009).

A utilização de blendas poliméricas pode apresentar uma vantagem tecnológica importante, pois, a partir dela, podem ser desenvolvidos novos materiais com propriedades materiais diferentes, sem perder as características deles e agregando suas propriedades vantajosas que podem ser usados no desenvolvimento de sistemas de liberação no campo farmacêutico

(LITMANOVICH et al, 2002; YU ET AL, 2006; BAJPAI et al., 2008; SIEPMAN et al, 2008; SIONKOWSKA, 2011). Segundo Yu e colaboradores (2006), blendas preparadas com polímeros sintéticos e naturais são desvantajosas, visto que perdem a qualidade mais importante que é a biodegradabilidade.

Portanto com base no observado neste trabalho e beneficiando-se de grande vantagem de estar se utilizando dois polímeros naturais, não perdendo assim as propriedades da biodegradabilidade e biocompatibilidade, avaliamos a utilização de blendas para a modulação das propriedades farmacotécnicas e biofarmacêuticas, em outras palavras pode propiciar o controle dos perfis de intumescimento e liberação de fármacos de forma a desenvolver uma nova plataforma tecnológica em termos de Sistemas de liberação de fármacos.

1.1. Praziquantel

Tendo sua atividade anti-helmitica descrita no começo dos anos 1970, pelos laboratórios da Bayer na Alemanha. Este fármaco , também conhecido por 2-(ciclohexilcarbonil)- 1,2,3,6,7,11 b – hexahidro – 4H – pirazino (2,1 – a) isoquinolina – 4 – ona (Figura 1), um pó cristalino, incolor, inodoro e com sabor amargo característico, estável em condições normais de temperatura e armazenamento. Apresenta fotossensibilidade, faixa de fusão é entre 136 e 142°C, solubilidade em água de 0,4mg/mL, solubilidade em etanol de 97mg/mL e 567mg/ml em clorofórmio (USP 31, MERCK INDEX, CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; LIMA, 2006). Apesar de possuir baixa solubilidade, o PZQ é altamente permeável. No entanto, altas doses devem ser administradas para se garantir uma concentração suficiente para que o fármaco possa atingir seu alvo de ação (CHAUD et al., 2010).

Em áreas onde a esquistossomose é endêmica, o tratamento baseia-se no uso do praziquantel (40 – 60 mg/kg). Embora este fármaco seja eficaz para todas as espécies de *Schistosoma*, sua eficácia terapêutica se restringe aos vermes adultos não sendo eficiente contra os esquistossômulos e formas juvenis, proporcionando baixas taxas de cura em áreas de alta endemicidade onde a

reinfeção é constante (CIOLI & PICA-MATTOCCIA, 2003; DOENHOFF et al., 2008).

O PZQ se apresenta na forma racêmica, porém, segundo Lima (2006), apenas o isômero (-) possui atividade esquistossomocida. Estudos realizados por Cioli e Pica-Mattoccia (2003), mostraram que 20mg/kg do isômero (-) apresentou a mesma taxa de cura, com menos efeitos adversos, do que a dose usual de 40 mg/kg do racemato. O mecanismo de ação deste fármaco ainda não está completamente esclarecido. Contudo, sabe-se que os efeitos do PZQ sobre o *S. mansoni* consistem em contração muscular, alterações no tegumento, aumentando a exposição de antígenos e alterações metabólicas do parasita. Acredita-se que esses efeitos sejam desencadeados por alteração da homeostase do cálcio intracelular em um ou mais locais de armazenamento, mediados por interação entre fármaco e membrana, mais especificamente com proteínas reguladoras do influxo de cálcio. Há evidências da existência de sítios reguladores de cálcio sensíveis ao PZQ presentes no tegumento e células musculares (CUNHA, 1970).

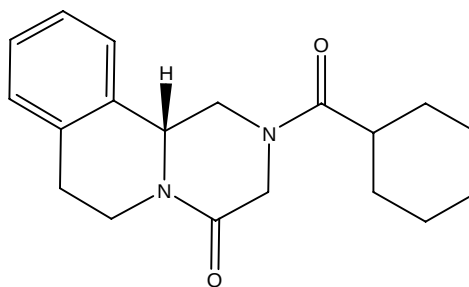
E, o praziquantel é classificado como um fármaco pertencente ao grupo II no Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB), ou seja, um fármaco de baixa solubilidade e alta permeabilidade no trato gastrointestinal. A SCB é uma ferramenta básica de dados científicos para classificação de fármacos baseada na solubilidade em água destes, relacionada com a dose em três pHs relevantes e permeabilidade intestinal. De acordo com a SCB, os fármacos são classificados em: Classe 1 (alta solubilidade – alta permeabilidade), Classe 2 (baixa solubilidade – alta permeabilidade, Classe3 (alta solubilidade – baixa permeabilidade), e Classe 4 (baixa solubilidade – baixa permeabilidade) (BREDA et al, 2009).

Segundo González-Esquível e colaboradores (2005) o coeficiente de permeabilidade aparente do PZQ é $4,4 \times 10^{-5}$ cm/s, o que é um indicativo de sua alta permeabilidade. Isso sugere ainda que o transporte transcelular pode ser seu principal processo de absorção. A ligação do praziquantel a proteínas do plasma varia de 79 a 80,4% na faixa de 0,187 – 3,0µg/mL, sendo que em albumina a porcentagem de ligação é de 78 a 81%. Em concentrações plasmáticas mais altas (10-100µg/mL) observou-se redução de 80,4 para 49,7% dessa ligação

(GONZÁLEZ-ESQUIVEL, 2005). De acordo com González-Esquivel (2005), quando o PZQ é administrado com uma dieta lipídica ou após uma dieta de carboidratos, os níveis plasmáticos aumentam duas e cinco vezes, respectivamente.

A figura 1 apresenta as fórmulas, estrutural e molecular, e a massa molecular do praziquantel.

Figura 1 - Formula molecular e estrutural do praziquantel



Fonte: United States Pharmacopeia 31 (USP31)

Devido à baixa solubilidade em água, o praziquantel (PZQ) apresenta problemas de biodisponibilidade. Logo, a dose utilizada é relativamente alta. Por esse motivo, várias estratégias vêm sendo testados para melhorar sua biodisponibilidade, como a preparação de co-precipitados e complexos formados por α -, β - e γ - ciclodextrina e PZQ (LIMA, 2006; PASSERINI, 2006). Ademais, desde 2001, nosso laboratório vem desenvolvendo variados projetos focados no desenvolvimento de sistemas de liberação, utilizando o praziquantel como fármaco de estudo, e tentando elucidar os mecanismos de absorção do fármaco liberado por esses sistemas (MOURÃO, 2001; CINTO 2005; LIMA, 2006; SOUZA, 2008; CAMPOS, 2009; LIMA, 2009; SOUZA, 2011).

Um estudo desenvolvido por Mourão (2001) com lipossomas contendo PZQ, a fim de avaliar sua efetividade *in vitro*, sobre vermes adultos de *S. mansoni*, observou-se que lipossomas sem PZQ apresentaram efeito sobre os vermes, provavelmente, devido a uma fusão entre as membranas, que pode ter gerado alterações no tegumento e na fluidez. Além disso, observou-se que o efeito do PZQ *in vitro*, é dependente da concentração, enquanto o efeito do fármaco incorporado nas lipossomas foi semelhante ao do PZQ em solução. Por

fim, foi observada uma melhora na solubilidade do fármaco em sistemas baseados em água sem afetar sua eficácia *in vitro* (MOURÃO, 2001)

Em outro estudo realizado por Cinto (2005), foi avaliada a absorção intestinal do PZQ em lipossomas de fosfatidilcolina de soja pelo método do saco intestinal invertido. Observou-se que, apesar de um aumento na solubilidade em água, houve uma redução na absorção do fármaco, que pode gerar um efeito mais localizado na membrana intestinal, acarretando num aumento do efeito do fármaco.

Em outro trabalho realizado por Souza (2008), utilizando fosfatidilcolina de soja, foram desenvolvidas dispersões lipídicas contendo praziquantel, e por meio do método do saco intestinal invertido, foi avaliada sua eficácia contra *S. mansoni* e o efeito da concentração do carreador lipídico no transporte de fármaco através da membrana intestinal. Observou-se nesse estudo que a solubilidade aumentou como já observado em Cinto (2005) e que as dispersões lipídicas contendo 300 mg/kg de PZQ, administradas entre dois períodos de infecção, 30 e 45 dias, obtiveram maior eficácia no tratamento da esquistossomose experimental, por ter reduzido a quantidade de ovos por grama de fezes (OPG) dos animais tratados, e quanto maior a quantidade de fosfatidilcolina, menor é a absorção intestinal do PZQ, levando a um efeito mais localizado na membrana intestinal (SOUZA, 2008).

Souza (2011) desenvolveu nanopartículas sólidas (SLN) contendo praziquantel e avaliou sua estabilidade durante 60 dias a 4°C em temperatura ambiente, frente ao processo de liofilização, a permeação intestinal do PZQ contidas nas SLN pelo método de saco intestinal invertido, quanto sua ação *in vitro* sobre vermes adultos de *S. mansoni* bem como a citotoxicidade das SLN. Os resultados mostraram que a formulação foi estável por 60 dias a 4°C corroborando com estudos anteriores realizados por Cinto (2005) e Souza (2008), a absorção do PZQ incorporado a sistemas de liberação de fármaco lipídicos foi reduzida levando a um efeito reservatório e a uma liberação prolongada e localizada. Além disso, notou-se que nos estudos *in vitro*, as SLN foram mais efetivas que o PZQ livre ocasionando alterações tegumentares e, consequentemente, a mortalidade dos parasitas. Por fim, observou-se que a hepatotoxicidade do fármaco foi diminuída em relação a solução convencional de PZQ.

Além de pesquisas envolvendo sistemas de liberação de fármacos com base em lipídeos envolvendo o PZQ, nosso grupo também desenvolve trabalhos com sistemas de liberação poliméricos, Lima (2006) que desenvolveu dispersões sólidas de praziquantel utilizando glicolato sódico de amido (GSA) ou Polivinilpirrolidona (PVP) e avaliou seu perfil de dissolução, constatou que ambos os carreadores poliméricos melhoraram a solubilidade do PZQ e sua taxa de dissolução, porém a solubilidade do PZQ só foi aumentada em dispersões sólidas de PVP em pH fisiológico. Outro estudo realizado por Lima (2009) elaborou dispersões sólidas de PZQ utilizando PVP pelo método do Fluido Supercrítico e teve sua absorção intestinal avaliada pelo método do saco intestinal invertido. Verificou-se que as dispersões preparadas por meio da tecnologia do Fluido Supercrítico levaram a um aumento na solubilidade e dissolução do PZQ e a sua absorção intestinal, também, foi aumentada, melhorando assim a biodisponibilidade do fármaco.

Considerando os estudos anteriores, descritos acima, alternativas para o melhoramento das características do PZQ, como taxa de dissolução e, consequente, absorção e eficácia terapêutica, são de suma importância na área farmacêutica.

1.2. Sistema de Liberação Controlada de Fármacos

Durante o período de 1945 a 1975 observou-se grande interesse na descoberta de novas moléculas com atividade farmacológica. Neste período, foram introduzidos no mercado norte americano 971 novos fármacos. Entretanto, o alto custo exigido no desenvolvimento desses compostos e dos testes que regulamentam o registro de novos fármacos, tem limitado o avanço do arsenal terapêutico nas últimas décadas. Além disso, as formulações convencionais exigem um regime de doses múltiplas para ter altas concentrações plasmáticas de fármaco com efeito terapêutico, o que gera muitos problemas como, acúmulo sistêmico de fármaco que pode causar efeitos adversos ou intoxicação, dificuldade de manter uma dose terapêutica regular por períodos extensos de tempo e, consequentemente, uma baixa adesão do paciente ao tratamento. Por

outro lado, a descoberta de alvos específicos, bem como os estudos de biodisponibilidade, tem reorientado o interesse da pesquisa na área de planejamento racional de medicamentos. As alternativas empregadas para contornar os altos custos da introdução de novos fármacos, bem como atender os preceitos dos estudos de biodisponibilidade, contornar as deficiências encontradas nas formas farmacêuticas convencionais e a interferência destes na terapia medicamentosa, foram recorrer à estratégia de desenvolvimento de sistemas que controlem a liberação de fármacos com grande potencial para solucionar tais problemas. Muitas destas estratégias, focadas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, têm permitido o aumento da eficiência de fármacos utilizados na terapêutica atual, a re-introdução de outros anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novos fármacos antes que sejam utilizados (GIRI et al, 2012; KIM et al, 2009; MAINARDES et. al., 2006; MOURÃO et. al., 2001).

O principal interesse em relação aos sistemas de liberação é a programabilidade. O exemplo mais simples é o da liberação sustentada de fármacos, que resulta na sua liberação prolongada no plasma em concentrações adequadas. Por exemplo, a liberação de insulina de uma matriz polimérica deve ocorrer somente em resposta ao aumento da concentração de glicose em pacientes diabéticos (KIM et al, 2009).

Tais sistemas podem ser obtidos a partir de polímeros inteligentes, que possuem sensibilidade ativa a sinais do ambiente (enzimas e biomoléculas) e mudanças de propriedades físico-químicas (temperatura, ultrassom, luz, eletricidade, tensão mecânica, pH e forças iônicas). Além disso, no que se refere a modulação também é possível desenvolver sistemas de liberação de fármacos direcionados ao seu alvo de ação, o que minimiza os efeitos colaterais e mantém uma alta concentração local por um maior período de tempo (KIM et al, 2009).

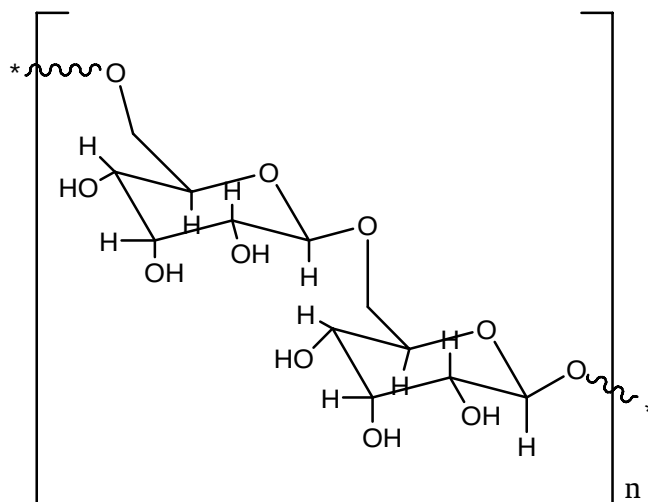
Dentre todos os polímeros, os polissacarídeos são os mais populares materiais poliméricos empregados no desenvolvimento de sistemas de liberação, devido à uma série de características que os tornam ideais para o uso farmacêutico. Eles são polímeros de monossacarídeos, amplamente disponíveis, baratos, possuem um grande número de grupos reativos, uma ampla faixa de massas moleculares, podem variar de composição química e são encontrados

numa variedade de estruturas, com uma grande variedade de propriedades. Na natureza, podemos encontrar várias fontes desses polímeros como as algas (alginato), plantas (pectina), micro-organismos (dextrano), e animal (quitosana). Devido ao fato de terem uma grande variedade de grupos químicos em suas cadeias, eles podem ser facilmente modificados quimicamente ou bioquimicamente e são altamente estáveis, seguros, não tóxicos, hidrofílicos e formadores de géis. Além disso, os polissacarídeos são biodegradáveis, o que sugere seu uso em sistemas de liberação direcionada de fármacos (KIM, 2009; LIU, 2008; SINHA e KUMRIA, 2001).

1.3. Dextrano

O dextrano é uma das classes de polissacarídeos que tem sido amplamente estudado. O termo “dextrano” foi cunhado por Scheibler em 1874, quando caracterizou o dextrano como um carboidrato, com rotação óptica positiva e fórmula empírica $(C_6H_{10}O_6)_n$, produzido por bactérias da espécie *Leuconostoc mesenteroides* B512F. (COVIELLO, 2007; LLOYD, 1998). Os dextranos podem ser definidos como homopolissacarídeos da glicose que caracteriza um número substancial de ligações consecutivas α -(1→6) em suas cadeias maiores, geralmente mais que 50% do total de ligações. Estes α -D-glucanos possuem também cadeias laterais que se originam das ligações ramificadas α -(1→2), α -(1→3) e α -(1→4) (COVIELLO, 2007). A Figura 2 apresenta a estrutura básica do dextrano.

Figura 2 - Formula estrutural do dextrano



Fonte: COVIELLO (2007)

O dextrano e seus derivados são altamente hidrofílicos, biocompatíveis e apresentam baixa adsorção protéica. São polímeros predominantemente lineares com diversas massas moleculares que atribuem propriedades físico-químicas, como solubilidade e viscosidade, diferentes. Os dextranos hidrossolúveis com massa molecular menor que 30000 podem ser excretados através dos rins. Estes polímeros são muito empregados na terapêutica para impedir a oclusão vascular, como expensor do volume do plasma e para a terapia de anti-coagulação (HIEMSTRA et al, 2007). Eles podem ser degradados através da ação das dextranases em vários órgãos no corpo humano, como fígado, baço, rins e cólon (FERREIRA et al, 2005). Segundo alguns autores, os dextranos apresentam uma degradação enzimática mais lenta que outros polissacarídeos. Outra propriedade do dextrano que faz dele um polímero bastante interessante como componente de sistema de liberação controlada de fármacos são seus grupos hidroxilas que permitem uma faixa ampla de substituições, em contraste ao limitado número de grupos funcionais do PEG (HIEMSTRA et al, 2007). Esta característica tem possibilitado desenvolver vários derivados com funções distintas.

O dextrano e seus derivados estão entre os candidatos promissores para a preparação de redes de hidrogéis capazes de propiciar uma liberação controlada de fármacos e proteínas. Os hidrogéis de dextrano vêm recebendo grande atenção, devido a sua grande variedade de aplicações, tanto biomédicas como biotecnológicas. Como o dextrano é pouco tóxico aos tecidos e possui uma alta

degradabilidade enzimática, os hidrogéis deste polímero vem frequentemente sendo considerado como um potencial sistema matricial para liberação de substâncias bioativas, como os fármacos. Devido a sua boa biocompatibilidade, eles aparecem como sendo alternativas viáveis como carreadores de fármacos.

1.4. Hidrogéis

Desde que o primeiro hidrogel sintético foi relatado por Wichterle e Lim, em 1954, os hidrogéis têm sido amplamente utilizados em aplicações biomédicas, em especial, como carreador de fármacos. Os hidrogéis são constituídos de redes poliméricas que absorvem grandes quantidades de água sem se dispersar; essa propriedade é denominada intumescimento. Em sistemas de liberação baseados em hidrogéis, a taxa de intumescimento é um parâmetro muito importante, pois tem grande influência sobre a propriedade de transporte de fármacos e é determinada pelo quanto são entrelaçadas as cadeias poliméricas e pelo tamanho dos poros. A taxa de intumescimento é conhecida por ser controlada pela estrutura da rede, hidrofília e grau de reticulação. Sua afinidade a água é atribuída a presença de grupos hidrofílicos, tais como $-OH$, $-CONH$, $-CONH_2$ e $-SO_3H$ na estrutura que forma o polímero. Graças à contribuição desses grupos, o polímero é, deste modo, hidratado em graus diferentes, dependendo da natureza do ambiente aquoso e composição do polímero (HAMIDI et al, 2008; KIM et al, 2009).

Segundo relatos de Hamidi e colaboradores (2008), para se conseguir um hidrogel com parâmetros físico-químicos predeterminados e perfil de liberação bem definidos, é importante ter um conhecimento da química e síntese das redes poliméricas, características quantitativas e de moldagem dos materiais, parâmetros de interação, cinética de liberação e/ou desintegração e fenômenos de transporte. Ainda, de acordo com estes pesquisadores, sob uma visão geral, os hidrogéis podem ser classificados segundo uma variedade de características, que incluem a natureza dos grupos laterais (neutros ou iônicos), características mecânicas e estruturais, método de preparação (homo- ou co- polímero), estrutura física (amorfo, semicristalino), ligações de hidrogênio e sensibilidade a

estímulos ambientais (pH, forças iônicas, temperatura, radiação eletromagnética, entre outros).

Casadei e colaboradores (2006) demonstraram que a funcionalização de dextrano com glicidilmetacrilato produziu um derivado, Dextrano-Metacrilato (Dex-MA), que foi reticulado por irradiação UV. A vantagem de tal processo é a produção de hidrogéis sem a necessidade de purificar, já que o Dex-MA é reativo o suficiente para ser reticulado através da reação fotoquímica sem qualquer agente reticulante. Estes hidrogéis têm sido amplamente estudados como sistemas de liberação modificada para fármacos hidrofílicos, dissolvendo-o na solução do polímero a ser irradiado. A incorporação de fármacos muito lipofílicos ao hidrogel é complexa, tendo que ser utilizado um co-solvente. Neste caso, é necessário ter, ao mesmo tempo, um bom grau de turgescência e uma solução concentrada do fármaco, sendo os solventes limitados ao metanol e etanol (CASADEI et al., 2006).

O dextrano pode ser utilizado na preparação de hidrogéis para liberação de fármacos e substâncias bioativas. Zhang e colaboradores (2002) e Coviello e colaboradores (2007) desenvolveram hidrogéis de dextrano modificado, capazes de liberar as substâncias contidas em seu interior devido a mudança do pH e forças iônicas. Outro exemplo de utilização dos hidrogéis de dextrano, como sistemas de liberação de fármacos, são os citados por Coviello e colaboradores (2007) e Sinha e Kumria (2001). Segundo esses autores, é possível obter hidrogéis de dextrano com o objetivo de alcançar uma liberação direcionada para o cólon, permitindo o tratamento localizado de doenças colônicas ou a administração oral de peptídeos e vacinas, que devido à instabilidade no trato gastrointestinal superior, apresentam dificuldades para serem administrados por esta via.

Conforme o relatado por Zhang (2002), é possível obter polímeros pH sensíveis pela adição de um grupo funcional ácido ou básico à sua estrutura principal; este pode tanto aceitar como receber prótons em resposta ao pH apropriado e mudanças de força iônica no meio aquoso. Assim, a porosidade da rede do hidrogel mudará com a repulsão eletrostática. Por exemplo, hidrogéis iônicos contendo grupos ácido sulfônico ou carboxílico podem apresentar uma mudança, tanto repentina quanto gradual, em sua dinâmica e equilíbrio no

comportamento de intumescimento como resultado da mudança do pH externo (ZHANG, 2002).

COVIELLO e colaboradores (2007) avaliaram a obtenção de hidrogéis sensíveis ao pH para liberação de fármacos e aplicações na manipulação de tecidos. O sistema foi desenvolvido pela ligação carboximetil-dextrano com o derivado da carbodiimida e com hidroxisuccinimida, levando à formação de ligações do tipo éster. O hidrogel, contendo certo número de grupos COOH, aumentou a porosidade da matriz em resposta à mudança de pH e aumento de força iônica. Segundo os autores, o intumescimento do gel foi pH-dependente, resultando em um aumento na difusão da proteína testada, quando pH e força iônica foram aumentados. Em particular, membranas de hidrogel apresentam uma resposta reversível à mudança de pH sob condições de força iônica constante. Estes sistemas apresentaram varias vantagens: a variação da quantidade dos grupos carboxílicos e a concentração dos reagentes ligados permitiram a monitoração da densidade da carga e do grau de ligação de maneira que o equilíbrio entre as taxas de degradação e propriedades mecânicas puderam ser facilmente controlados (COVIELLO, 2007).

Um grande número de polissacarídeos já foi testado como sistema transportador de fármacos cólon-específicos, entre eles o dextrano. Um fator importante que torna o dextrano tão interessante para o uso em sistemas colônicos de liberação de fármacos é sua capacidade de agir como substrato de bactérias que habitam o cólon. A estabilidade destes sistemas tem sido investigada em modelos *in vitro*, simulando pequenos ambientes intestinais e colônicos para avaliar a adequação de matrizes de dextrano como carreadores para sistemas de liberação específicos ao cólon (COVIELLO, 2007; SINHA, 2001).

De fato, tais sistemas são de grande interesse para tratamentos locais de doenças colônicas e, do mesmo modo para a administração oral de peptídeos e vacinas, que devido a instabilidade no trato gastrointestinal superior, apresentam dificuldades para serem administrados por via oral. A maioria das bactérias no cólon são sacarolíticas, ou seja, obtêm energia através do uso de enzimas que fermentam os carboidratos, resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta e gases. As dextranases são as enzimas que hidrolisam as ligações

glicosídicas do dextrano. A atividade das dextranases é demonstrada pelas bactérias intestinais gram-negativas e anaeróbicas (COVIELLO, 2007; SINHA, 2001).). Portanto, baseando-se no que as pesquisa vem apontando, podemos perceber que os hidrogéis de dextrano são uma ferramenta útil na liberação de fármacos

2. OBJETIVO

Desenvolver blendas com diferentes proporções de dextranos 70 e 148 kDa no intuito de se obter hidrogéis contendo praziquantel.

Desenvolver uma nova plataforma tecnológica em termos de Sistemas de Liberação de Fármacos

2.1. Objetivos Específicos

- Desenvolvimento e Caracterização dos hidrogéis
- Avaliar a taxa de intumescimento
- Avaliar a capacidade de liberação *in vitro*
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vivo*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Substâncias e reagentes

- Dextrano 70000 (TCI®)
- Dextrano 148000 (Sigma®)
- Etanol absoluto 99,5% (Synth®)
- Água deionizada Milli-Q
- Ácido clorídrico 37% (Chemis®)
- Lauril sulfato de sódio (BDH Chemicals Ltda.)
- Praziquantel (Shangai Pharmaceutical®)

3.1.2. Equipamentos analíticos e acessórios

- Bomba de Vácuo D-Lab, Edwards®, modelo 34-8
- Bomba de Vácuo, Edwards®, modelo XDS 5
- Difratometro de raios X, da Siemens®, modelo D5000
- Dispositivo para determinação de intumescimento segundo Enslin
- Equipamento de Análise Térmica (TA Instruments® modelo DSC-2910) - Departamento de Química Analítica do Instituto de Química - Unesp.
- Equipamento para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Varian - mod. ProStar, equipado com Detector espectrofotométrico com fotodiodo (Prostar® 330 UV-VIS PDA);
- Equipamento para ensaio de dissolução (Hanson® Dissolution Test Station SR8 Plus)
- Espectrofotômetro Infravermelho Fourier (Shimadzu® modelo IR Prestige-21) – Departamento de Fármacos e Medicamentos.

Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp

- Espectrofotômetro Ultravioleta (Hewlett-Packard® Kayak-XA)
- Espectrometro de RMN- H^1 Bruker Avance III 600,13 MHz – Departamento de Química, Laboratório de Físico-Química, UFSCar
- Liofilizador, Thermo Scientific®, modelo Savant Micro Modulyo
- Microscópio eletrônico Jeol JSM-7500F “Field Emission SEM/ Analytical Field Emission SEM” – Departamento de Físico-Química do Instituto de Química –Unesp

3.2. MÉTODOS

3.2.1. PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS COM BLENDS E MISTURAS FÍSICAS

As blends foram preparadas com dextranos de massas moleculares 70kDa e 148kDa. A incorporação do praziquantel foi feita pelo método de dissolução e evaporação de solvente, conforme o método desenvolvido em trabalho anterior realizado por Campos, 2009.

Neste método, o fármaco foi dissolvido em uma solução hidroalcoólica, onde posteriormente foi adicionada a blenda dos polímeros. A mistura foi, então, distribuída em placas de Petri e colocada na capela com exaustor ligado para eliminar parte do álcool etílico por evaporação para, mais tarde, ser armazenada em congelador por 24hs. Após, o período de congelamento as amostras foram postas para secar em liofilizador, onde permaneceram por mais 24hs para total eliminação da água. As amostras secas, então, foram pulverizadas e armazenadas adequadamente em frascos de vidro âmbar. Ao final, foram obtidas formulações nas proporções de 1:1:1, 1:2:1, 1:1:2, 1:2:2, 1:1:3, 1:3:1, 1:2:3, 1:3:2 e 1:3:3 (PZQ:DEX-70:DEX-148).

Para a obtenção das misturas físicas, quantidades adequadas de PZQ, DEX-70 e DEX-148 foram pesadas e misturadas nas proporções de 1:1:1, 1:2:1, 1:1:2, 1:1:3, 1:3:1 e 1:2:2 (PZQ:DEX-70:DEX-148). As amostras foram preparadas em gral com auxílio de pistilo. Após a mistura, as amostras foram tamisadas e armazenadas em frascos de vidro âmbar.

3.2.2. DETERMINAÇÃO DE TEOR DO PRAZIQUANTEL

O teor de PZQ incorporado nas formulações foi determinado adicionando uma massa proporcional de amostra (polímeros + fármaco) que contivesse 50 mg de fármaco. Essas amostras foram, inicialmente, solubilizadas em 10 mL álcool etílico. Em seguida, uma alíquota de 1 mL, foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e diluída em água Milli-Q. Por fim, a quantidade de PZQ solubilizada foi determinada por espectrometria UV no comprimento de onda de

263nm. O experimento foi realizado com as três formulações desenvolvidas, em triplicata. Toda a metodologia utilizada na determinação da quantidade de fármaco foi devidamente validada (vide ANEXO A).

3.2.3. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO PRAZIQUANTEL INCORPORADO NAS AMOSTRAS

A solubilidade do praziquantel incorporado aos hidrogéis foi determinada adicionando uma massa de amostra (polímero +fármaco) que contivesse 10 mg em 10 mL de água Milli-Q. As amostras foram mantidas em agitação por 24 horas à temperatura de 25 °C. Decorrido esse tempo, foram centrifugadas a 3400rpm, por 10 minutos. A quantidade de PZQ solubilizada foi determinada por espectrometria UV, $\lambda = 263\text{nm}$. O experimento foi feito em triplicata. . Toda a metodologia utilizada na determinação da quantidade de fármaco foi devidamente validada (vide ANEXO A).

3.2.4. CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

3.2.4.1. Determinação Espectroscópica de Absorção na Região do Infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de absorção na região do Infravermelho foram obtidos por meio de um espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier com o objetivo de se avaliar a existência de interações entre fármaco e polímero de natureza física ou química. As amostras de PZQ, dextranos (70 kDa e 148 kDa), mistura física e hidrogéis foram misturadas com brometo de potássio em pó e comprimidas em uma prensa hidráulica sob uma força de 8kgF por aproximadamente 3 minutos para que pastilhas fossem obtidas. Os espectros foram registrados na região do IV e os picos identificados comparados com valores da literatura.

3.2.4.2. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN- H^1

Os espectros de RMN foram registados num Bruker Avance III 600,13 MHz (núcleo de hidrogênio), equipado com uma crio-sonda TCI de 5 milímetros (tripla ressonância $^{13}C/^{15}N/^1H$) com gradientes de campo de pulsos ao longo da direção z, à temperatura de 296K. A aquisição e processamento de dados foram realizados com a utilização do software Topspin Bruker, versão 3.0, instalado no espectrómetro.

O espectro de prótons de PZQ foi obtido em metanol deuterado, enquanto os espectros de Dex 70, e 148 foram obtidos em D_2O , em que o sinal HOD residual foi tomado como padrão interno. Todos os espectros dos hidrogéis (1:1:1, 1:2:1 e 1:2:2) foram obtidos através da dissolução das amostras já preparadas em D_2O (MeOD e 5%: 95% , v/v), respectivamente.

3.2.4.2.1. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio com Transferência de Diferença de Saturação – STD-RMN

Os estudos de STD-RMN foram realizados pela dissolução de 2mg de cada hidrogel em 5%:95%, v/v de MeOD e D_2O , respectivamente. Uma sequência de pulsos STD padrão Bruker com supressão de água foi utilizada para todos os experimentos de STD para a supressão de sinal HOD residual. O STD-RMN foram obtidos com uma série seletiva de pulsos suaves de forma Gaussiana com truncamento de 1%, 50ms de comprimento e separados por 1ms. Em todos os espectros de irradiação seletiva foi feita em 2240.100 Hz para o *on-ressonance* e 18000Hz para o *off-ressonance* (referência) com 25ms de filtro spin-lock para a supressão do sinal notório de grande porção de açúcares. A subtração destes espectros pseudo-2D (*on-ressonance* a partir de *off-ressonance*) foi feito com a ciclagem de fase. O tempo de saturação de 2s foi encontrado para ser mais eficaz para estes estudos STD. Antes da transformação, os espectros de STD-RMN foram multiplicados por uma função de alargamento de linha exponencial (LB) de

0,5-2 Hz. O número total de verificações para adquirir estes espectros de STD foi de 64 com a aplicação de 16 *dummy scans* cada.

3.2.4.2.2. Espectroscopia Ordenada de Difusão – DOSY

Para a espectroscopia Ordenada de Difusão, foi utilizada uma sequência de pulsos LED padrão Bruker. Durante todo o curso destes estudos, o gradiente de comprimento utilizado foi de 1ms, com os tempos de recuperação de 200 μ s e atraso das correntes de Eddy (ou correntes de Foucault) longitudinal de 5ms. Sessenta e quatro diferentes gradientes de amplitude foram utilizados para cada experimento (amostra separada e no complexo), e o tempo de difusão total otimizado foi de 60ms. Em ambos os casos (amostra em separado e no complexo), os dados de aquisição foram coletadas com gradiente de força começando a partir de 1.07G/cm até 53,5 G/cm com 32 escaneamentos para observar as interações. Em cada caso, o atraso de relaxamento foi mantido a 3s e a linha base corrigida automaticamente.

Processamento dos espectros do DOSY 2D (amostra separada e hidrogéis) foram realizadas com a ajuda d DOSY toolbox (Nilsson, 2009), pela função de ampliação de linha, 2Hz e 0.03Hz, ao longo das dimensões de F1 e F2, respectivamente. Os macros do DOSY foram executados com dados transformados usando 64K de pontos de dados ao longo do eixo F2. A função de apodização Gaussiana de 0,01 Hz foi colocado apenas na dimensão F1. O preenchimento de zero até 4K de pontos de dados ao longo de F2 e 1K de pontos de dados ao longo da F1 foram empregados em ambos os casos para os espectros 2D, antes de se fazer a transformação de Fourier. Os DOSY resultantes são pseudo-espectros bidimensionais com os desvios químicos de RMN (em ppm), ao longo de um eixo e os coeficientes de difusão calculados (em 10⁻¹⁰ m²/s) ao longo da outro. Comparação dos coeficientes de difusão de moléculas separadas e dos hidrogéis foi medido tomando como padrão o sinal da água.

3.2.4.2.3. Espectroscopia de Efeito Overhauser de quadro rotativo 2D -ROESY

Uma sequência de pulsos sensíveis de fase ROESY foi realizada, com tempo de mistura de 300 ms para o hidrogel (1:1:1). Foi utilizada a largura espectral de 9057.971 Hz em ambas as dimensões F2 e F1 com 2 segundos de atraso por varredura. O espectro foi coletado, colocando 2K de pontos de dados complexos ao longo da dimensão F2 com 256 incrementos na dimensão F1, e foram coletados por meio de 2.048 pontos de dados complexos na dimensão F2 e 324 incrementos. Durante o processamento, para ser adquirido o espectro real, 2K de pontos de dados complexos ao longo da dimensão F2 e 1K de pontos de dados ao longo da dimensão F1 foram usados com 0.3 Hz de função de ampliação de linha ao longo da dimensão F1.

3.2.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A análise microscópica das amostras de PZQ nas misturas físicas e hidrogéis foi realizada por meio de microscópio eletrônico Jeol JSM-7500F “Field Emission SEM/ Analytical Field Emission SEM”. As imagens foram capturadas com aumentos de 100 a 10000 vezes.

3.2.4.4. Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

Para a realização do estudo térmico do PZQ, DEX-70, DEX-148, mistura física PZQ/DEX-70 ou PZQ/DEX-148 e hidrogéis PZQ/DEX-70 ou PZQ/DEX-148 utilizou-se equipamento de Análise Térmica, modelo DSC-2910 (TA Instruments), capaz de operar da temperatura ambiente até 300°C.

As curvas DSC foram obtidas utilizando massa de amostra de 1,9 a 2,1mg, cadinho de alumínio e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹, atmosfera de nitrogênio, com vazão média de 25 mL/min⁻¹.

3.2.4.5. Difratoimetria de raios-X

A identificação da estrutura cristalina e / ou formas amorfas de PZQ, DEX, misturas físicas e hidrogéis foi realizada com o auxílio de difratogramas obtidos a partir de difratômetro de raios X, da Siemens ®, modelo D5000 velocidade de goniômetro de 0,05/min sob radiação Cu-K α (λ = 1,5406 Å) e com varredura de raios-X de ângulo aberto 2 θ entre 4° e 80°.

3.2.5. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE INTUMESCIMENTO

O perfil de intumescimento das amostras, em função do tempo, foi avaliada em dispositivo de Enslin adaptado (CURY, 2005). Para realizar estes ensaios foram utilizadas 0,05g das amostras e o volume de água absorvido pela amostra foi determinado nos intervalos de 1, 5,10, 15, 20,30, 40, 60, 90, 120 min. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem (%) de água absorvida em relação a massa inicial da amostra.

3.2.6. AVALIAÇÃO DA DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DO PRAZQUANTEL

A taxa de dissolução do PZQ foi avaliada nos hidrogéis que apresentaram alguma melhora na solubilidade do praziquantel em água. O teor de fármaco dissolvido foi avaliado por meio da metodologia para comprimidos de PZQ descrita na USP 31, a qual foi adaptada as condições necessárias para atender aos parâmetros de análise dos hidrogéis. Foram adicionados 10mg de amostra de PZQ livre, mistura física ou hidrogéis a cubas de 150 mL., contendo meio dissolutor composto por solução aquosa de ácido clorídrico 0,1N e 2 mg de lauril sulfato de sódio para cada 1 mL de solução aquosa do ácido. Alíquotas do meio de dissolução foram coletadas e repostas nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, filtradas e analisadas por CLAE. Todo o experimento foi realizado em sextuplicata (n=6).

Para quantificação do fármaco dissolvido, as condições cromatográficas utilizadas foram: Fase Móvel – Acetonitrila/ Água (45:55), Fase Estacionária - Coluna de Octadecilsílica C18 (250 x 4,6mm, tamanho de partícula 5µm (Varian® - Chromsep®), Detector DAD (arranjo de diodos) UV no $\lambda = 215\text{nm}$, vazão de 1mL/min, volume de injeção de 100µL e tempo de corrida de 20 minutos.

Para a avaliação da dissolução do fármaco foi preparada uma curva analítica utilizando uma solução estoque de concentração igual a 1,0mg/ml de PZQ, na fase móvel (55% água e 45% acetonitrila), a partir da qual foram diluídas em solução aquosa de ácido clorídrico 0,1N e 2% de lauril sulfato de sódio, nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg /ml, as quais tiveram suas concentrações determinadas em CLAE, feitas cada uma em triplicata.

3.2.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO*

3.2.7.1. Modelo Biológico

3.2.7.1.1. Parasitas e Animais

Nesse estudo utilizou-se a cepa BH de *S. mansoni* (oriunda de Belo Horizonte, MG, Brasil) mantida em moluscos, planorbídeos *Biomphalaria glabrata*, no departamento de Biologia Animal, IB, Unicamp. Fêmeas de camundongos (*Mus musculus*), linhagem “Swiss” SPF com 30 dias de idade pesando $20 \pm 22\text{g}$, foram previamente infectadas percutaneamente com ± 70 cercárias de *S. mansoni*, por meio da técnica de imersão caudal, descrita por (OLIVER E STIREWALT, 1952). Sequencialmente, os camundongos foram mantidos em Rack ventilada (Alesco®) (temperatura entre 20 °C e 22 °C), por 60 dias. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp.

3.2.7.2. Ensaios *in vivo* com *Schistosoma mansoni*

Os tratamentos foram realizados após 45 dias de infecção e, após 60 dias de infecção, estes foram avaliadas. Para isto, os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n= 5). Todos os grupos foram tratados em dose única, através de tubagem esofágica. Foram administradas 0,3 mL de cada amostra avaliada. As concentrações foram calculadas de acordo com o peso do animal e expressas em mg/kg para cada grupo experimental. Foi avaliada uma dose de PZQ de 300mg/kg, incorporado ou não nos diferentes sistemas. O grupo 1 (Controle positivo), foi tratado com PZQ disperso em Tampão Tris 20mM pH 7,5. O grupo 2 (Controle negativo), recebeu solução tampão PBS. Os últimos 3 grupos, foram tratados com os hidrogéis, contendo praziquantel, e foram nomeados da seguinte forma: HG1:1:1 (Grupo 3), HG1:2:1 (Grupo 4) e HG 1:2:2 (Grupo 5).

O protocolo deste experimento de infectividade foi submetido para a Comissão de Ética de experimentação animal CEUA/Unicamp, protocolo no 2170-1, e aprovado por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2.7.3. Análises dos Tratamentos

3.2.7.3.1. Recuperação dos Vermes Adultos de *S. mansoni*

Para avaliar a redução da carga parasitária, duas semanas após a realização dos tratamentos, os animais foram eutanasiados por meio do deslocamento cervical e submetidos à perfusão do sistema porta-hepático de acordo com PELLEGRINO & SIQUEIRA, (1956). Os vermes recuperados foram colocados em placa de Petri contendo solução salina NaCl 0,85%, estes foram quantificados e identificados segundo o sexo e vermes acasalados bem como a localização em que se encontravam. As porcentagens de redução dos vermes (RV) foram calculadas de acordo com Delgado et al. (1992), usando a fórmula:

$$\% \text{Redução de vermes} = \frac{\text{Total vermes grupo infectado não tratado} - \text{Total vermes grupo tratado}}{\text{Total vermes grupo infectado não tratado}} \times 100$$

(Equação 1)

3.2.7.3.2. Oograma

Para avaliar do efeito dos tratamentos, sobre a distribuição e estágio de desenvolvimentos de ovos do *S. mansoni* nos tecidos intestinais, um fragmento de 0,5 cm do intestino delgado foi retirado para realização do oograma. Foram analisados 10 campos aleatórios, em microscópio óptico com aumento de 100x. Os ovos foram quantificados de acordo com seus diferentes estágios de maturidade - 1º ao 5º - e ovos mortos, seguindo o método descrito por Hermeto et al. (1994) e Pellegrino et al. (1962).

3.2.7.3.3. Contagem de Ovos eliminados nas fezes (OPG)

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

3.2.7.4. Análises Estatísticas

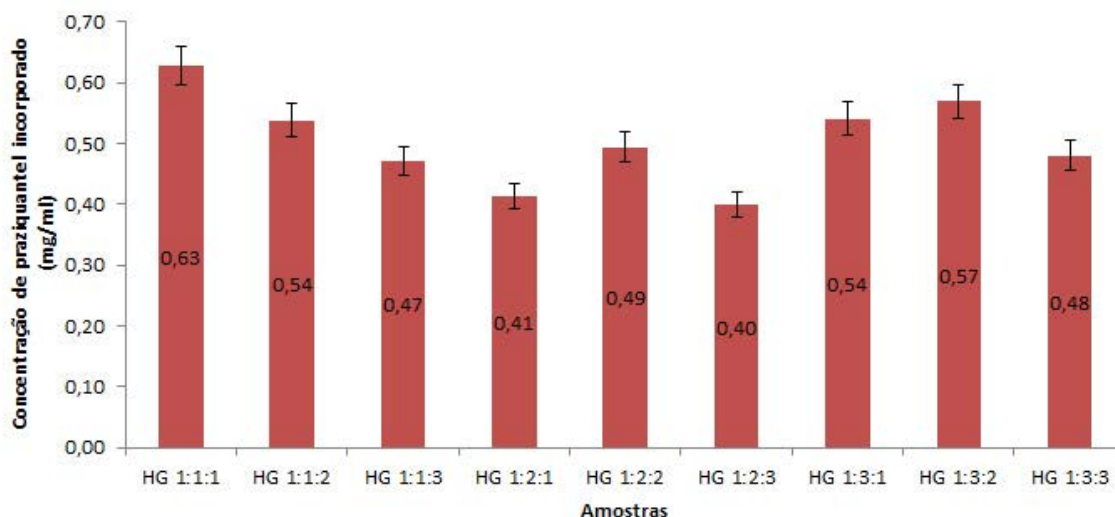
Para análises estatísticas dos dados obtidos foram aplicados a Análise da Variância (ANOVA) e para a comparação de médias foi utilizado o Teste de Tukey para as variáveis com valores paramétricos e o Teste de Kruskal-Wallis e para a comparação de médias foi utilizado o Teste de Student-Newman-Keuls para variáveis com valores não paramétricos. Foram considerando-se estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PRAZIQUANTEL

Os valores obtidos nos estudos de determinação de teor estão na Figura 3. Pode-se observar que a formulação 1:1:1 e 1:3:2 apresentam uma concentração alta de fármaco incorporado, 0,63 mg/ml e 0,57 mg/ml, respectivamente. Também foi notado que nas formulações 1:1:2 e 1:3:1 que as solubilidades foram semelhantes. Enquanto em algumas encontramos altas concentrações de praziquantel, nas amostras 1:2:1 e 1:2:3, verifica-se a presença concentrações menores do fármaco que a teórica (0,5mg/ml), 0,41 mg/ml e 0,40 mg/ml, respectivamente.

Figura 3 - Concentração de praziquantel incorporado às formulações.



Fonte: Próprio autor.

Foi selecionada para a avaliação da solubilidade do praziquantel a formulação 1:1:1, que serviu de parâmetro mínimo na conjectura a respeito dos efeitos da proporção dos polímeros sobre as propriedades físico químicas e biofarmacêuticas e, também, a amostra 1:2:2 que auxiliou nos estudos como parâmetro máximo. Além dessas, foram selecionadas os hidrogéis 1:1:2; 1:1:3; 1:2:1 e 1:3:1, que ajudaram na ponderação sobre a influência de uma maior proporção de dextrano 70 kDa ou 148 kDa nas propriedades do fármaco.

4.2. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO PRAZIQUANTEL INCORPORADO NAS AMOSTRAS

Os valores obtidos nos estudos sobre a solubilidade do PZQ presente nas formulações estão na Figura 4. Este estudo foi feito para avaliar o efeito das formulações e misturas físicas sobre a solubilidade do fármaco em água.

Observando a figura 4 percebe-se que em todas houve um aumento da solubilidade, comparadas à do PZQ livre em água, que nesse estudo apresentou solubilidade de 0,26 mg/ml. No entanto, as formulações 1:2:1 e 1:2:2 apresentam aumentos de cerca de 0,15 mg/ml nas concentrações encontradas. Enquanto que as misturas físicas nas proporções de 1:2:1 e 1:2:2 mostram concentrações de fármaco de 0,27 mg/ml e 0,17 mg/ml, o que confirma uma boa melhora na solubilidade PZQ

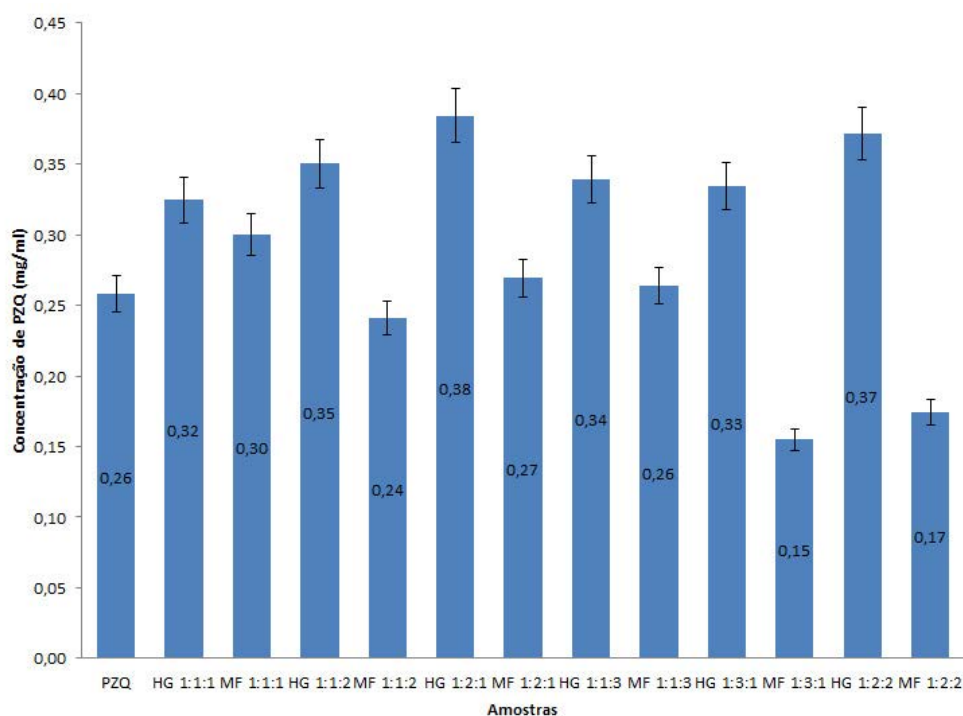
Essa diferença de aumento na solubilidade do PZQ entre as amostras e suas misturas físicas se deve, provavelmente, à proporção de polímeros, a formação da rede polimérica, a competição dos polímeros com o fármaco pelas moléculas de água e a interação que existe entre fármaco e polímero, conforme o que já foi sugerido nos estudos de RMN- H^1 , MEV, DSC e Difração de Raios-X. Em ambos os casos, há a possibilidade do fármaco se encontrar molecularmente disperso entre os espaços da rede formada pelos polímeros, porém, no caso de 1:2:1, a alta proporção de DEX-70 que por ter uma cadeia menor e estar em maior concentração pode ter ditado o comportamento do sistema, restando mais o PZQ e competindo com ele pela água, uma vez que, este polímero é altamente hidrofílico. No caso da mistura física 1:2:1 e 1:2:2, o PZQ pode ter apresentado uma solubilidade menor devido às razões anteriormente apresentadas nas análises feitas sobre as fotomicrografias obtidas por MEV. Como foi observado nesse estudo, os cristais de PZQ se depositavam sobre as partículas de dextrano, aderindo à superfície delas, o que poderia, por conseguinte, levar a uma redução da superfície de contato das partículas de praziquantel com a água, interferindo na solubilidade do fármaco.

No que se refere à amostra de 1:2:2, o fato de ambos os polímeros somados estarem em uma concentração maior que o fármaco pode ter gerado

uma melhor dispersão, deixando-o mais livre para ser solubilizado. Há, portanto, a possibilidade de tal fato possa ter contribuído para uma maior solubilização do fármaco em relação a sua mistura física. No entanto, uma competição entre os polímeros e o PZQ pela água também pode ter existido, na qual o fármaco saiu claramente prejudicado. Além disso, como observado nos estudos realizados pelas técnicas de DSC, difração de Raios-X e MEV, afora a questão da dispersão também verificada nesses estudos, deve se levar em consideração os cristalitos observados nas fotomicrografias e as alterações estruturais, observadas no DSC e difração de Raios-X, que podem ter influenciado na solubilidade do fármaco. Deve se recordar também, que como mostrado nos estudos de RMN- H^1 , PZQ e DEX interagem de forma mais branda que nas amostras 1:1:1. Disto, também pode se sugerir que, possivelmente, o hidrogel 1:1:1 apresenta uma baixa solubilidade devido a essa interação mais forte entre os componentes da amostra.

A vista desses resultados, as amostras de hidrogéis 1:2:1 e 1:2:2 foram selecionadas por terem apresentada, juntamente com suas misturas físicas para servirem de parâmetro. Além disso, a amostra 1:1:1 foi selecionada para se ter um outro comparativo com relação a quantidade de polímeros em relação ao fármaco e, assim, avaliar se a quantidade de polímero influi na dissolução do fármaco e seu perfil.

Figura 4 - Concentração de PZQ solubilizado em água após 24 hs a 25°C.



Fonte: Próprio autor

4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

4.3.1. Espectroscopia na região de Infravermelho

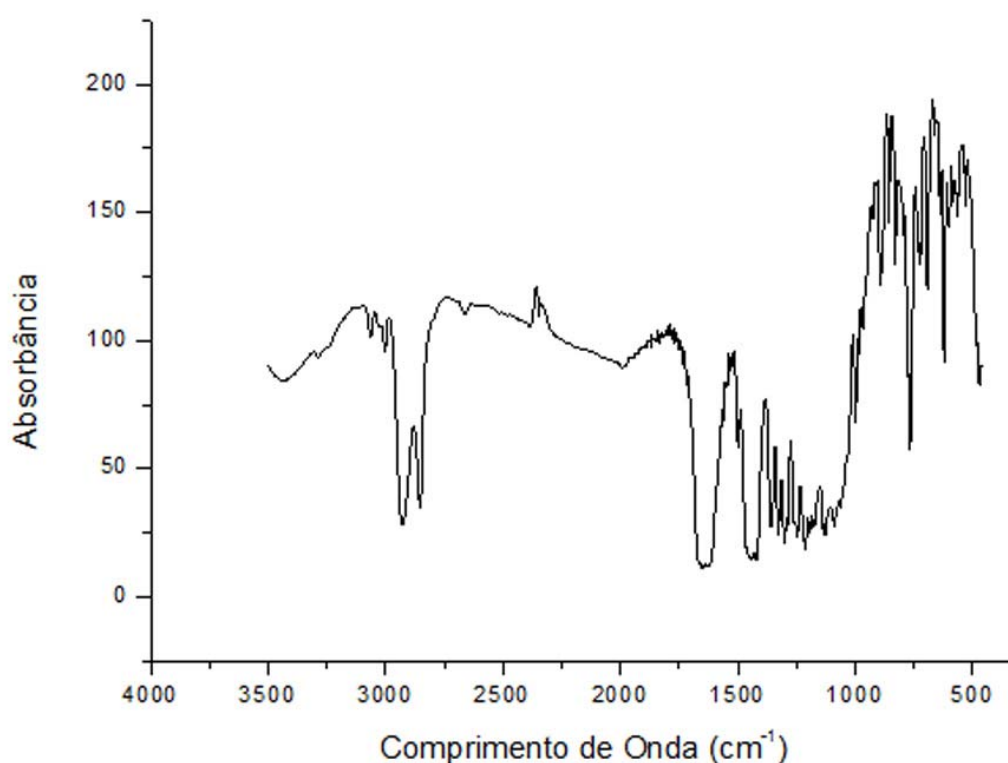
A espectroscopia de absorção na região do Infravermelho é uma ferramenta muito útil para a avaliação de possíveis interações químicas entre o fármaco e o polímero, que geram alterações nos grupos funcionais característicos do fármaco.

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. A porção de maior utilidade está situada entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , e denomina-se região média do infravermelho. Essa região é muito utilizada para a confirmação estrutural de moléculas, uma vez que todos os compostos possuem espectros na região do infravermelho, muito característicos, que não se repetem de molécula para molécula (SILVERSTEIN, 2006; WATSON, 1999).

As figuras 5-12 mostram os espectros de absorção no infravermelho do praziquantel, dextrano 70 e 148, misturas físicas e hidrogéis.

No espectro de absorção do PZQ (Figura 5) foi observada uma banda na região de 3400 cm^{-1} , provavelmente, devido a presença de umidade na pastilha de KBr ou na amostra. As bandas em 2900 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} são referentes as vibrações de C-H das deformações axiais simétrica e assimétrica de CH_2 e CH_3 . Pode se observar uma banda próxima a 1600 cm^{-1} uma banda referente à absorção do estiramento das carbonilas ($\text{C}=\text{O}$) presentes na molécula do fármaco e, que pode ser observada na figura. Também pode-se ver entre 1350 e 1000 cm^{-1} várias bandas sobrepostas que indicam deformação axial C-N (SILVERSTEIN, 2006).

Figura 5 - Espectro no Infravermelho do Praziquantel.

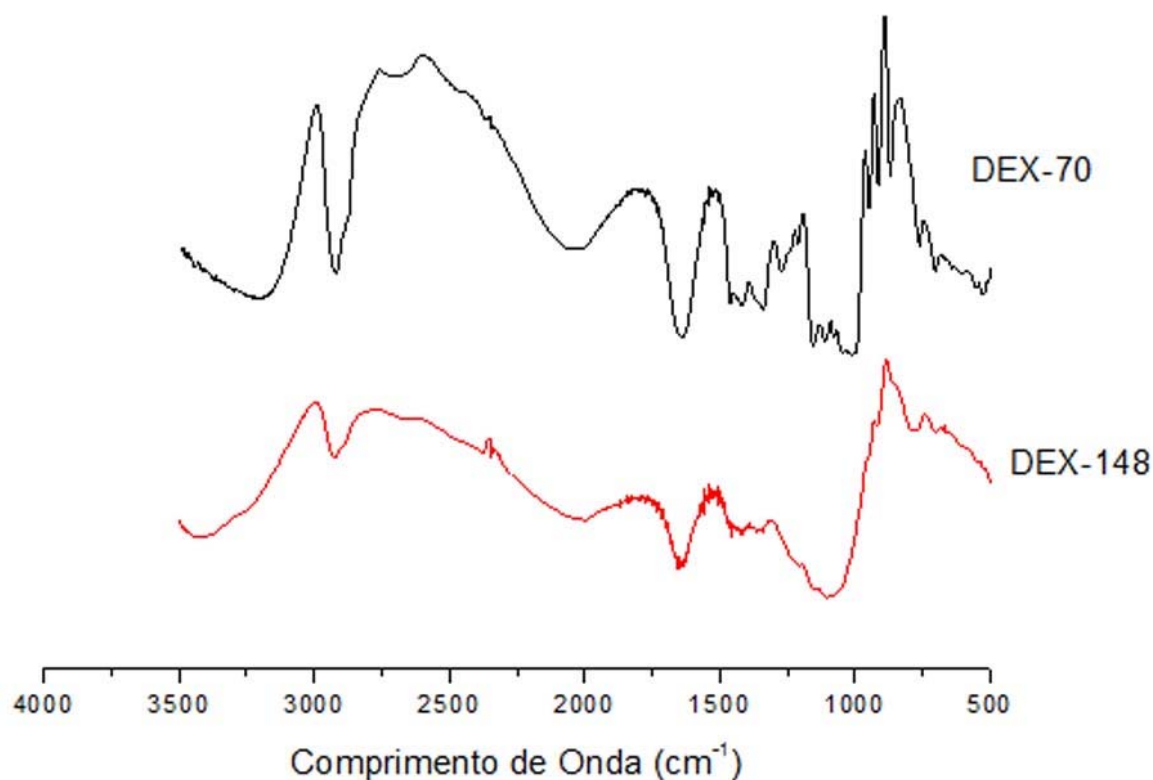


Fonte: Laboratório de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

Conforme observado em Silverstein (2006) nos espectros de absorção do Dextranos de 70 kDa e 148 kDa (Figura 6) pode-se observar uma banda larga

próxima de 3500 cm^{-1} resultante do estiramento dos grupos OH presentes na molécula dos polímeros. Pode-se verificar ainda a presença de uma banda em 2900 cm^{-1} referente a vibrações CH/CH₂. Também podemos observar entre 1500 e 1700 cm^{-1} , uma banda resultante da conjugação dos anéis (SILVERSTEIN, 2006).

Figura 6 - Espectros no Infravermelho dos Dextranos 70 e Dextrano 148

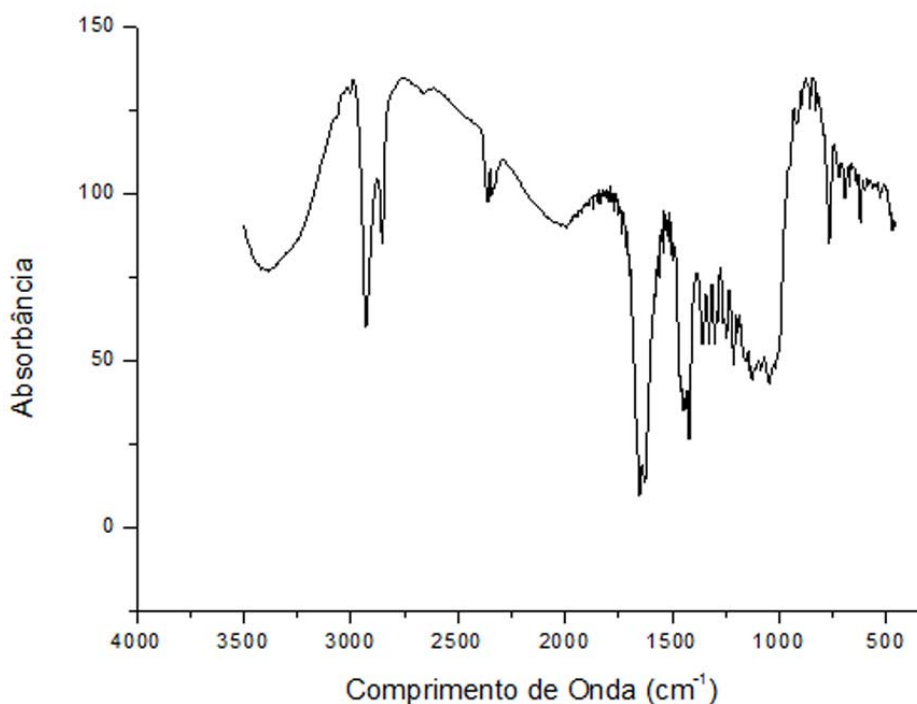


Fonte: Laboratório de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

A partir da comparação dos espectros de absorção na região do Infravermelho das misturas físicas e dos hidrogéis Figuras 7-12 pode-se observar a conservação dos grupos funcionais característicos do fármaco e do polímero, observa-se apenas uma espécie de junção dos espectros dos polímeros com o do fármaco. Pode ser verificado ao se fazer uma comparação dos espectros das misturas físicas 1:1:1 e 1:2:1 com seus respectivos hidrogéis, que houve uma redução nas bandas referentes ao estiramento dos grupos OH dos polímeros em 3500 cm^{-1} , bem como, das bandas referentes as vibrações de C-H das deformações axiais simétrica e assimétrica de CH₂ e CH₃, observadas no

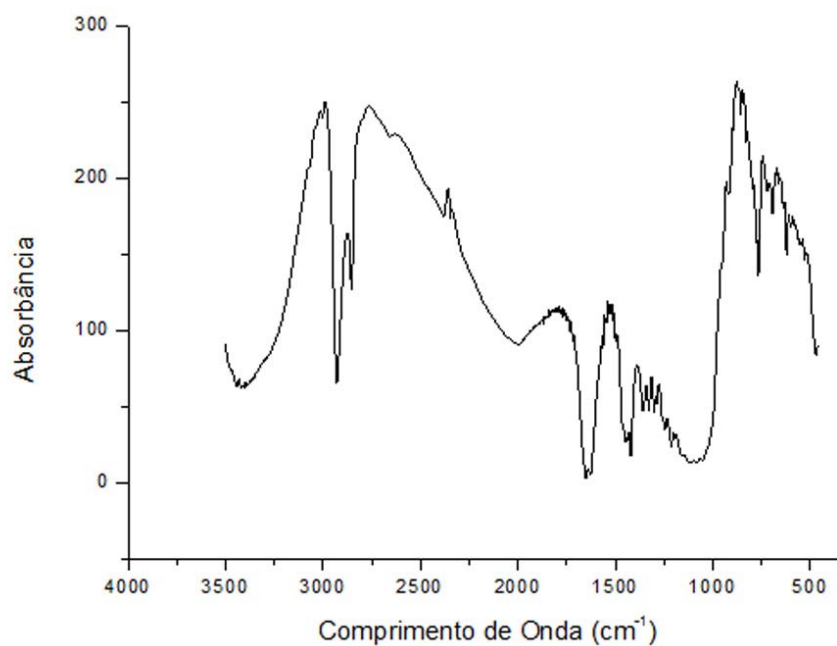
espectro do fármaco o que, provavelmente pode indicar uma possível interação entre o fármaco e os polímeros. Assim, é possível supor que há uma eventual interação entre os componentes da formulação.

Figura 7 - Espectro no Infravermelho da mistura física 1:1:1 (PZQ:DEX-70:DEX-148)



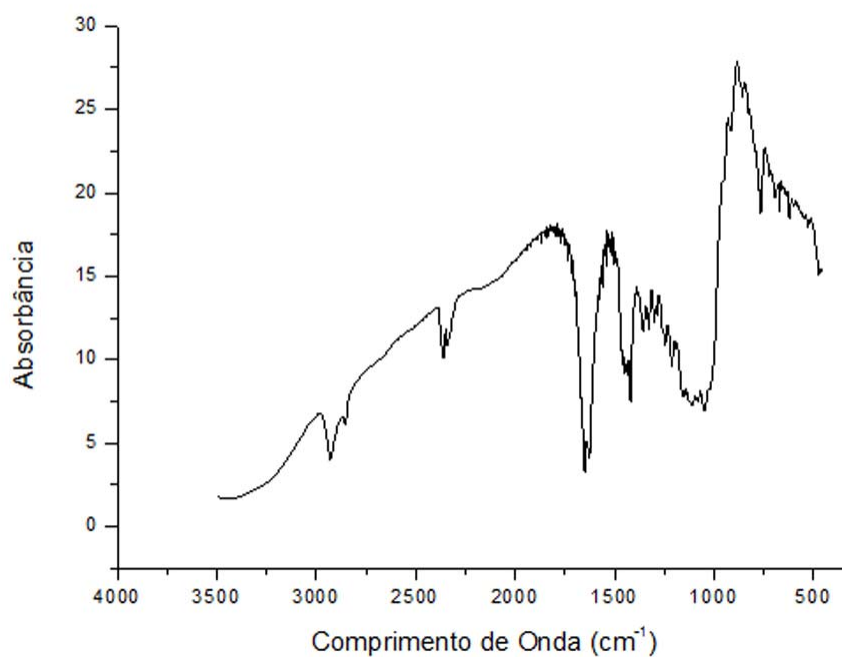
Fonte: Laboratório de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

Figura 8 - Espectro no Infravermelho da mistura física 1:2:1 (PZQ:DEX-70:DEX-148)



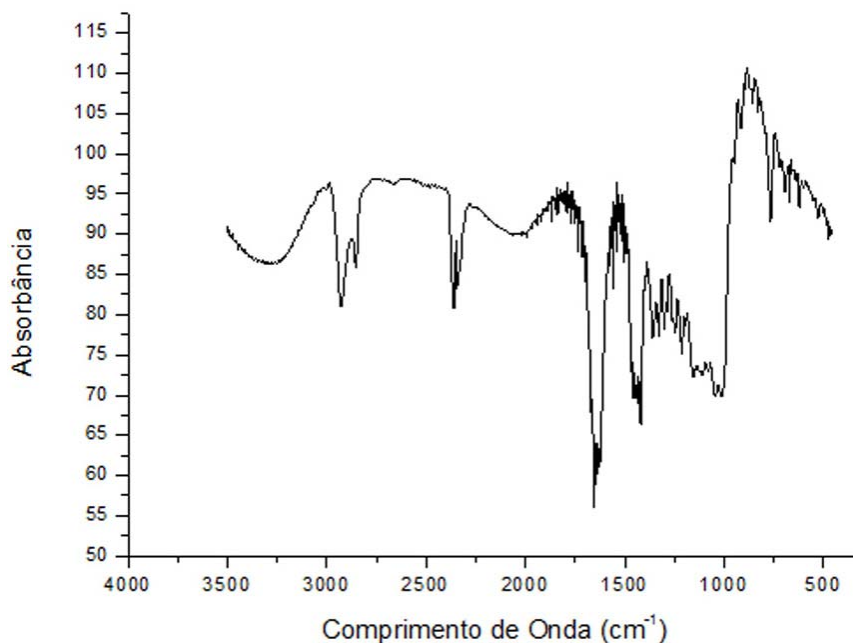
Fonte: Laboratório de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

Figura 9 - Espectro no Infravermelho da mistura física 1:2:2 (PZQ:DEX-70:DEX-148)



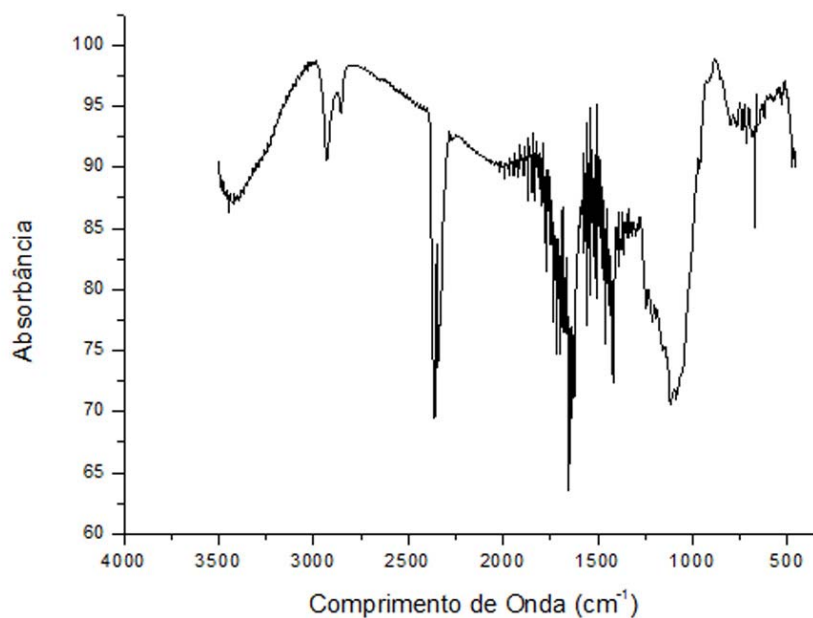
Fonte: Laboratório de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

Figura 10 - Espectro no Infravermelho do hidrogel 1:1:1 (PZQ:DEX-70:DEX-148)



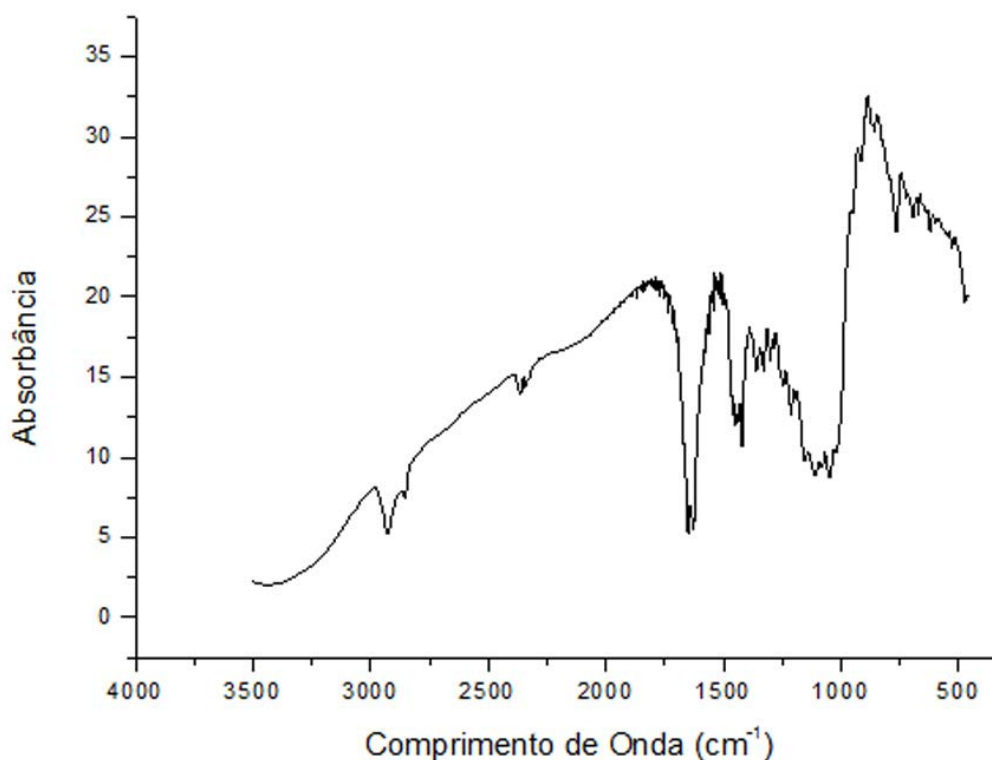
Fonte: Laboratório de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

Figura 11 - Espectro no Infravermelho do hidrogel 1:2:1 (PZQ:DEX-70:DEX-148)



Fonte: Laboratório de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

Figura 12 - Espectro no Infravermelho do hidrogel 1:2:2 (PZQ:DEX-70:DEX-148)

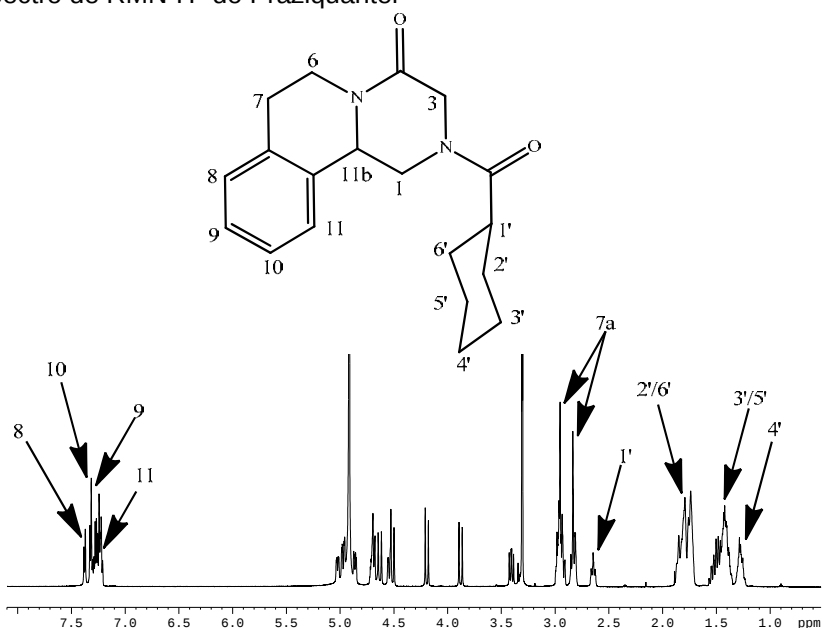


Fonte: Laboratório de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

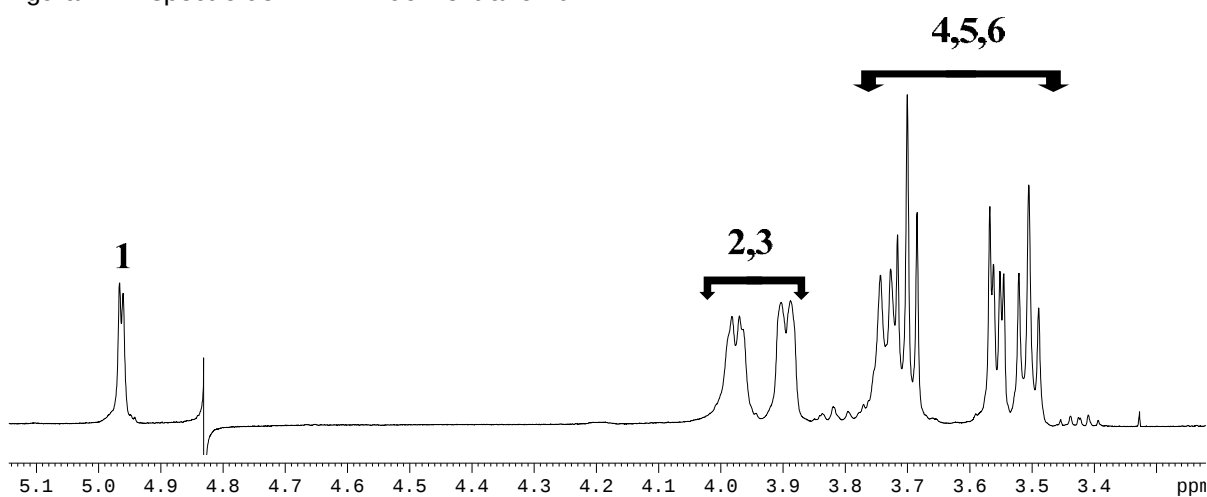
4.3.2. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN- H^1

Os estudos de interação vêm se tornando cada vez mais importantes no campo da descoberta de novos fármacos e medicamentos. Neste contexto, com as novas técnicas de RMN, tornou-se possível a compreensão das interações até o nível atômico (MEYER e PETERS, 2003), especialmente no estado de solução. Para esse estudo, foram aplicadas com sucesso as três técnicas mais utilizadas para avaliar as interações entre o praziquantel (Figura 13) e o dextrano (Figura 14).

Na figura 12, apenas os picos envolvidos na interação foram assinalados, e a nomenclatura molecular foi feita de acordo com um estudo anterior sobre praziquantel, realizado por El-Subbagh e Al-Badr (1998). Da mesma forma, na figura 14, as atribuições dos picos foram feitas de acordo com um estudo anterior (Young-il et al, 2011).

Figura 13- Espectro de RMN- H^1 do Praziquantel

Fonte: Laboratório de RMN, departamento de Química, UFSCar.

Figura 14- Espectro de RMN- H^1 do Dextrano 70

Fonte: Laboratório de RMN, departamento de Química, UFSCar.

A Figura 15C mostra que os prótons do ciclo-hexano e os do anel aromático do PZQ com um contato próximo com os prótons de dextrano sugerindo uma interação. Como o espectro de STD (Transferência de Diferença de Saturação) se desenvolve como resultado da transferência de saturação da molécula a ser irradiada para outra através de relaxamento transversal, as intensidades de sinal no STD dependem de dois fatores:

A) Quanto maior o número de prótons, maior será a intensidade e

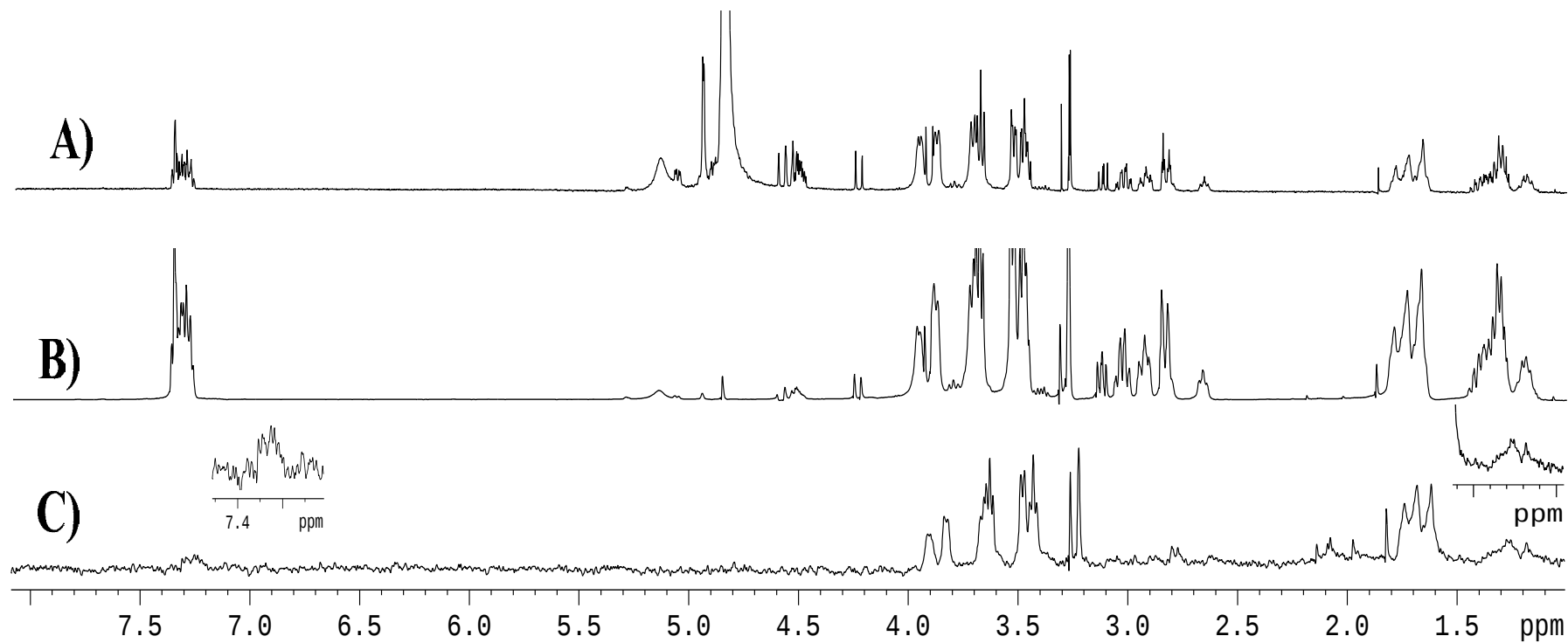
B) Quanto maior o tempo de saturação, maior o sinal.

O efeito do STD, portanto, reflete a quantidade relativa de saturação transferida a partir da molécula irradiada à molécula vizinha mais próxima e, desse modo, os números de moléculas a serem saturadas. No caso em estudo a irradiação foi aplicada na molécula de dextrano, enquanto que a transferência de saturação recebida como resultado da taxa de rotação rápida pela molécula PZQ. A parte da molécula que recebeu maior saturação da molécula de dextrano foi representada como sinal no espectro. Assim, podemos verificar que o ciclohexano do PZQ apresente uma maior interação com os prótons do dextrano. Além disso, os sinais aromáticos também mostraram algum tipo de interação com o polímero. Os espectros abaixo (Figura 15A e 15B) foram colocados para visualização clara da interação dos hidrocarbonetos alifáticos e região aromática (Figura 15).

Segundo o observado na figura 16, é pouco provável que o hidrogel 1:2:1 seja capaz de apresentar qualquer interação entre o PZQ e dextrano. O espectro acima é o sinal de um próton normal, enquanto B é o espectro de referência, no caso, a amostra de hidrogel 1:2:1. No espectro de STD na figura 16C, o sinal de dextrano mostrou que enquanto as moléculas de dextrano e PZQ são irradiadas, elas são incapazes de obter qualquer saturação. Então, podem-se obter apenas os sinais do dextrano.

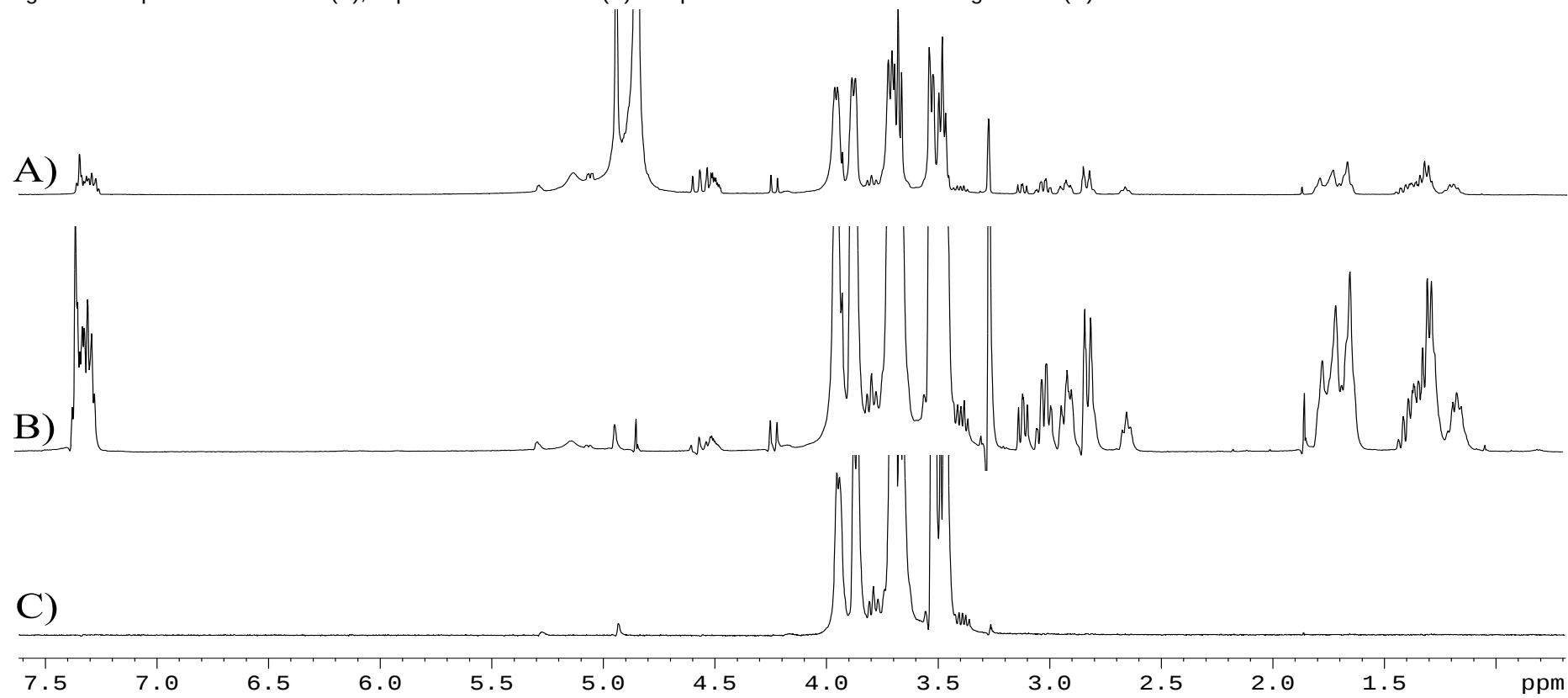
O hidrogel 1:2:2 mostrou resultados similares de padrão de interação com o hidrogel 1:1:1, mas a intensidade do sinal desta interação foi menor como mostrado na Figura 17C. A intensidade do sinal mantém-se inferior a este espectro porque o número de moléculas é menor em comparação com a molécula de dextrano, portanto, mostra menos interação.

Figura 15- Espectro de RMN- H^1 (A), espectro de referência (B) e espectro de STD-RMN do hidrogel 1:1:1 (C).



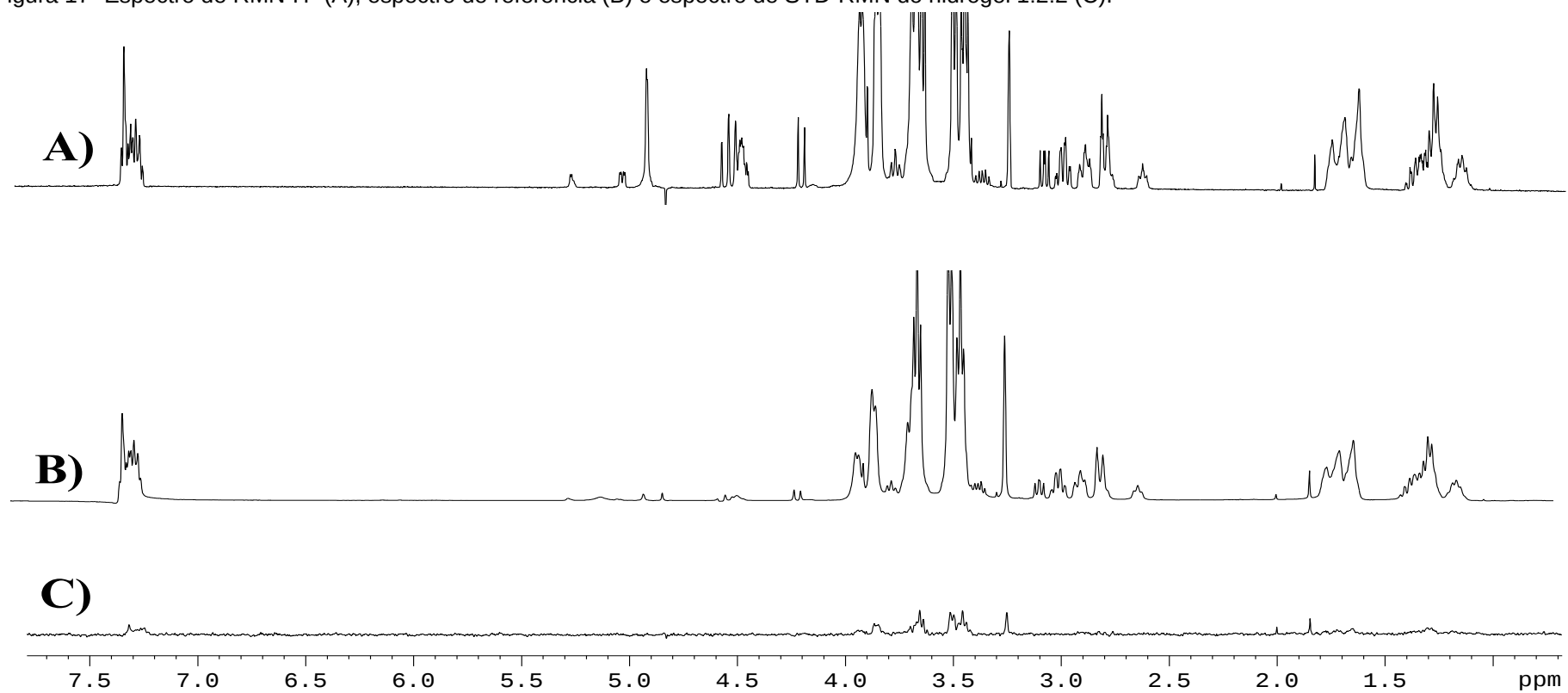
Fonte: Laboratório de RMN, departamento de química, UFSCar.

Figura 16- Espectro de RMN- H^1 (A), espectro de referência (B) e espectro de STD-RMN do hidrogel 1:2:1 (C).



Fonte: Laboratório de RMN, departamento de química, UFSCar.

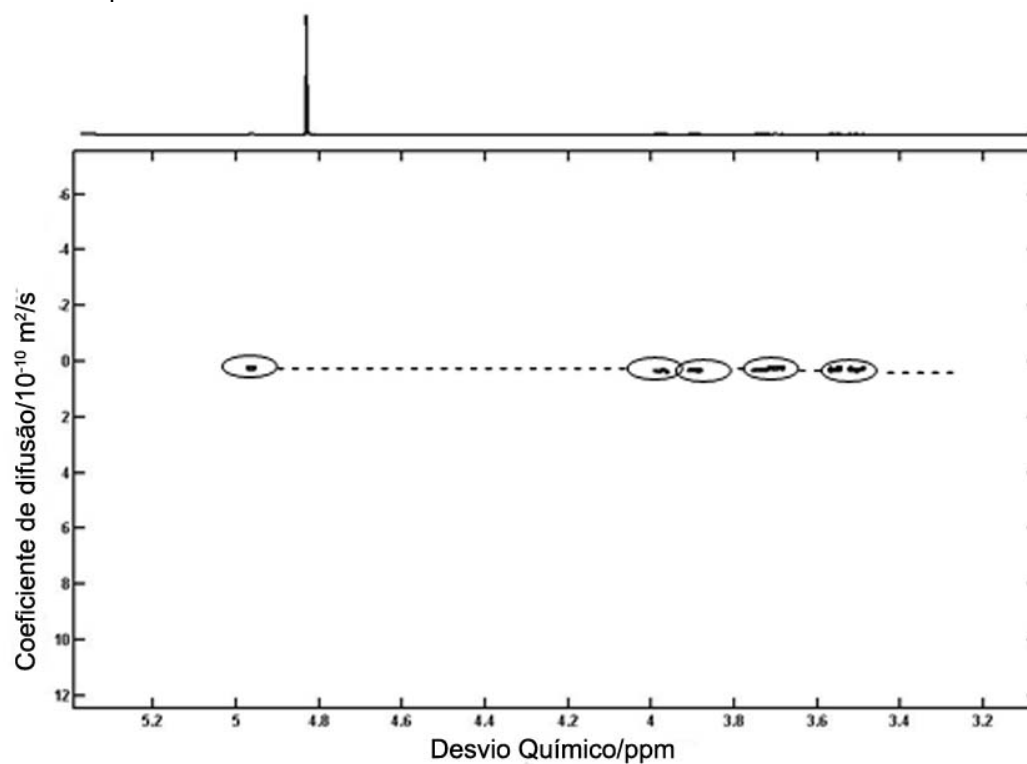
Figura 17- Espectro de RMN- H^1 (A), espectro de referência (B) e espectro de STD-RMN do hidrogel 1:2:2 (C).



Fonte: Laboratório de RMN, departamento de química, UFSCar.

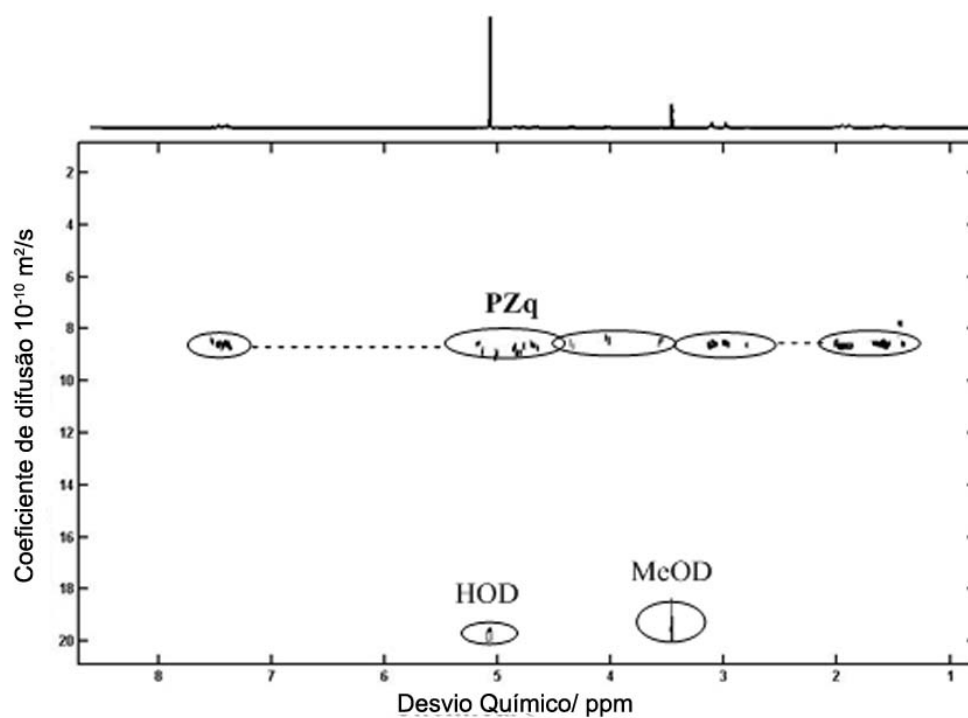
Como STD-RMN, espectroscopia ordenada de difusão (DOSY-RMN) também é relatada como sendo eficaz na identificação de interação entre as duas moléculas numa mistura (DERRICK, McCORD e LARIVE, 2002 e JAYAWICKRAMA et al, 1998). O fenômeno do DOSY é simples e baseado na anisotropia molecular; peso, tamanho e forma da molécula. A molécula de maior tamanho ou peso não altera o coeficiente de difusão de uma mistura ou a alteração do coeficiente de difusão é insignificante em comparação com a alteração de difusão de uma molécula menor. O cálculo da difusão é muito fácil, como os desvios químicos de RMN (em ppm) permanecem no espectro DOSY-2D ao longo de um eixo e os coeficientes de difusão ($10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) são calculados ao longo de outro. Agrupando todos os sinais em linha reta, informações a respeito do coeficiente de difusão de um único composto nos são dadas. Foram feitas as espectroscopias ordenadas de difusão das moléculas selecionadas (PZQ e DEX), bem como o hidrogel 1: 1: 1. Na Figura 18, o espectro DOSY 2D mostrou que o coeficiente de difusão de Dextrano foi próximo de $0,23 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, enquanto que o coeficiente de difusão de PZQ está perto $8,23 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, como mostrado na Figura 19. A análise da amostra deu provas claras da mudança no coeficiente de difusão da molécula de PZQ, enquanto que o dextrano manteve-se na mesma posição e, deste modo, mostrando que há uma interação entre fármaco e polímero. Ajustando sinal HOD a $20 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ como referência para ambos os espectros do coeficiente de difusão, o PZQ mostrou uma mudança importante de cerca de 4 pontos, uma clara evidência de interação no sentido do dextrano, como observado na figura 20.

Figura 18- Espectro de DOSY-RMN 2D do dextrano 70



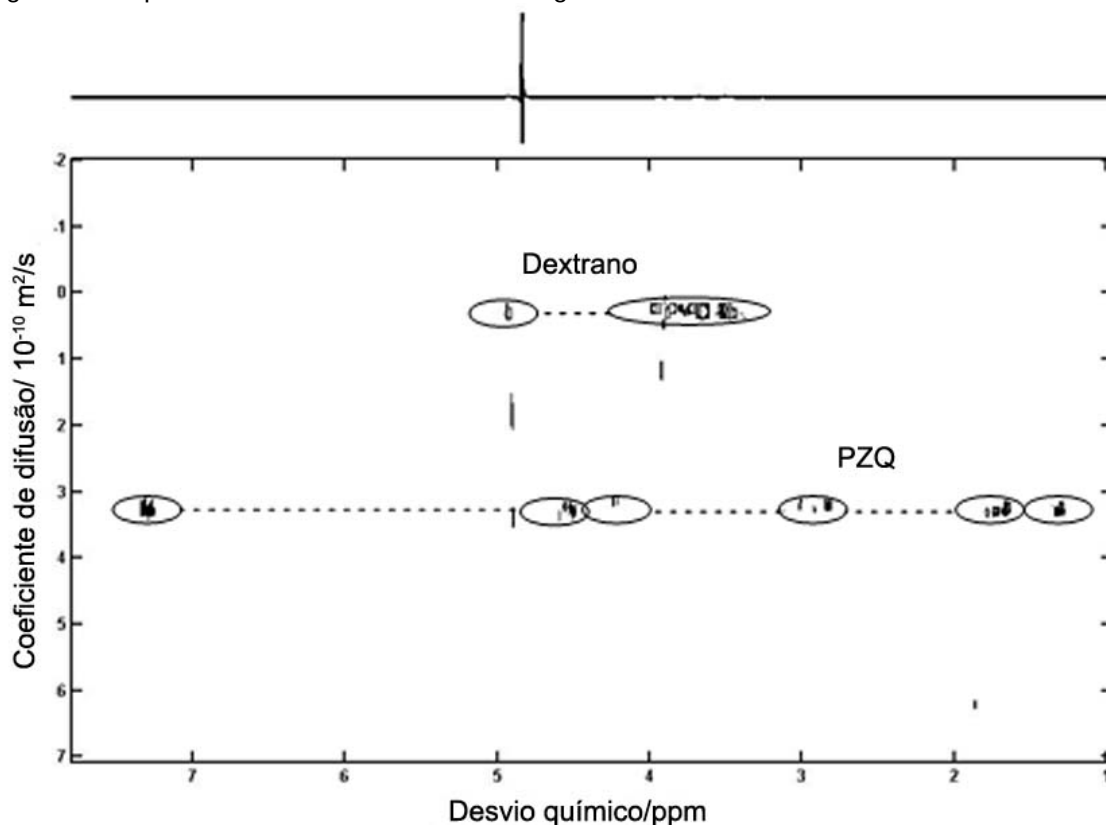
Fonte: Laboratório de RMN, departamento de química, UFSCar.

Figura 19- Espectro de DOSY-RMN 2D do praziquantel



Fonte: Laboratório de RMN, departamento de química, UFSCar.

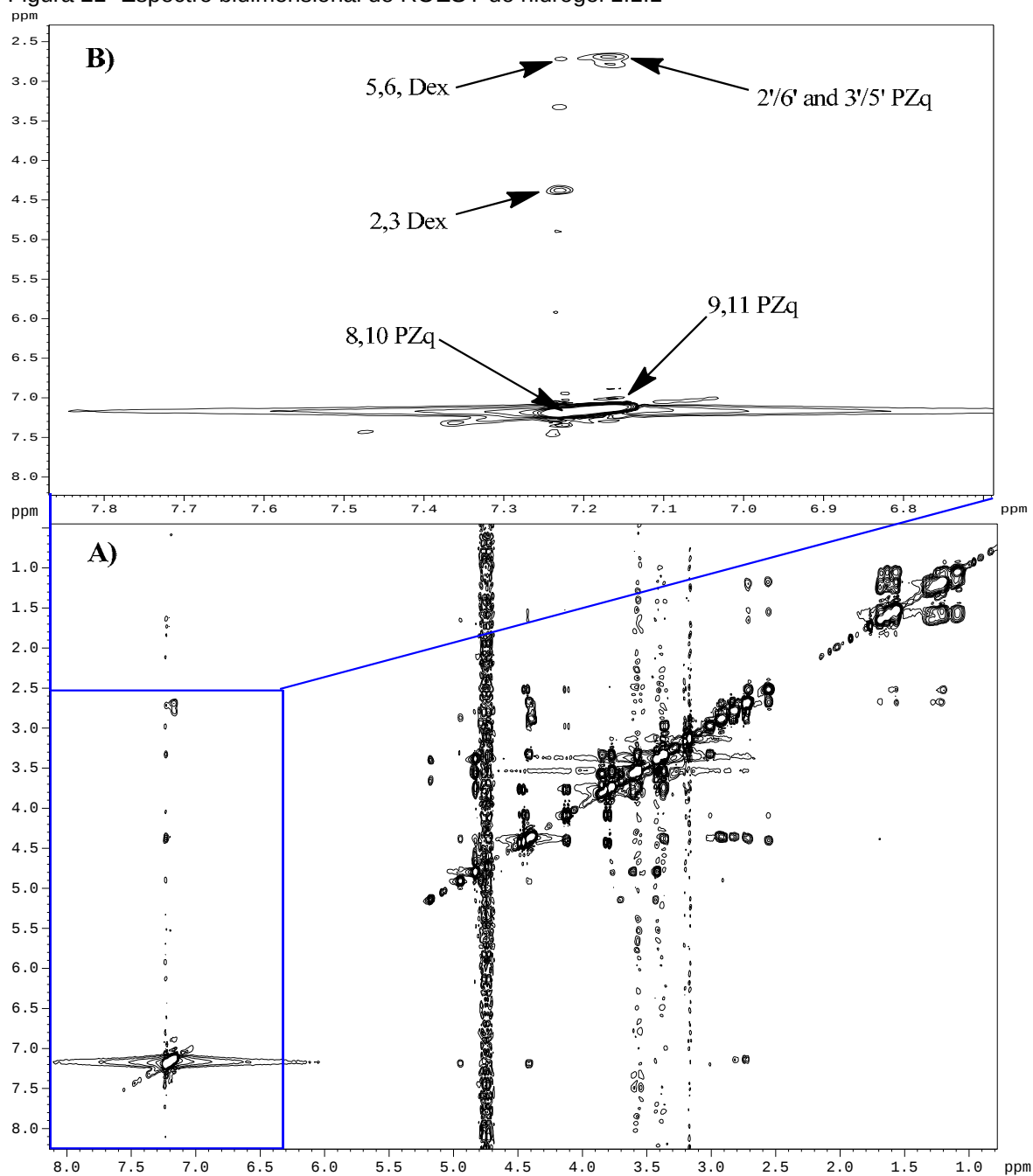
Figura 20- Espectro de DOSY-RMN 2D do hidrogel 1:1:1



Fonte: Laboratório de RMN, departamento de química, UFSCar.

O ROESY bidimensional do hidrogel 1:1:1 está apresentado na figura 21. Os picos cruzado do tipo NOEY da calda do ciclo-hexano do PZQ e hidrogênios 5 e 6 do dextrano podem ser vistos como mostrado na figura 21B. Do mesmo modo, os hidrogênios aromáticos também apresentaram o mesmo comportamento em relação aos hidrogênios 2, 3, bem como aos 5, 6 do dextrano. Ao contrário de estudo anterior realizado por De Jesus e colaboradores (2006), pode-se observar a interação de ambos, cauda ciclohexil, bem como a região aromática do PZQ. A diferença pode ser entendida pela geometria estrutural do dextrano, pois este é um polímero de cadeia longa e, o estudo anteriormente citado (DE JESUS, 2006) apresentou indícios de que a cauda ciclohexil se introduziu na cavidade central da molécula de β -ciclodextrina. No entanto, no caso do dextrano, isso não é possível. Logo, fica claro a partir de todos os resultados acima mencionados que tanto o anel aromático e a cauda do PZQ estão envolvidos na interação com o dextrano.

Figura 21- Espectro bidimensional de ROESY do hidrogel 1:1:1



Fonte: Laboratório de RMN, departamento de química, UFSCar.

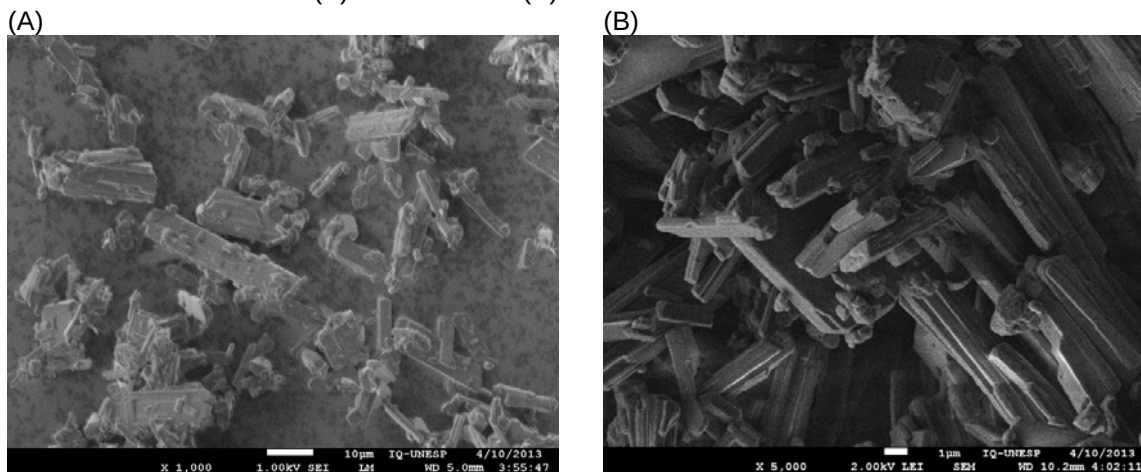
4.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

As técnicas de microscopia são particularmente empregadas em métodos de caracterização que envolvem a visualização de detalhes de um material que não são possíveis de serem observados a olho nu. Há três técnicas amplamente

utilizadas, são a microscopia óptica, a microscopia eletrônica de varredura e microscopia por sonda de varredura. As técnicas de microscopia eletrônica utilizam-se de elétrons para irradiar a amostra de interesse. A microscopia eletrônica de varredura aplica um feixe fino de uma fonte de energia sobre uma amostra. Esta técnica pode ser utilizada para estudos aprofundados das propriedades das superfícies de partículas de fármacos e medicamentos. Essa técnica é muito utilizada para caracterizar a morfologia e a forma de partículas, alcançando níveis de resolução de imagem extremamente altas até alguns nanômetros e tem um campo de visão flexível, além de propiciar uma maior ampliação e profundidade de foco, adequados para partículas de tamanhos de 0,1 a 1000 μm , que o torna uma ferramenta muito útil. Quando acompanhados com equipamentos de efeito de campo (FEG) e feixe focado de íons (FIB) são capazes navegar pelas áreas de interesse, ampliando ou reduzindo mais as imagens (SHUR e PRICE, 2012).

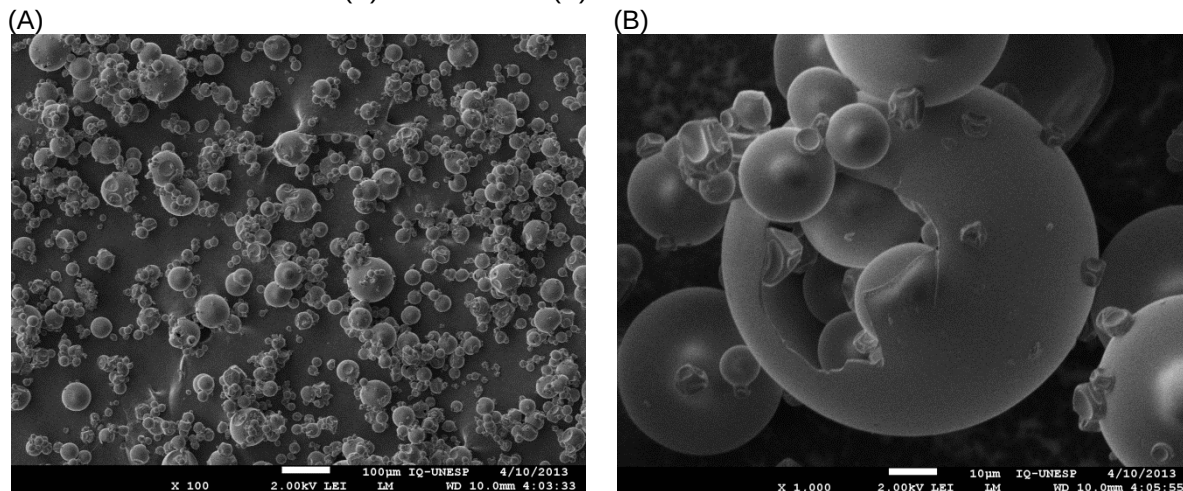
As figuras 22-24 mostram as fotomicrografias obtidas por MEV do praziquantel, dextranos 70 kDa e 148 kDa. As diferenças entre eles, misturas físicas e hidrogéis são evidentes. O PZQ possui uma forma cristalina, que se exibe em agrupamentos na forma de pequenos prismas (Figura 22), conforme observado por Cheng e colaboradores (2009) e Cheng e colaboradores (2010). O DEX-70 se apresenta na forma de partículas esféricas de natureza amorfa (Figura 23). Enquanto, o DEX-148 mostra uma estrutura parecida com flocos, também de natureza amorfa (Figura 24).

Figura 22- Fotomicrografias do praziquantel obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 1000 vezes (A) e 5000 vezes (B)



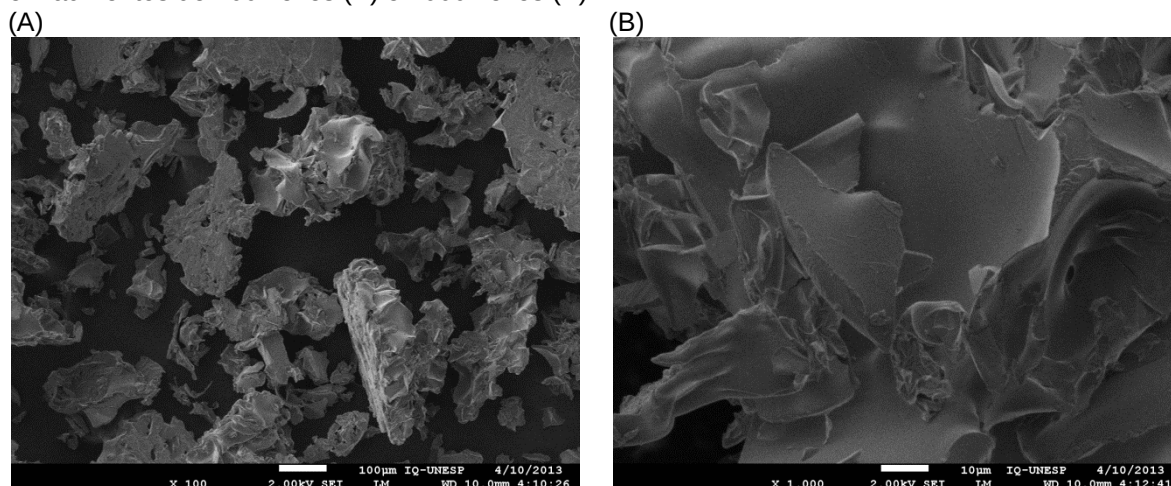
Fonte: Laboratório de Microscopia Avançada, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP.

Figura 23- Fotomicrografias do dextrano 70 kDa obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 100 vezes (A) e 1000 vezes (B)



Fonte: Laboratório de Microscopia Avançada, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP.

Figura 24- Fotomicrografias do dextrano 148 kDa obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 100 vezes (A) e 1000 vezes (B)

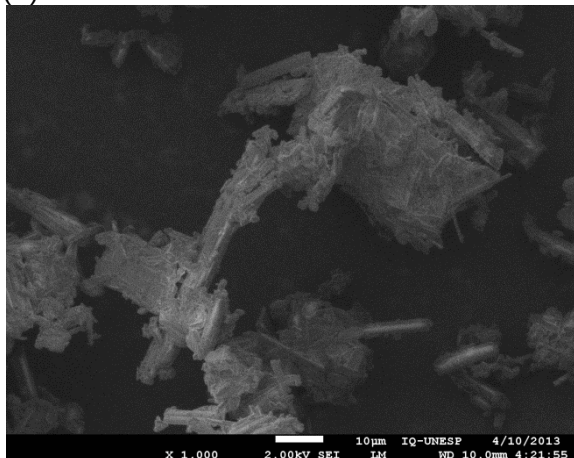


Fonte: Laboratório de Microscopia Avançada, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP

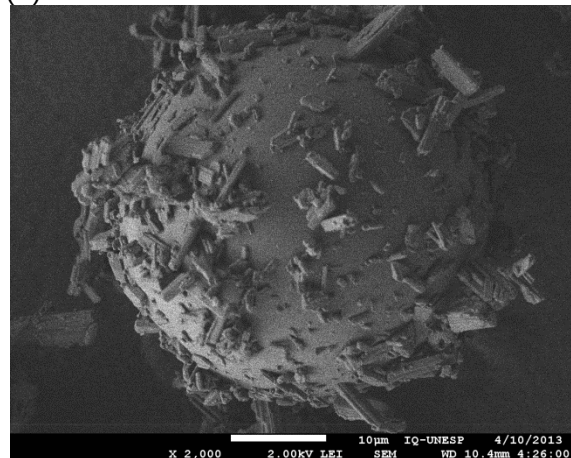
Nas figuras 25-27, temos as fotomicrografias das misturas físicas. Nelas, pode se observar que há uma deposição de cristais aderidos a superfície das partículas de polímero, o que pode, possivelmente, ter reduzido a área de superfície de contato do praziquantel com a água, retardando, assim, a difusão de moléculas no meio de dissolução, conforme o também observado por Lima (2009).

Figura 25- Fotomicrografias da mistura física 1:1:1 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 1000 vezes e 2000 vezes.

(A)



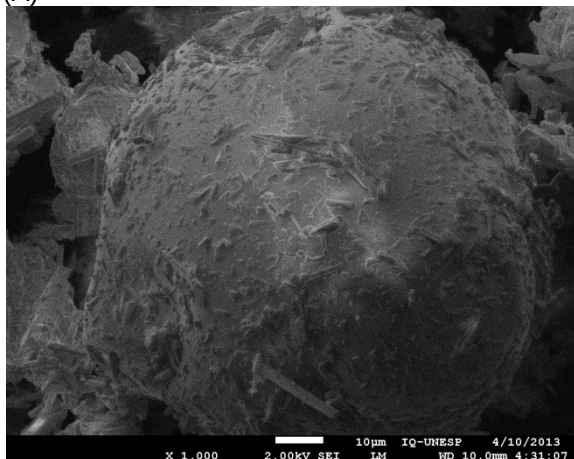
(B)



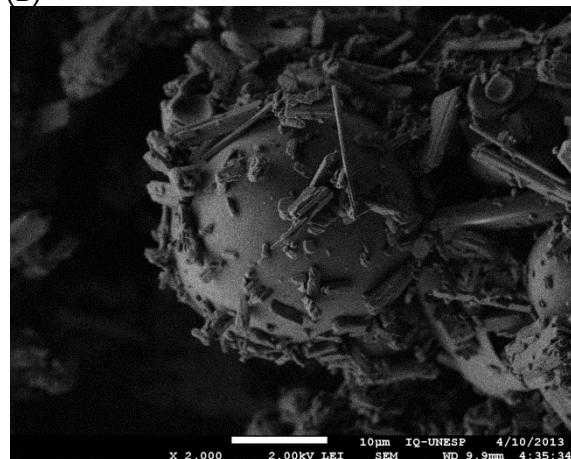
Fonte: Laboratório de Microscopia Avançada, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP

Figura 26- Fotomicrografias da mistura física 1:2:1 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 1000 vezes e 2000 vezes.

(A)

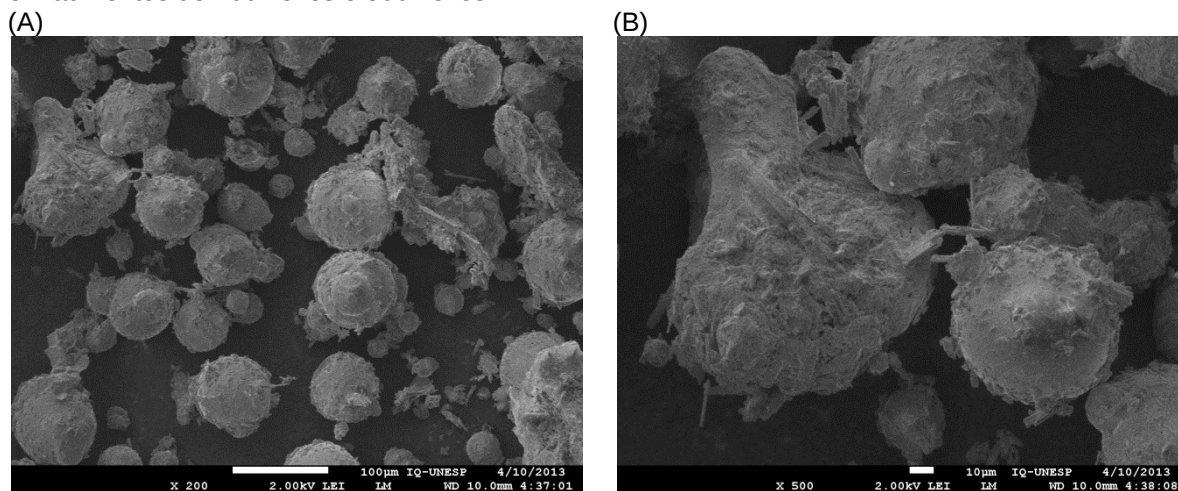


(B)



Fonte: Laboratório de Microscopia Avançada, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP

Figura 27- Fotomicrografias da mistura física 1:2:2 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 200 vezes e 500 vezes.

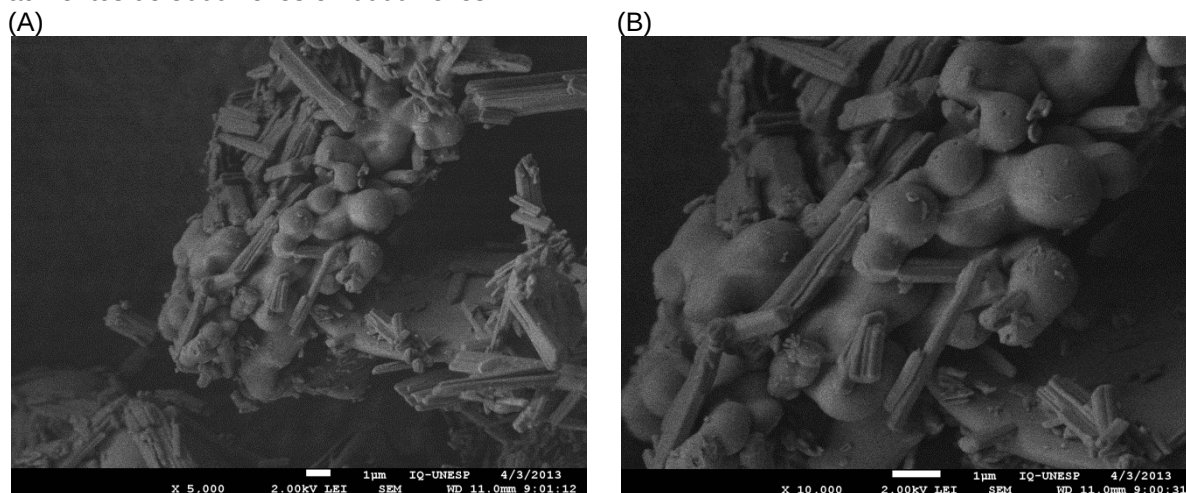


Fonte: Laboratório de Microscopia Avançada, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP

Nas figuras 28-30, observamos as fotomicrografias obtidas por MEV dos hidrogéis. Percebe-se que há evidentes sinais de modificação das características dos materiais. Pode se verificar a formação de aglomerados poliméricos preenchidos e cobertos por finos cristais de PZQ. Isso se torna mais visível a medida que a proporção de polímeros envolvida aumenta como nos hidrogéis 1:2:1 e 1:2:2. Provavelmente, essas alterações ocorreram devido à influência do procedimento de obtenção das amostras e influenciaram na solubilidade do fármaco. Com cristais menores e bem dispersos na matriz polimérica formada a superfície de contato aumentada pode ter favorecido sua solubilidade do PZQ. Algo parecido foi observado por Torres, Torrado e Torrado (1999), em seu estudo foram preparadas dispersões sólidas de PZQ:PVP e foi notado a formação de estruturas lamelares de PVP contendo filamentos identificados com sendo cristais PZQ, o que mostrou um aumento na solubilidade do fármaco, principalmente, na formulação de 1:5.

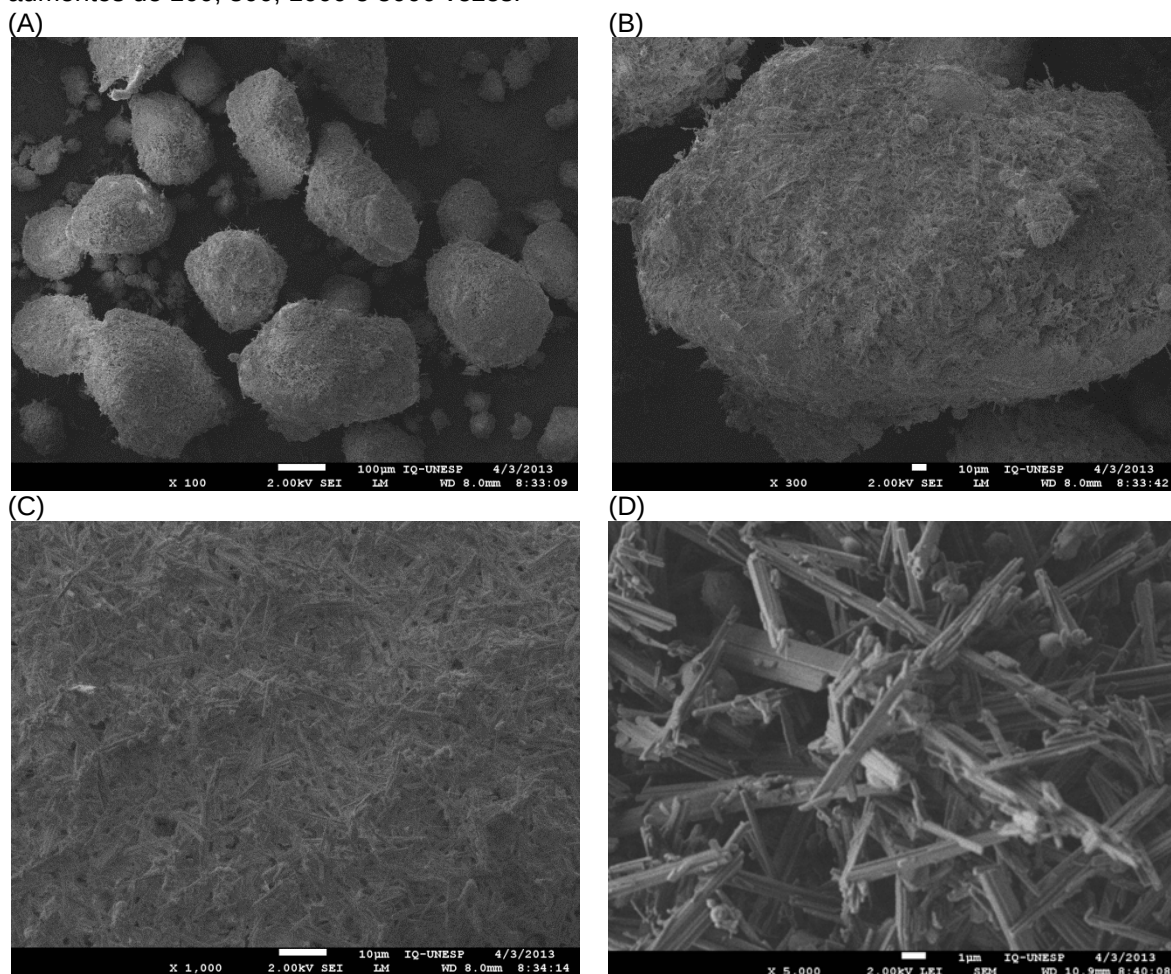
Assim, pode se supor que, provavelmente, quando maior a quantidade de ambos os polímeros, menores tornam-se os cristais de PZQ e mais disperso o fármaco fica na matriz polimérica.

Figura 28- Fotomicrografias do hidrogel 1:1:1 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 5000 vezes e 10000 vezes.



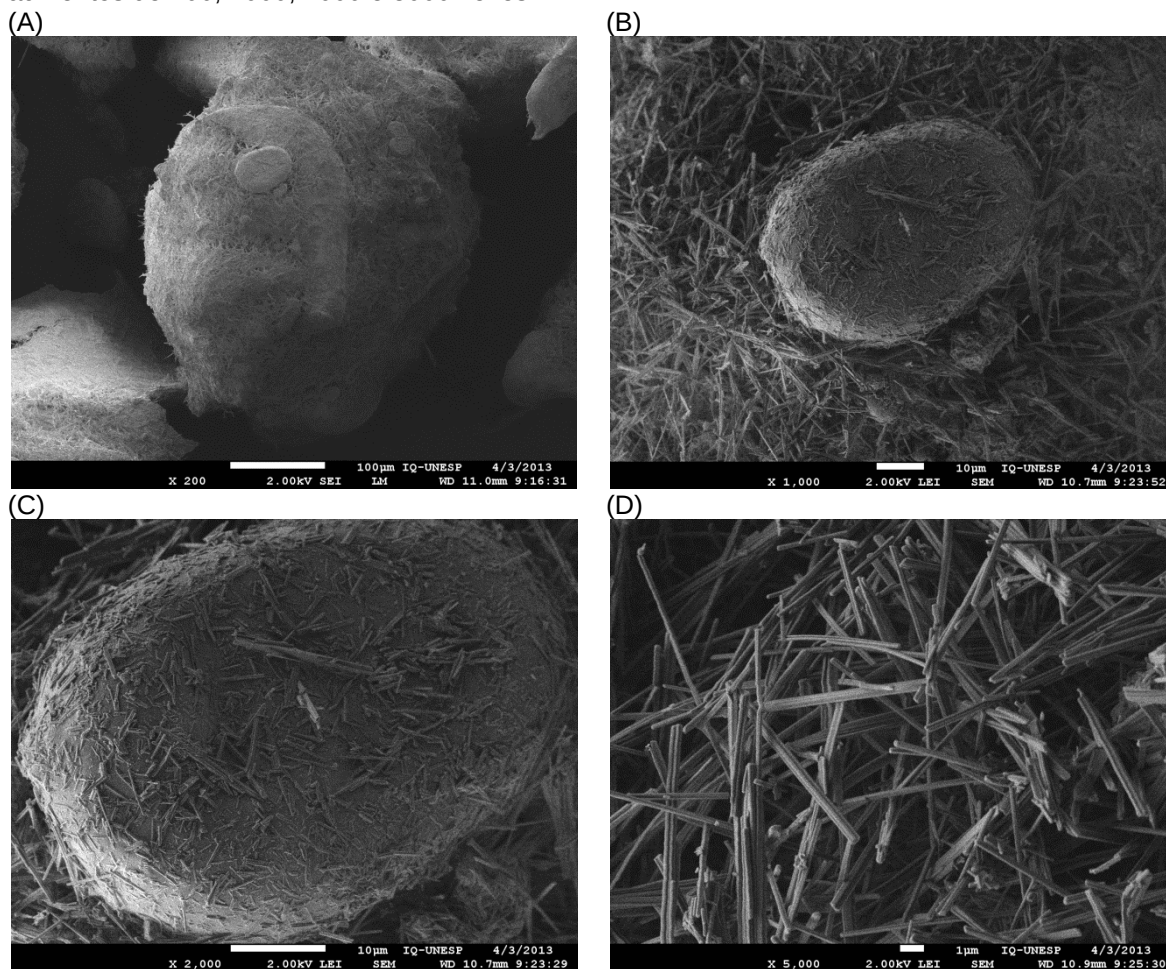
Fonte: Laboratório de Microscopia Avançada, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP

Figura 29- Fotomicrografias do hidrogel 1:2:1 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 100, 300, 1000 e 5000 vezes.



Fonte: Laboratório de Microscopia Avançada, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP

Figura 30- Fotomicrografias do hidrogel 1:2:2 obtidas por microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 200, 1000, 2000 e 5000 vezes.



Fonte: Laboratório de Microscopia Avançada, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP

4.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

DSC, além de outras técnicas de análise térmica, vem sendo utilizada na caracterização de fármacos e medicamentos desde os anos 1950 (FORD e MANN, 2012). DSC é uma técnica termoanalítica utilizada para observar pequenas alterações térmicas entre uma amostra e uma referência. É um método eficiente e válido para a demonstração de mudanças estruturais, permitindo a verificação de mudanças nas estruturas de materiais brutos e biológicos através de seu comportamento térmico como consequência da aplicação de calor sobre eles (FERENCZ, NEDVIG e LŐRINCZY, 2010).

Certamente, a principal razão para a utilização desta técnica é a simplicidade das medidas da DSC. Nela, a taxa de fluxo de calor trocado pela amostra com seu

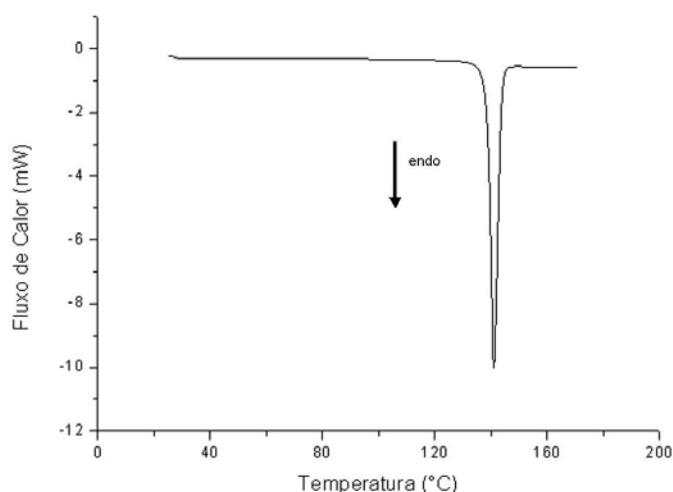
recipiente, no caso um cadinho metálico, pode ser integrado ao longo do tempo e a totalidade da amostra (STÉPHANE et al, 2012). A caracterização por DSC pode identificar produtos farmacêuticos, fármacos, processos endotérmicos e exotérmicos (OLIVEIRA, YOSHIDA e GOMES, 2011).

Também podemos encontrar vários estudos relacionados à aplicação da calorimetria exploratória diferencial (DSC) na área farmacêutica para avaliação de pré-formulações, pureza, compatibilidade de formulação farmacêutica, identificação de polimorfos com determinação de entalpias, estabilidade e decomposição térmica de fármacos e medicamentos e definição da estabilidade dos fármacos e formulações farmacêuticas, levando até ao estabelecimento de condições de armazenamento dos medicamentos (OLIVEIRA, YOSHIDA e GOMES, 2011).

As figuras 31-34 mostram as curvas de DSC do PZQ, DEX-70, DEX-148, misturas físicas e hidrogéis. A tabela 1 apresenta os dados obtidos nas análises de DSC do PZQ, DEX-70, DEX-148, misturas físicas e hidrogéis.

Na figura 31, podemos observar que o praziquantel apresenta um pico endotérmico agudo e acentuado em 141,07°C, o que dá indícios de sua natureza cristalina e comprova que é realmente o fármaco, uma vez que esta temperatura é correspondente ao ponto de fusão do fármaco (HUSSEIN et al, 1998; TORRE et al, 1999; LIU et al, 2004; MAINARDES, 2006).

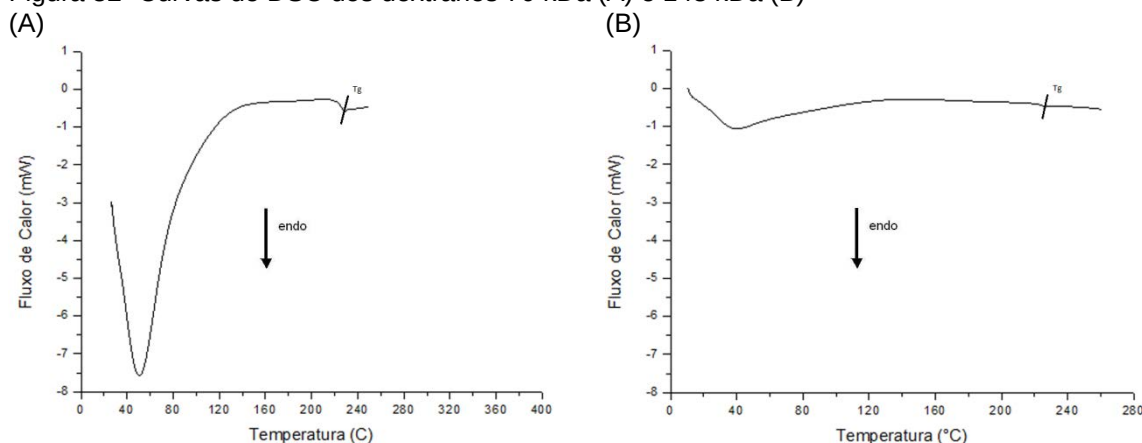
Figura 31- Curva de DSC do praziquantel



Fonte: Laboratório de Análise Térmica, Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNESP

Na figura 32, pode-se notar que há a presença de um pico endotérmico largo em aproximadamente 50°C na curva de DSC do dextrano 70 kDa (Figura 30A) e um em aproximadamente em 39°C na curva do 148 kDa (Figura 30B). Esses picos indicam que houve a evaporação de água aprisionada as moléculas de dextrano, conforme relatado por Stenekes e colaboradores (2001) e Zhang e Chu (2002). A razão para essa água fracamente ligada ocorrer é a presença de grande quantidade de grupos hidroxil na cadeia polimérica do dextrano (ZHANG e CHU, 2002). Além disso, podemos observar em ambas, a existência de uma transição vítrea (T_g) acima de 200 °C (figura 30). Segundo Zhang e Chu (2002), essa T_g em uma temperatura tão alta indica que é um material semicristalino ou que não há nenhuma cristalinidade, ou seja, o dextrano é um polímero amorfo. A causa para uma T_g tão alta são as fortes ligações de hidrogênio que existem entre as macromoléculas de dextrano (ZHANG e CHU, 2002).

Figura 32- Curvas de DSC dos dextranos 70 kDa (A) e 148 kDa (B)

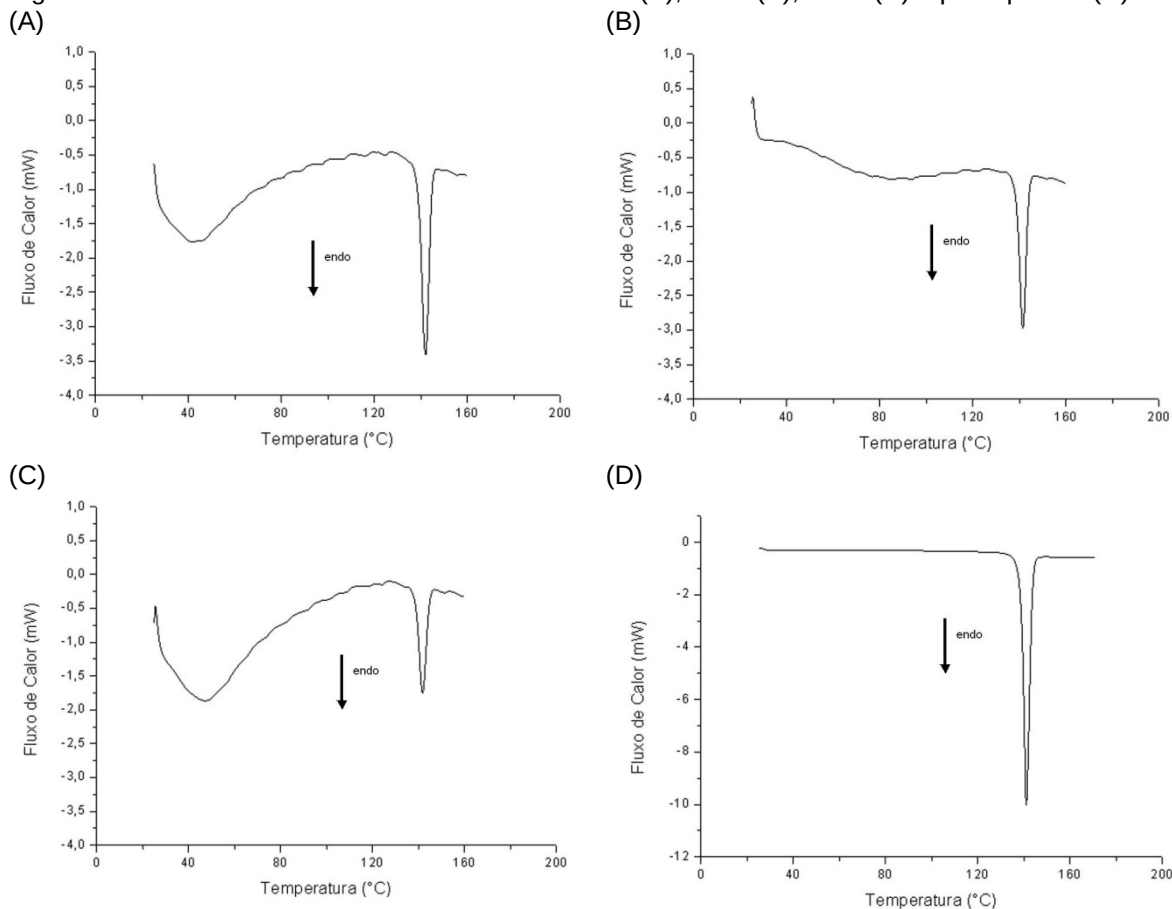


Fonte: Laboratório de Análise Térmica, Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNESP

Na figura 33 podemos examinar as curvas de DSC das misturas físicas e do PZQ, como pode se notar todas as misturas físicas apresentaram o mesmo pico largo endotérmico observado nos polímeros, o que é uma indicação de presença de água fracamente ligada que foi evaporado ao longo do procedimento do DSC. Além disso, pode se verificar que há em todas as misturas um pico endotérmico longo e agudo em 141°C, o que aponta para a presença do praziquantel sem grandes mudanças, uma vez que o pico não se deslocou muito em relação ao observado no DSC do PZQ livre (Figura 31 e 33C). Logo, pode se constatar que possivelmente

não houve nenhuma alteração do fármaco, nem interação deste com os polímeros no que se refere as misturas físicas e sua avaliação por DSC. As poucas diferenças observadas na intensidade do pico do praziquantel se deve, provavelmente, a diluição do fármaco no polímero e, também, devido ao processo de pulverização realizado para a obtenção das misturas físicas, que pode ter reduzido o tamanho dos cristais.

Figura 33- Curvas de DSC das misturas físicas 1:1:1 (A), 1:2:1 (B), 1:2:2 (C) e praziquantel (D)

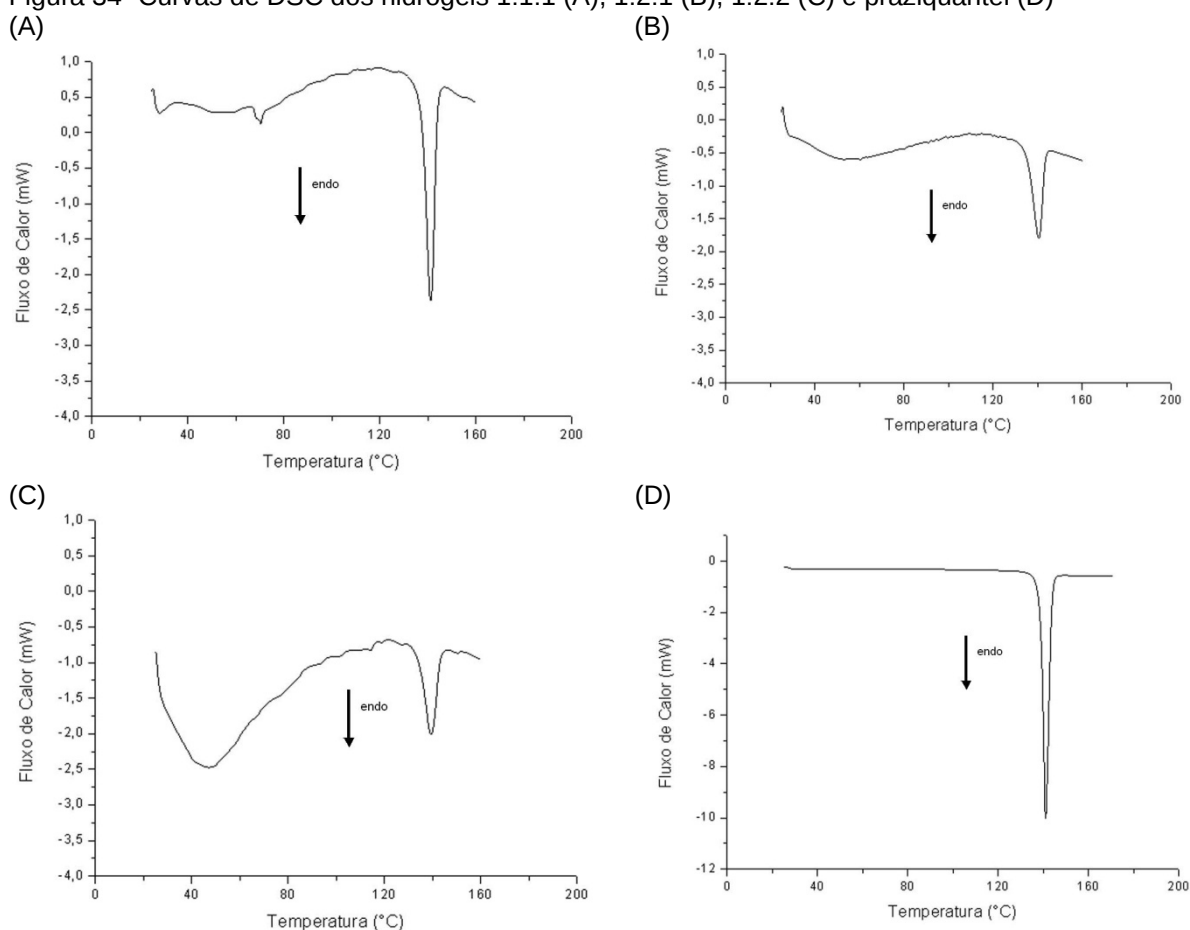


Fonte: Laboratório de Análise Térmica, Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNESP

Na figura 34, pode se perceber a existência de um pico endotérmico largo nas amostras de hidrogel, novamente, devido à presença de água ligada as moléculas do polímero, provavelmente, pela exposição das formulações a umidade atmosférica, já que estas passaram por um processo de liofilização na sua preparação. Da mesma forma, podemos observar a presença do pico endotérmico do praziquantel. No entanto, podemos verificar que a área sob o pico do PZQ nos hidrogéis vai diminuindo à medida que a proporção de polímeros vai aumentando,

bem como podemos observar em menor grau nas misturas físicas (Figura 33). Pode-se supor, portanto, que esses eventos possam ser um reflexo do que já foi observado nas fotomicrografias do MEV. Em outras palavras, há a formação de cristalitos e, possivelmente, parte do fármaco que não está presente nesses pequenos cristais afilados pode estar disperso na matriz polimérica. Esse provável fenômeno acaba por alterar de forma moderada as propriedades físico-químicas do praziquantel, diminuindo a quantidade de energia necessária para fundir o fármaco. Além disso, outra hipótese provável é a de que há praziquantel amorfo, devido à pulverização realizada no final do processo de obtenção das amostras.

Figura 34- Curvas de DSC dos hidrogéis 1:1:1 (A), 1:2:1 (B), 1:2:2 (C) e praziquantel (D)



Fonte: Laboratório de Análise Térmica, Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNESP

Na Tabela 1, podemos verificar que as entalpias esperadas e encontradas para as amostras de hidrogéis e misturas físicas. Podemos observar que houve uma redução na quantidade de energia necessária para se romper os cristais de praziquantel, comparando as amostras e o fármaco livre. Essas baixas entalpias

indicam que houve uma alteração da estrutura dos cristais de praziquantel para cristalitos que, provavelmente, estão dispersos na matriz polimérica, corroborando com a hipótese apresentada com base nas curvas de DSC. Além disso, podemos verificar que a medida que as proporções de polímero aumentam a quantidade de energia necessária para romper as ligações intermoleculares dentro dos cristais de praziquantel diminui, o que indica que o fármaco se torna progressivamente mais disperso no interior matriz na forma de cristalitos, podendo alcançar, possivelmente, um estado cada vez menos cristalino e disperso a medida que as proporções de polímero aumentam. No entanto, pode-se observar que não houve uma grande variação da Entalpia esperada para a encontrada, o que indica que os eventos ocorreram próximos do que era esperado, sem grandes alterações.

Entretanto, em trabalho anterior realizado por Campos (2013), foi visto que as moléculas de PZQ nos cristais do fármaco estão unidas por ligações intermoleculares muito fortes, enquanto que nos hidrogéis e misturas físicas são mais brandas. Isso ocorre devido às moléculas de PZQ estarem mais separadas umas das outras na rede polimérica do dextrano. Além disso, existem interações entre as moléculas de praziquantel e dextrano, mas extremamente mais fracas que as que ocorrem entre as moléculas do fármaco. Portanto, a quantidade de energia necessária para a fusão do PZQ é menor nos hidrogéis que no fármaco livre, conforme Campos e colaboradores (2013). Além disso, não podemos ver grandes diferenças entre os hidrogéis e suas respectivas misturas físicas. Isso pode ter ocorrido devido a pulverização na preparação das amostras, que reduz o tamanho das partículas de ambas, tornando suas entalpias muito próximas. Mesmo assim, os resultados confirmam a presença de cristalitos dispersos na matriz polimérica, de acordo com o observado nas fotomicrografias de MEV.

Assim, supõe-se que essa redução no pico do PZQ e, conseqüentemente, na quantidade de energia para sua fusão, ocorra em parte, devido às interações fracas das moléculas do fármaco entre si e com o polímero, bem como, pela dispersão molecular e formação de cristalitos. Abaixo, pode se examinar um resumo de todos os dados obtidos pelo DSC (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados do DSC

Amostras	Temperatura <i>onset</i> (°C)	Temperatura do pico (°C)	Entalpia esperada (ΔH) (J/g)	Entalpia encontrada (ΔH) (J/g)
HG 1:1:1	137,39	141,07	37,63	33,3
MF 1:1:1	138,82	142,02	29,92	24,47
HG1:2:1	135,08	140,59	18,60	18,23
MF1:2:1	138,5	141,54	22,47	19,38
HG 1:2:2	134,29	139,25	17,76	16,66
:MF 1:2:2	138,7	141,76	19,95	14,66
PZQ	137,7	141,2	-	89,87
DEX-70	-	-	-	-
DEX-148	-	-	-	-

Fonte: Laboratório de Análise Térmica, Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNESP

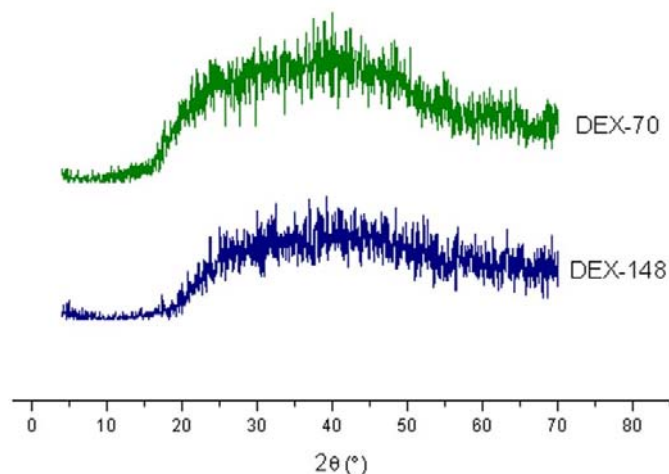
4.3.5. Difratometria de Raios –X

A difração de Raios-X é uma técnica muito utilizada para determinação da estrutura dos materiais. Quando, por exemplo, um material cristalino é irradiado com Raios-X, ele age como uma grade extensa e bem definida que gera um padrão de difração, que apresenta numerosos sinais agudos, que são conhecidos como picos de difração de Bragg. Pela análise da posição, medida e intensidade desses picos pode-se determinar características espaciais da grade, ou seja, é possível definir a organização tridimensional do átomos do material cristalino (PETKOV, 2008).

As figuras 35 e 36 mostram os difratogramas do praziquantel, dextrano 70 e 148, misturas físicas e hidrogéis.

Na figura 35, pode-se notar uma larga faixa de picos menores e agudos, que apontam para a presença de um material amorfo, no caso o dextrano (Yuan et al, 2009).

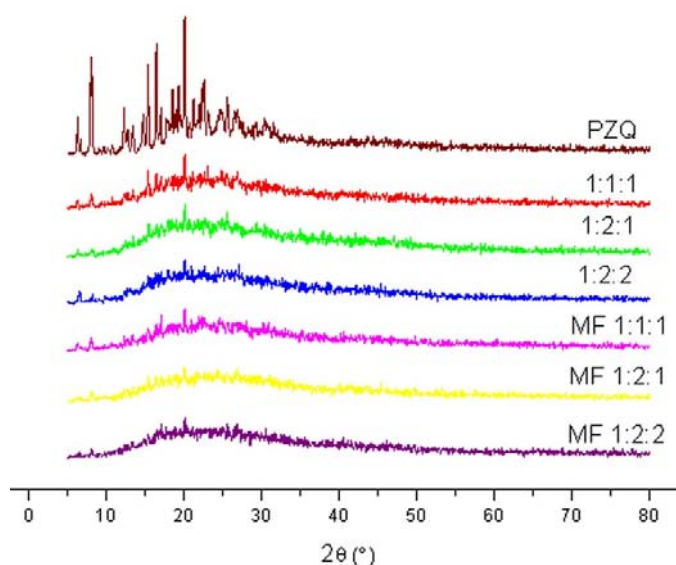
Figura 35 - Difratoograma dos dextranos 70 kDa e 148 kDa



Fonte: Laboratório de Difração de Raios-X, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP.

Na figura 36, é possível observar que o PZQ apresenta uma estrutura cristalina, que pode ser notada pelos picos de difração estreitos e intensos em aproximadamente 6° e 8°, além de uma série de picos entre 10° e 25°, conforme observado também por Cheng e colaboradores (2010) e Passerini e colaboradores (2006).

Figura 36 - Difratoogramas do praziquantel, hidrogéis (1:1:1, 1:2:1 e 1:2:2) e misturas físicas (MF1:1:1, MF1:2:1, MF1:2:2)



Fonte: Laboratório de Difração de Raios-X, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP.

Pode-se observar, ainda, na figura 36, que há uma diferença entre os difratogramas das misturas físicas e dos hidrogéis. É possível notar que há sinais mais da presença do PZQ nos hidrogéis, devido aos picos característicos do fármaco muito mais acentuados e presentes em todas as formulações, enquanto que nas misturas físicas, os mesmo picos quase não aparecem e são de intensidade branda. Isso, provavelmente, ocorre devido a pulverização realizada no preparo das misturas físicas.

Já no caso dos hidrogéis, pode se supor que conforme o observado nos estudos de DSC, os sinais se apresentariam mais fortes que os das misturas físicas, pois o praziquantel se apresenta na forma de cristalitos filamentosos. No entanto, em relação ao PZQ puro, ele apresentou um sinal fraco, provavelmente, devido a uma possível dispersão de cristalitos do fármaco na matriz polimérica. Isto posto, podemos considerar que é capaz de estar ocorrendo uma alteração nas propriedades cristalinas do fármaco, à medida que a proporção de polímero em relação ao fármaco aumenta, análogo ao que já foi observado nas análises com a ajuda do DSC, RMN-H¹ e MEV.

4.4. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE INTUMESCIMENTO

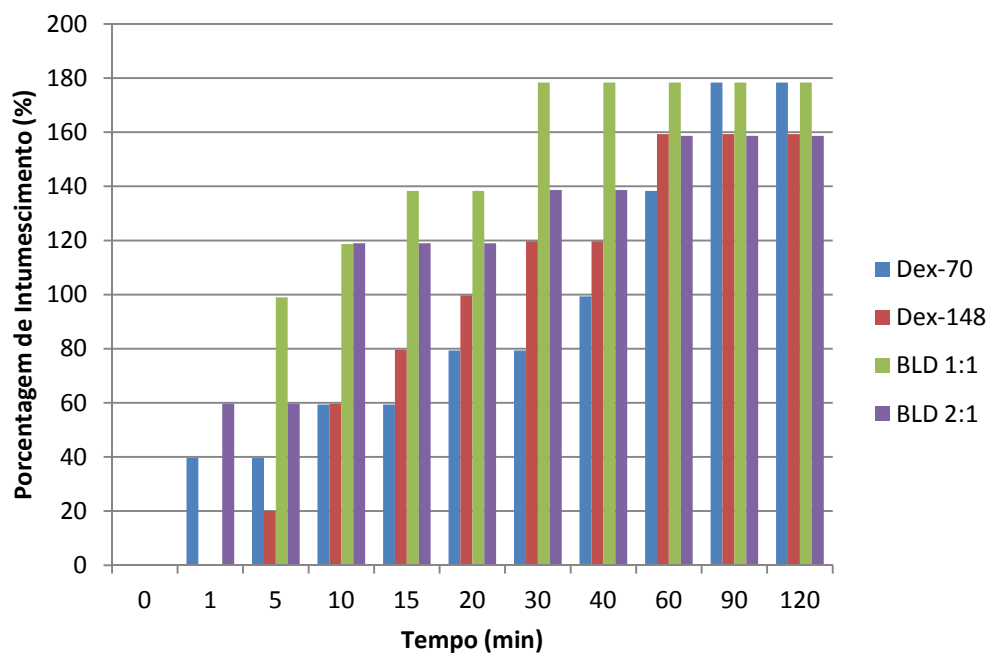
O comportamento de intumescimento dos hidrogéis utilizados na obtenção de sistemas de liberação de fármacos é muito importante, uma vez que a taxa de liberação do fármaco é controlada pela taxa de difusão de líquido que entra e do fármaco liberado através da matriz polimérica. Portanto, a hidrofília do polímero, a estrutura da rede formada e os números de grupos ionizáveis presentes na estrutura polimérica determina a quantidade de água absorvida pelo polímero (CAMPOS, 2009 *apud* CURY, 2005).

Nas figuras 37-42, podem ser observados os perfis de intumescimento do Dextrano 70 kDa (Dex-70), Dextrano 148 kDa (Dex-148), Blenda (DEX-70:DEX-148) 1:1 (BLD 1:1), Blenda 2:1 (BLD 2:1), Misturas físicas (MF) e Hidrogéis (HG).

Examinando a figura 37, pode se verificar que a blenda 1:1 apresentou um maior intumescimento em relação ao Dex-148 e blenda 2:1, enquanto que

comparando com Dex-70 o perfil não teve grandes diferenças. Isso pode ter ocorrido supostamente devido a uma interação intermolecular muito forte na BLD 2:1, que pode ter interferido no intumescimento do polímero.

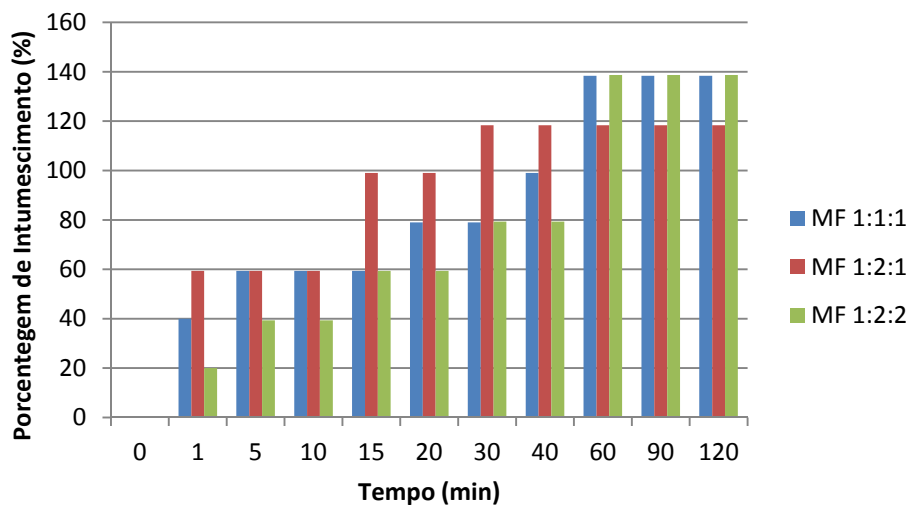
Figura 37- Perfil de intumescimento dos polímeros livres e nas blendas 1:1 e 2:1



Fonte: Próprio autor

Na figura 38, podemos notar que MF 1:1:1 e MF 1:2:2 tiveram perfis de intumescimento muito parecidos e mais intumescíveis que MF 1:2:1. Provavelmente, a proporção de polímero não foi um fator que influenciou o comportamento de absorção de água pelo polímero. No entanto, É possível que o fenômeno observado na blenda 2:1, na figura 37, também esteja ocorrendo na amostra MF 1:2:1.

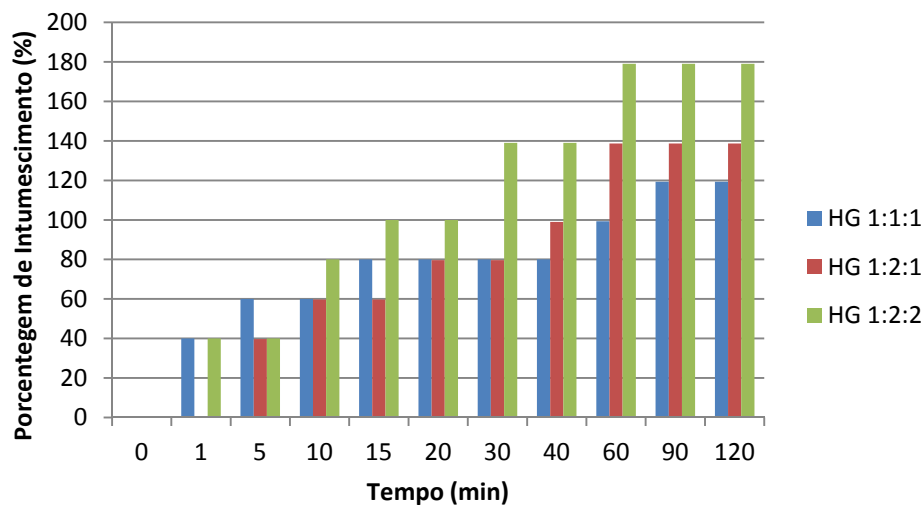
Figura 38- Perfil de intumescimento das misturas físicas



Fonte: Próprio autor

No entanto, diferente do que se observa na figura 38, aparentemente, a proporção de polímero pode ter influenciado no perfil de intumescimento dos hidrogéis (Figura 39), bem como, a interação fármaco-polímero observada no RMN- H^1 . Ademais, podemos verificar que HG 1:1:1 teve um intumescimento menor em relação a HG 1:2:2, provavelmente, essa diferença pode ter ocorrido por influência da interação entre os polímeros e o fármaco, relatada anteriormente. Já no que se refere as amostras HG 1:2:1 e HG 1:2:2, a análise da figura 39 mostra que é presumível uma certa influência da quantidade de polímero envolvida e da forma como a matriz polimérica se encontra organizada. Considerando o observado nas fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, nota-se que a estrutura da HG 1:2:1 se apresentava em aglomerados organizados e cobertos de cristalitos de PZQ, enquanto que na HG 1:2:2, a matriz polimérica se mostrava mais organizada, possivelmente, devido uma concentração menor de fármaco, que portanto, pode ter influenciado nos resultados de intumescimento observados.

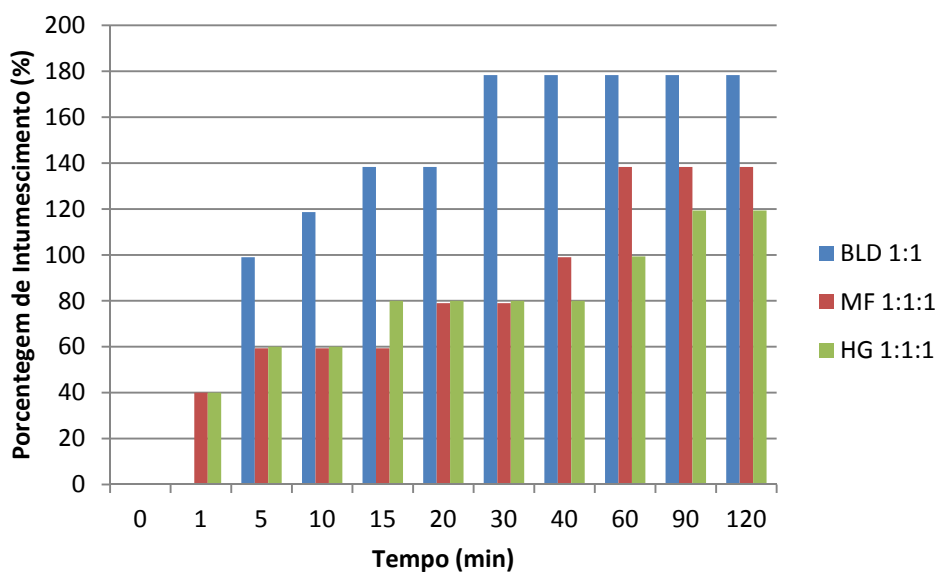
Figura 39- Perfil de intumescimento dos hidrogéis



Fonte: Próprio autor

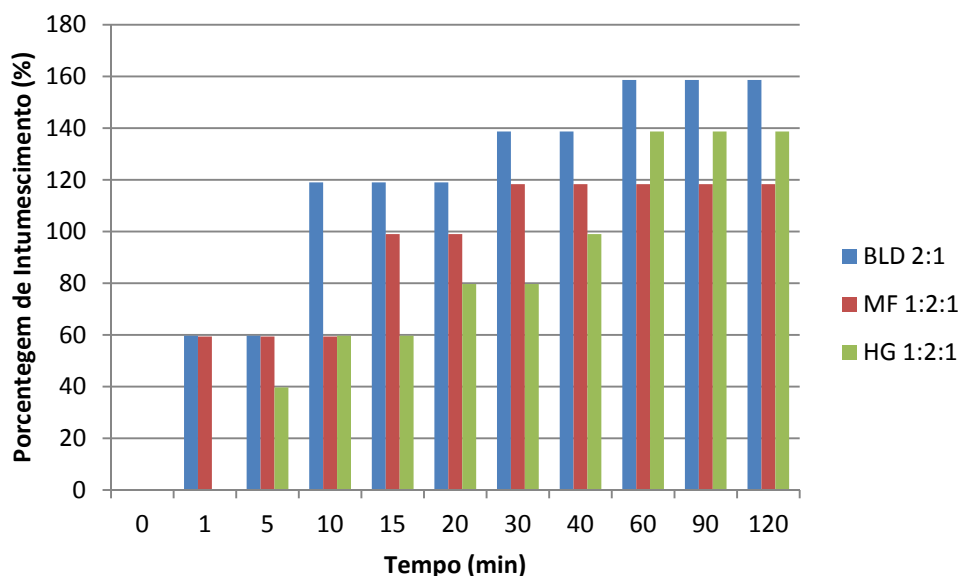
Além disso, comparando misturas físicas e hidrogéis, verifica-se que as primeiras tiveram um grau de intumescimento menor em relação aos hidrogéis. Isso pode ter ocorrido, devido ao fato das partículas dos polímeros estarem cobertas de cristais de PZQ, diminuindo tanto superfície de contato do fármaco, quanto do polímero e, assim, interferindo na sua propriedade de intumescimento.

Figura 40- Perfis de intumescimento da blenda 1:1, misturas físicas e hidrogéis 1:1:1



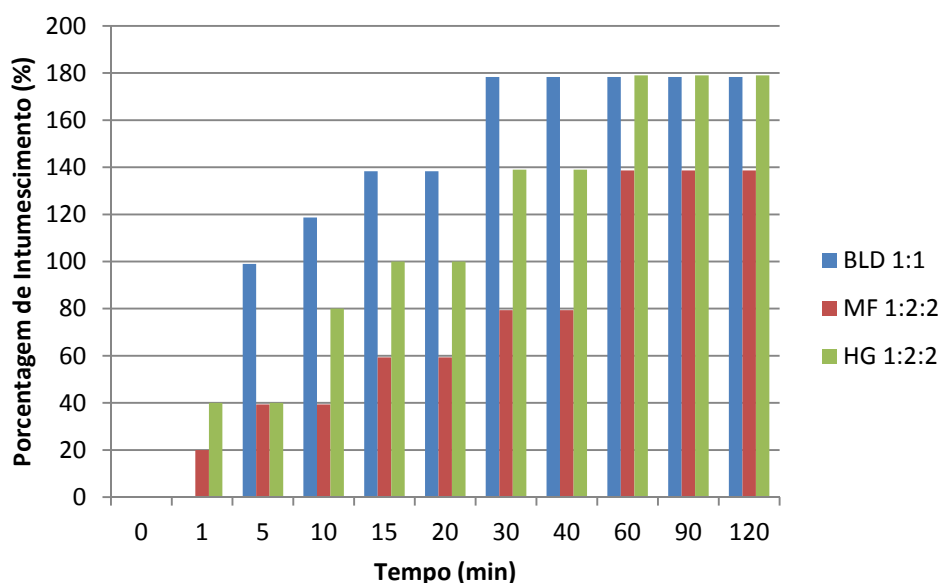
Fonte: Próprio autor

Figura 41- Perfis de intumescimento da blenda 2:1, mistura física e hidrogel 1:2:1



Fonte: Próprio autor

Figura 42- Perfis de intumescimento da blenda 1:1, mistura física e hidrogel 1:2:2



Fonte: Próprio autor

Avaliando a figura 40, pode se observar que a interação que existe entre PZQ e dextrano, realmente, pode ter interferido na propriedade de intumescimento do polímero no hidrogel HG 1:1:1, se comparado com os perfis da blenda e da mistura física com o hidrogel. Aparentemente, a presença de fármaco também pode ter interferido no perfil de intumescimento do HG 1:2:1, se observarmos as figuras 41 e

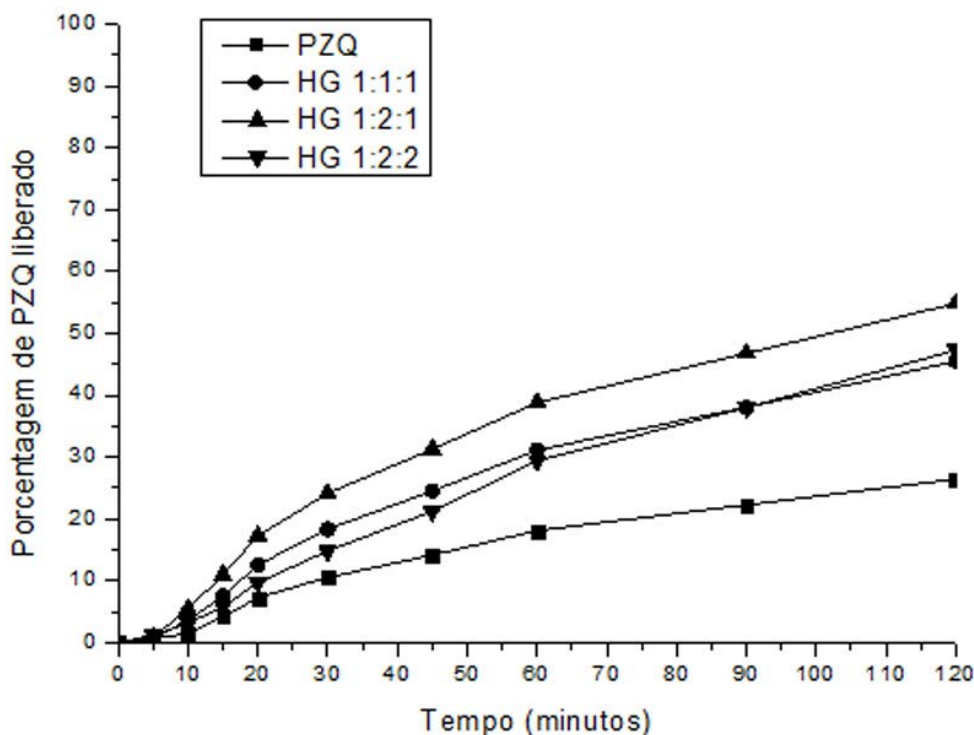
42. A amostra HG 1:1:1 apresentou um perfil mais tênue que HG 1:2:2. E, perante a blenda BLD 2:1, o perfil demonstrou um recuo na quantidade de água absorvida pelo hidrogel, indicando uma possível interferência do fármaco sobre essa propriedade.

Por fim, podemos confirmar que HG 1:2:2, foi a formulação que mais intumescceu, quando confrontado não só com sua mistura física correspondente como também com as demais formulações (Figura 42). Além disso, nota-se que o perfil de intumescimento do HG 1:2:2 é quase parecido com o da BLD 1:1, mantendo assim, ao que indica, as características dos polímeros, o que pode ser considerado como uma vantagem desse sistema. Isso, eventualmente, pode indicar que existe uma matriz polimérica organizada, em que o PZQ está em parte molecularmente disperso sem interferir nas propriedades do polímero.

4.5. AVALIAÇÃO DA DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DO PRAZIQUANTEL

A Figura 43 mostra os resultados dos ensaios de liberação do PZQ. A liberação do fármaco livre serviu de comparativo para se determinar a influência dos polímeros sobre o fármaco presente na amostra.

Figura 43 – Perfil de Liberação dos hidrogéis e fármaco livre



Fonte: Próprio autor

Pode-se observar que em todas as formulações houve uma melhora no perfil de liberação do fármaco e que todos apresentaram uma liberação longa e continua ao longo dos 120 minutos. No entanto, é possível notar que a amostra HG 1:2:1 teve uma liberação maior, de aproximadamente 55% do total de PZQ presente na formulação, em relação as demais formulações, que apresentaram perfis de liberação levemente semelhantes com cerca de 47% do total de fármaco para as amostras de HG 1:2:2 e 45% para HG 1:1:1, e o fármaco livre (26% do total da massa de PZQ utilizada para os ensaios).

Como foi relatado nos estudos RMN- H^1 , HG 1:1:1 apresenta uma interação entre fármaco e polímero e o mesmo ocorre de forma mais fraca no HG1:2:2, por consequência, é possível que esse fator tenha interferido na dissolução do fármaco. No entanto, devemos lembrar que outras análises deram conta de uma possível dispersão molecular parcial do fármaco na matriz polimérica, que deveria estar colaborando com uma melhora na solubilidade e, conseqüentemente, na dissolução do fármaco no HG 1:2:2. Esse fenômeno ocorreu, pois observando a figura 43, pode-se notar que, em 120 minutos, HG 1:2:2 dissolve 47% do fármaco em relação aos 45% do HG 1:1:1, o que assinala na figura que, enquanto este último apresenta uma tendência de estabilização da quantidade de fármaco dissolvido, o primeiro, supostamente, tende a continuar liberando fármaco em quantidades cada vez maiores.

Sobre HG 1:2:1, pode-se verificar que como já foi mencionado, os resultados do RMN- H^1 , não mostraram nenhum sinal de interação. Isso significa, que há uma quantidade maior de fármaco disperso e livre, isto é, sem interagir com o polímero, o que explica em parte a razão para uma porcentagem maior de fármaco dissolvido no meio. Também se apoiando nos demais ensaios de caracterização, podemos comprovar que há a possibilidade de uma dispersão parcial de PZQ na matriz polimérica e que aparentemente os cristalitos do fármaco possuem um grau maior de dissolução em relação as outras amostras.

Podemos então, observar que é provável que as alterações verificadas nas propriedades físico-químicas dos componentes das formulações podem estar influenciando na modulação da liberação do praziquantel.

4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO*

Para avaliação da atividade esquistossomicida, *in vivo*, dos Hidrogéis foram avaliados os seguintes parâmetros: carga parasitária dos animais após os tratamentos, quantidade de ovos eliminados nas fezes e estágio de desenvolvimento e viabilidade dos ovos pelo método do oograma. As figuras 44-46, juntamente com as Tabelas 2 e 3, referem-se aos resultados obtidos com os tratamentos realizados após 45 dias de infecção do *S. mansoni* com a dose de 300 mg/kg das diferentes formulações incorporadas ou não ao PZQ e com o PZQ livre.

Conforme se observa na Figura 44, houve uma redução de vermes de acordo com os diferentes tratamentos. De acordo com os dados apresentados, observou-se uma melhor ação esquistossomicida nos tratamentos realizados com hidrogéis. Além disso, pode-se verificar, na Tabela 2, que a amostra HG 1:2:2 (95,3%, $\bar{X}$ = 4,8, $p<0,01$) foi mais eficaz na redução dos vermes (RV), quando comparado com o tratamento realizado com o PZQ (84,4%, $\bar{X}$ = 19,2).

Tabela 2 – Efeito do PZQ livre e incorporado aos hidrogéis sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após o tratamento realizado aos 45 dias de infecção.

45 dias Dose (mg/kg)	Tratamento	Total		Casal		Macho		Fêmea		RV	RM	RF
		$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	%	%	%
300	Controle	51,17	4,5613	13,17	3,1842	14,17	2,5441	10,67	2,8087	0	0	0
300	PZQ	19,2	3,5785	7,5	2,0616	2,5	1,5000	1,7	1,8856	62,5	82,4	84,4
300	HG 1:1:1	9,2*	4,1800	3,0	0,8165	0,8	0,8975	2,3	2,9814	82,1	94,1	78,1
300	HG 1:2:1	8,2*	5,2731	2,0*	1,2910	2,3	2,2111	1,8	1,6750	84,0	83,5	82,8
300	HG 1:2:2	4,8*	2,7726	1,8*	0,8292	1,0	1,7321	0,5	0,5000	90,7	92,9	95,3

Fonte: Próprio autor

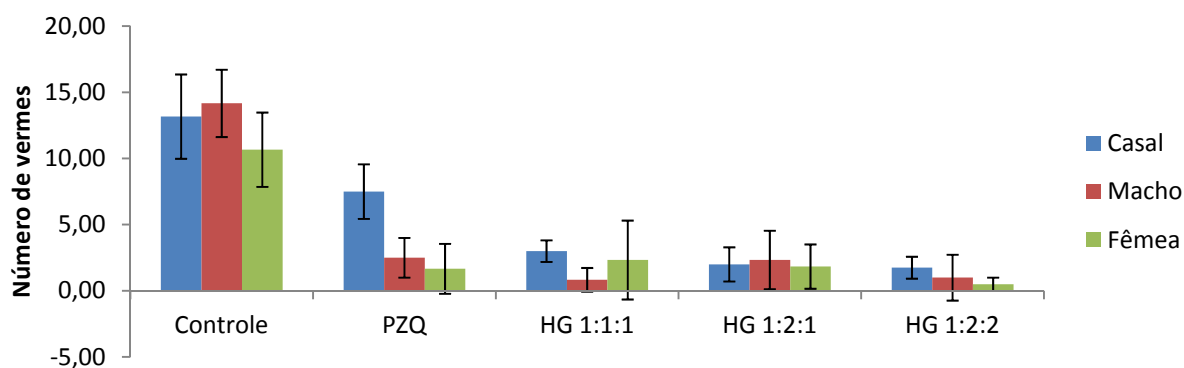
Nota: RV= Redução de Vermes, RM= Redução de Machos e RF= Redução de Fêmea, Total= Total de Vermes vivos encontrados, S= Desvio Padrão, $\bar{X}$ = Média. * - $p\leq 0,05$.

No entanto, fazendo uma análise mais aprofundada a partir da Tabela 2, foi possível notar que todas as amostras apresentaram eficácia sobre o acasalamento dos vermes. Contudo, houve uma diferença quanto à susceptibilidade dos sexos. Em relação a redução de vermes machos (RM) verifica-se que a média do número de machos recuperados nas três tratamentos foi menor que o Praziquantel sendo que todas diferiram estatisticamente do grupo controle ($p\leq 0,05$). Isso significa que estatisticamente, as amostras tiveram efeito igual ao praziquantel, quando

comparados ao controle. Dentre todos os tratamentos, damos destaques às amostras HG 1:1:1 (94,1%, $\bar{X}$ = 0,8) e HG 1:2:2 (92,9%, $\bar{X}$ = 1,0), que foram mais efetivas que o controle e semelhante ao fármaco livre (84,4%, $\bar{X}$ = 2,5). Observando o efeito dos tratamentos nos vermes fêmeas (RF), na Tabela 2, verifica-se que os três tratamentos tiveram a mesma resposta do Praziquantel. No entanto, somente a amostra HG 1:2:2 (95,3%, $\bar{X}$ = 0,5) apresentou uma maior redução no número de fêmeas, ou seja, teve uma melhor eficácia, quando comparado aos demais hidrogéis e ao grupo controle não tratado, porém apresentou efeito estatisticamente semelhante ao do praziquantel.

De acordo com Katz (2008), quando se avalia efeito esquistossomicida de um fármaco, deve-se considerar que este pode apresentar efeitos diferentes tais como: (1) profiláticos, que irão prevenir a infecção, atuando sobre as formas jovens do parasita; (2) supressores, atuando na oviposição das fêmeas e, portanto, eliminando o principal agente patogênico, o ovo, além de interromper o ciclo biológico e, consequentemente, a transmissão da doença; e (3) efeito curativo, apresentando eficácia sobre os vermes maduros, interrompendo a infecção.

Figura 44- Quantidade de vermes adultos de cada sexo



Fonte: Próprio autor

Considerando os resultados apresentados, quanto a taxa de redução dos vermes vivos, casais, machos e fêmeas, pode-se inferir que HG 1:2:2 apresentou melhor eficácia. Além disso, podemos notar também que, a susceptibilidade quanto ao sexo, contribuiu para essa elevada taxa de redução total de vermes após os tratamentos com o hidrogel HG 1:2:2 (Tabela 2).

Podemos observar na Tabela 3, os resultados dos efeitos dos tratamentos sobre os ovos e a ovoposição.

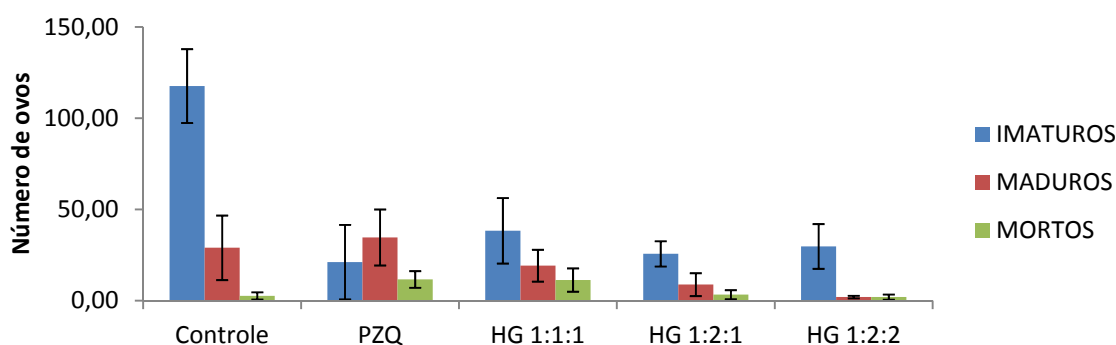
Tabela 3 – Efeito do PZQ livre e incorporado aos hidrogéis sobre o oograma após o tratamento realizado aos 45 dias de infecção.

45 dias		Oograma						OPG	RO
Dose(mg/kg)	Tratamento	IMAT		MAD		MORTOS			
		$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	%
300	Controle	117,67	20,2539	29,00	17,6730	2,67	1,9720	1120,60	0
300	PZQ	21,17	20,4077	34,67	15,3478	11,67	4,5704	215,47	80,8
300	HG 1:1:1	38,3	17,9691	19,2	8,7258	11,3	6,4205	150,8	86,5
300	HG 1:2:1	25,7	6,9202	8,8*	6,2561	3,3	2,4944	118,7*	89,4
300	HG 1:2:2	29,75	12,2755	2,00*	0,7071	2,0	1,4142	106,38*	90,5

Fonte: Próprio autor

Nota: IMAT= Ovos Imaturos (de 1º a 4º estágio de desenvolvimento), MAD= Ovos Maduros (ou de 5º estágio), OPG= Ovos Por Grama de fezes e RO= Redução de Ovos nas fezes, S= Desvio Padrão, $\bar{X}$ = Média. * - $p \leq 0,05$.

Figura 45– Oograma



Fonte: Próprio autor

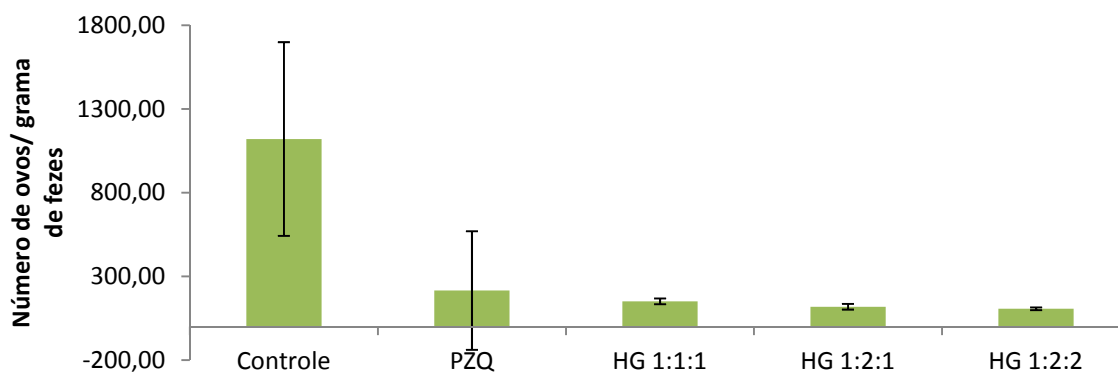
Considerando a redução do número de vermes, principalmente fêmeas, pode-se inferir que este fato está diretamente relacionado com a redução do número de ovos eliminados nas fezes (OPG) e encontrados nos tecidos intestinais (oograma) como apresentado na figura 45 e 46.

A redução do número de ovos após os tratamentos *in vivo*, realizados entre o 45º e 60º dias de infecção, onde os vermes estariam no seu pico de oviposição, é de suma importância. De acordo com Pellegrino et al. (1962) camundongos infectados com *S. mansoni* iniciam oviposição por volta do 30º dia de infecção. Desta forma, a redução de ovos é significativa. Além disso, a patologia da esquistossomose humana está diretamente associada a presença de ovos que ficam retidos nos

órgãos, principalmente no fígado e nos tecidos intestinais do hospedeiro, durante a migração, ocasionando processos inflamatórios, denominados granulomas (GIBODA & SMITH, 1994; GRYSEELS et al., 2006).

Em relação ao oograma (Figura 45), observou-se que todos os tratamentos foram estatisticamente melhores que o controle não tratado ($p \leq 0,05$), quanto a redução de ovos imaturos, porém foram tão eficazes quanto o praziquantel, confirmando um efeito supressor semelhante ao do fármaco, se compararmos os resultados dos efeitos sobre as fêmeas, o que indica um efeito sobre a ovoposição. O tratamento realizado com PZQ apresentou maior quantidade de ovos maduros ($\bar{X} = 34,67$) e mortos ($\bar{X} = 11,67$), quando comparado com o grupo controle (maduros, $\bar{X} = 29,0$ e mortos, $\bar{X} = 2,67$). Já os tratamentos com HG 1:1:1 e HG 1:2:1 mostraram uma quantidade menor de ovos maduros (HG 1:1:1, $\bar{X} = 19,2$ e HG 1:2:1, $\bar{X} = 8,8$ e $p < 0,01$), quando comparados ao grupo controle, sendo que dentre eles o HG 1:2:1 teve uma efetividade estatisticamente mais significativa sobre os ovos maduros em relação ao grupo tratado com PZQ e ao que não recebeu tratamento algum. No entanto, com relação ao número de ovos mortos, os tratamentos com HG 1:1:1 e HG 1:2:1 (HG 1:1:1 $\bar{X} = 11,3$ e HG 1:2:1 $\bar{X} = 3,3$) apresentam uma quantidade menor de ovos como o praziquantel. Contudo, o tratamento realizado com o hidrogel HG 1:2:2, apresentou uma quantidade média de ovos maduros igual a 2,0 ($p < 0,01$) e mortos igual a 2,0, o que indica uma eficácia sobre a redução de ovos eliminados nos tecidos intestinais, uma vez que observou-se uma efetividade também sobre ovos imaturos (Tabela 3). Assim podemos concluir pelos resultados do oograma que HG 1:2:1 e HG 1:2:2, tiveram a melhor eficácia sobre os ovos nos tecidos intestinais.

Figura 46- Redução de ovos por gramas de fezes (OPG)



Fonte: Próprio autor

Podemos observar na Tabela 3, que pela análise da redução do percentual de ovos (RO) e do OPG, houve uma redução considerável da quantidade de ovos presente nas fezes dos animais nos tratamentos realizados com HG 1:2:1 (89,4%, $\bar{X}$ = 118,7; $p<0,01$) e HG 1:2:2 (90,5%, $\bar{X}$ = 106,38 e $p<0,01$) comparados ao grupo tratado com fármaco e o grupo não tratado. Embora seja notada uma boa redução de ovos eliminados nas fezes em ambos, conforme é visto na figura 46 e tabela 3, o efeito dos hidrogéis sobre os estágios de desenvolvimento dos ovos analisado pelo método do oograma, apresentou melhor eficácia para a amostra HG 1:2:1, na qual se observou uma menor quantidade de ovos imaturos, dentre os três hidrogéis, e uma quantidade maior de ovos maduros e mortos em relação ao HG 1:2:2 e também significativamente maior comparado ao fármaco e ao grupo controle. De acordo com Cunha & Carvalho (1966), o oograma é um método qualitativo fidedigno, cuja eficácia ou ineficácia de um fármaco pode ser definida poucos dias após o tratamento. Contudo, segundo Prata (1957), o encontro de uma maior quantidade de ovos maduros e mortos após a administração de fármacos é um resultado positivo e pode representar uma mudança progressiva na porcentagem de ovos viáveis e nos diferentes estágios de desenvolvimento, em decorrência de oviposições anteriores ao tratamento. Além disso, segundo o que Frezza et al. (2007) mencionou em seu trabalho, o efeito do PZQ sobre os ovos do *S. mansoni*, mataria os maduros e os imaturos continuariam seu ciclo de desenvolvimento até serem eliminados.

Portanto, podemos notar que HG 1:2:1 apresentou uma boa efetividade no combate aos vermes vivos, semelhante ao praziquantel, e teve um ótimo efeito sobre os ovos, porém HG 1:2:2 apresentou uma ótima atividade contra os vermes vivos e ainda foi eficaz contra os ovos, conforme o que podemos ver nas tabelas 2 e 3. Portanto, podemos supor que HG 1:2:1 e HG 1:2:2 foram os hidrogéis com respostas mais adequadas, dentre todas as amostras, em relação ao PZQ e ao Grupo Controle. Essa melhor atividade pode ter ocorrido devido a maior concentração de polímeros nesses hidrogéis, o que gerou uma diluição do PZQ na matriz polimérica, levando a uma melhora na solubilidade e nos perfis de liberação e intumescimento, e assim, propiciando uma possível maior concentração de fármaco no organismo dos animais e, conseqüentemente, uma maior efetividade de ambos.

5. CONCLUSÃO

- Foi possível obter as formulações das blendas de dextranos (70 kDa e 148 kDa) em diferentes proporções, contendo praziquantel, utilizando um método simples, rápido e barato que utiliza matérias biocompatíveis, biodegradáveis e baratos para formação da matriz polimérica, que permitiu uma modulação da liberação conforme o desejado.
- Nas análises de caracterização, a espectroscopia na região do infravermelho mostrou indícios de uma interação entre fármaco e polímeros, que foi corroborada pela espectroscopia de RMN- ^1H que constatou a existência de uma interação entre o praziquantel e o dextrano na amostra de hidrogel 1:1:1, bem como, na amostra 1:2:2. No entanto, nesta amostra a interação não foi tão acentuada. Já na amostra 1:2:1 não houve interação. Também, nos estudos de DSC, foi observada a presença de interações fracas das moléculas do fármaco entre si e com o polímero, responsáveis, em parte, por uma redução no pico endotérmico do PZQ e, conseqüentemente, na quantidade de energia para sua fusão devido a dispersão molecular e formação de cristalitos. Os estudos de difração de Raios-X sugerem que está ocorrendo uma alteração nas propriedades cristalinas do fármaco, à medida que a proporção de polímero em relação ao fármaco aumenta, o que pode ser um sinal de sua dispersão molecular na matriz polimérica.
- Nas fotomicrografias, pudemos concluir que, provavelmente, quando maior a quantidade de polímeros menores tornam-se os cristais de PZQ na matriz polimérica. Logo, o praziquantel interage menos com o polímero, alterando assim, algumas propriedades do fármaco.
- A avaliação de solubilidade mostrou uma mudança nessa propriedade do PZQ incorporada na blenda com um aumento nessa propriedade biofarmacêutica do fármaco.
- Nos ensaios de intumescimento, podemos confirmar que HG 1:2:2, foi a formulação que mais intumescceu. Além disso, notou-se que o perfil

de intumescimento do HG 1:2:2 é semelhante com o da BLD 1:1, indicando que as características dos polímeros foram mantidas e mostrando que, provavelmente, existe uma matriz polimérica organizada, em que o PZQ está disperso. Os ensaios de dissolução indicaram que houve uma maior liberação de fármaco por parte das amostras de forma longa e contínua, sugerindo que as blendas foram eficientes na melhora do perfil de liberação do PZQ. Dentre elas, a amostra HG 1:2:1 foi a que apresentou uma maior liberação, apesar de que entre todas as amostras apresentou um intumescimento mediano em comparado com HG 1:2:2, que teve o segundo melhor perfil de liberação, seguido de HG 1:1:1 que, de todos, teve os mais baixos perfis de intumescimento e liberação. Isso pode indicar que há uma relação parcial entre intumescimento e liberação nesse caso.

- A avaliação da atividade esquistossomicida *in vivo* apontou que as amostras tiveram atividade sobre os vermes adultos, principalmente, fêmeas. Destas, HG 1:2:2 foi a que mais se destacou por sua eficácia na ação sobre os parasitas, porém também apresentou alguma efetividade sobre os ovos. No entanto, foi observado que HG 1:2:1, teve uma boa eficiência na redução da quantidade de ovos maduros e mortos, além de agir contra os vermes, o que indica uma maior efetividade dos dois tratamentos se avaliados de uma maneira geral sobre o *S. mansoni*.
- A melhora na atividade do praziquantel em HG 1:2:1 e HG 1:2:2, possivelmente, se deve ao fato de que a maior concentração de polímeros pode ter ajudado o fármaco a se diluir na matriz polimérica, facilitando a solubilidade do fármaco e sua liberação, gerando uma provável maior concentração de PZQ no plasma sanguíneo e, por consequência, um maior efeito desses tratamentos.
- Por fim, pode-se observar que as blendas de dextranos de diferentes pesos moleculares, em diferentes proporções, geraram sistemas que melhoraram as propriedades biofarmacêuticas do PZQ e modularam sua liberação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANOV, A.K., PAYNE, L.G. Polymeric carriers for oral uptake of microparticles. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 34, p. 155-177, 1998.

BAJPAI, A.K., SHUKLA, S.K., BHANU, S., KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Prog Polym Sci.**, v. 33, p. 1088-1118., 2008.

BALEN, J., STOTHARD, J.R., KABATEREINE, N.B., TUKAHEBWA, E.M., KAZIBWE, F., WHAWELL, S., WEBSTER, J.P., UTZINGER, J., FENWICK, A. Morbidity due to *Schistosoma mansoni*: an epidemiological assessment of distended abdomen syndrome in Uganda school children with observations before and 1-year after anthelmintic chemotherapy. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 100, p. 1039-1048, 2006.

BARBANI, N., BERTONI, F., CIARDELLI, G., CRISTALLINI, C., SILVESTRI, D., COLUCCIO, M.L., GIUSTI, P. Bioartificial materials based on blends of dextran and poly(vinyl alcohol-co-acrylic acid). **Eur. Polym. J.** v. 41, p.3004-3010, 2005.

BARCELLOS, I.O.; KATIME, I.A.; SOLDI, V.; PIRES, A.T.N. Influência do Comonômero e do Método de Polimerização na Cinética de Liberação de Fenobarbiton a partir de Hidrogéis. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 10, p. 100-115, 2000.

BRASIL, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de maio de 2003. D.O.U CAS. 02/06/2003.

BREDA, S.A.; JIMENEZ-KAIRUZ, A.F.; MANZO, R.H.; OLIVERA, M.E. Solubility behaviour and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. **Inter. J. Pharm.** v. 371, p. 106-113, 2009.

CAI, Q., YANG, J., BEI, J., WANG, S. A novel porous cell scaffold made of polylactide-dextran blend by combining phase-separation particle leaching techniques. **Biomaterials.** v. 23, p. 4483-4492, 2002.

CAMPOS, F.S. **Desenvolvimento de hidrogéis de dextrano contendo praziquantel.** 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara.

CAMPOS, F.S., CASSIMIRO, D.L., CRESPI, M.S., ALMEIDA, A.E., GREMIÃO, M.P.D. Preparation and characterization of Dextran-70 hydrogel for controlled release of praziquantel. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v 49, p. 75-83, 2013.

CASADEI, M.A., PITARRESI, G., CALABRESE, R., PAOLICELLI, P., GIAMMONA, G. Biodegradable and pH-sensitive hydrogels for potencial Colon-Specific Drug

Delivery: Characterization na In Vitro Release Studies. **Biomacromolecules**. v. 9, p. 43-49, 2008.

CASADEI, M.A.; CERRETO, F.; CESA, S.; GIANNUZZO, M.; FEENEY, M.; MARIANECCI, C.; PAOLICELLI, P. Solid lipid nanoparticles incorporated in dextran hydrogels: A new drug delivery system for oral formulations. **Inter. J. Pharm.**, v. 325, p. 140-146, 2006.

CASSANO, R., TROMBINO, S., MUZZALPO, R., TAVANO, L, PICCI, N. A novel dextran hydrogel linking trans-ferulic acid for the stabilization and transdermal delivery of vitamin E. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 72, p.232-238, 2009.

CHAUD, M.V., TAMASCIA, P., LIMA, A.C., PAGANELLI, M.O., GREMIÃO, M.P.D., FREITAS, O. Solid dispersions with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. **Braz J Pharm Sci.**, v. 46, p. 473-481, 2010.

CHENG, L.; LEI, L.; GUO, 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.

CHEUNG, R.Y., YING, Y., RAUTH, A.M., MARCON, N., WU, X.Y. Biodegradable dextran-based microspheres for delivery of anticancer drug mitomycin C. **Biomaterials**. v.26, p.5375-5385, 2005.

CINTO, P. O. **Avaliação da absorção intestinal de praziquantel a partir de lipossomas de fosftidilcolina de soja empregando o modelo do saco intestinal invertido**. 2005. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara.

CIOLI, D., PICCA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitol Res.**, v. 90, p. S3-S9, 2003.

COSTA JR., E.S., MANSUR, H.S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecidos. **Quim. Nova**. v.31, p. 1460-1466, 2008.

COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCI, C.; ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **J. Cont. Rel.**, v. 119, p. 5-24, 2007.

CUNHA, A.S., CARVALHO, D.G. Estudo do método do oograma quantitativo na esquistossomose mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 8, p. 113-21, 1966.

DE JESUS, M. B.; DE MATOS ALVES PINTO, L.; FRACETO, L. F.; TAKAHATA, Y.; LINO, A. C. S.; JAIME, C.; DE PAULA, E., Theoretical and experimental study of a praziquantel and -cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and -nuclear magnetic resonance. **J Pharm Biomed Anal.**,v. 41, p. 1428-1432, 2006.

DE OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim. Nova.**, v.34, p. 1224-1230, 2011.

DELGADO, V.S.; SUÁREZ, D.P.; CESARI, I.M.; HINCAN, R.N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains on both sexes of the parasite. **Parasitol Res.**, v. 78, p. 648-54, 1992.

DERRICK, T. S.; MCCORD, E. F.; LARIVE, C. K., Analysis of Protein/Ligand Interactions with NMR Diffusion Measurements: The Importance of Eliminating the Protein Background. **J Mag Reson.**, v.155, p.217-225, 2002.

DOENHOFF, M.J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: Mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, p. 659-667, 2008.

DUAN, W., QIU, S., ZHAO, Y., SUN H., QIAO, C., XIA, C. Praziquantel derivatives exhibit activity against both juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 22, p. 1587-1590, 2012.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 347-360, 2003.

ENK, M.J., LIMA, A.C.L., DRUMMOND, S.C., SCHALL, V.T., COELHO, P.M.Z. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Trop.**, v. 108, p. 222-228, 2008.

ETTMAYER, P., AMIDON, G.L., CLEMENT, B., TESTA, B.. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. **J. Med. Chem.** v. 47, p. 2393 – 2404, 2004.

FERENCZ, A., NEDVIG, K., LŐRINCZY, D. DSC, as a new method to verify the exact warm and cold ischemic injury during small bowel surgery. **Thermochim. Acta.**, v. 509, p. 50-55, 2010.

FERREIRA, L.; GIL, M.H.; CABRITA, A.M.S.; DORDICK, J.S. Biocatalytic synthesis of highly ordered degradable dextran-based hydrogels. **Biomaterials**, v. 26, p. 4707-4716, 2005.

FORD, J.L., MANN, T.E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, p. 422-430, 2012.

FREZZA, T.F.; MADI, R.R.; BANIM, 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. Cienc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, p. 209-214, 2007.

GIBODA, M.; SMITH, J.M. *Schistosoma-mansoni* eggs as a target for praziquantel - efficacy of oral application in mice. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, p. 98-102, 1994.

GIRI, T.K.; KUMAR, K.; ALEXANDER, A.; AJAZUDDIN.; BADWAIK, H.; TRIPATHI, D.K. A novel and alternative approach to controlled release drug delivery system based on solid dispersion technique. **Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.**, v. 50, p. 147-159, 2012.

GONZÁLEZ-ESQUIVEL, D.; RIVERA, J.; CASTRO, N.; YEPEZ-MULIA, L.; HELGI, J.C. In vitro characterization of some biopharmaceutical properties of praziquantel. **Int. J. Pharm.** v. 295, p. 93-99, 2005.

GRYSEELS, B., POLMAN, K., CLERINX, J., KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet.**, v. 368, p. 1106-1118, 2006.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 60, p. 1638-1649, 2008.

HERMETO, M. V.; BICALHO, R. S.; SILVA, R. E. DA; MELO, A. L. DE; PEREIRA, L. H. Oogram studies in mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with dexametasone. **Rev Inst Med Trop S. Paulo**, v.36, p.99-103, 1994.

HIEMSTRA, C.; AA, L.J.V.D.; ZHONG, Z.; DIJKSTRA, P.J.; FEIJEN, J. Novel in situ forming, degradable dextran hydrogels by Michael addition chemistry: synthesis, rheology, and degradation. **Macromolecules**, v. 40, p. 1165-1173, 2007.

HOARE, T.R., KOHANE, D.S., Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer.** v.49, p.1993-2007, 2008.

HUSSEIN, I. EL-SABBAGH, ABDULLAH, A. AL-BADR. Praziquantel. **Anal. Prof. Drug Subst. and Exc.**, v. 25, p. 464-500, 1998.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures: methodology.** 1996, p.1-8.

ITO, T., YEO, Y., HIGHLEY, C.B., BELLAS, E., KOHANE, D.S. Dextran-based in situ cross-linked injectable hydrogels to prevent peritoneal adhesions. **Biomaterials.** v. 28, p. 3418-3426, 2007.

JAGUR-GRODZINSKI, J. Biomedical application of fuctional polymers. **React. Funct. Polym.** v.39, p.99-138, 1999.

JAYAWICKRAMA, D. A.; LARIVE, C. K.; MCCORD, E. F.; ROE, D. C., Polymer additives mixture analysis using pulsed-field gradient NMR spectroscopy. **Magn Reson Chem.**, v. 36, p. 755-760, 1998.

JIANG, B., HU, L., CHANGYOU, G., SHEN, J. Crosslinked polysaccharide nanocapsules: Preparation and drug release properties. **Acta biomater.** v.2, p. 9-18, 2006.

KATZ, N. et al. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.14, p.397-400, 1972.

KATZ, N. The discovery of Schistosomiasis mansoni in Brazil. **Acta Tropica.**, v. 108, p. 69–71, 2008.

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.

KONIK-ROSE, C.M., MOSS, R., RAHMAN, S., APPELS, R., STODDARD, F., McMASTER, G. Evaluation of 40 mg Swelling Test for measuring starch functionality. **Starch**. v. 53, p. 14-20, 2001.

LIMA, A. C. **Obtenção e caracterização de dispersões sólidas de praziquantel**. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara.

LIMA, A. C. **Preparação de dispersões sólidas de praziquantel com polivinilpirrolidona pelo processo de fluido supercrítico**. 2009. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara.

LITMANOVICH, A.D., PLATÉ, N.A., KUDRYAVTSEV, Y., V. Reactions in polymer blends: interchain effects and theoretical problems. **Prog Polym Sci.**, v. 27, p. 915-970, 2002.

LIU, Y., CHAN-PARK, M.B. Hydrogel based on interpenetrating polymer networks of dextran and gelatin for vascular tissue engineering. **Biomaterials**. v. 30, p. 196-207, 2009.

LIU, Y; WANG, X; WANG, J.K; CHING, C.B. Strutural characterization and enantioseparation of the chiral compound praziquantel. **J. Pharm. Sci.**, v. 39, p. 3039-3046, 2004.

LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG,Y.; ZHOU,C.; ZHANG,Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, p. 1650-1662, 2008.

LLOYD, L.L.; KENNEDY, J.F.; METHACANON, P.; PATERSON, M.; KNILL, C.J. Carbohydrate polymers as wound management aids. **Carbohyhydr. Polym.**, v. 37, p. 315-322, 1998.

MAIA, J., RIBEIRO, M.P., VENTURA, C., CARVALHO, R.A., CORREIA, I.J., GIL, M.H. Ocular injectable formulation assessment for oxidized dextran-based hydrogels. **Acta Biomater**. v.5, p. 1948-1955, 2009.

MAINARDES, R.M., GREMIÃO, M.P.D., EVANGELISTA, R.C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 42, p. 523-530, 2006.

MAINARDES, R.M.; URBAN, M.C.C.; CINTO, P.O.; CHAUD, M.V.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Curr. Drug Deliv.**, v. 3, 275-285, 2006.

MANDALA, I.G., BAYAS, E. Xanthan effect on swelling, solubility and viscosity of wheat starch dispersions. **Food Hydrocolloids**. v. 18, p. 191-201, 2004.

MERCK INDEX. 14a ed. p. 1325, 2006.

MEYER, B.; PETERS, T., NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. **Angew Chem Int Ed Engl.**, v.42, p.864-890, 2003

MOURÃO, S. C. **Preparação e caracterização de lipossomas contendo Praziquantel**. 2001. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara.

MOURÃO, S. M; Costa, P. I.; Marora, H. R.; Gremião, M. P. D. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. **Int. J. Pharm.**, v. 295, p. 157-162, 2005.

NILSSON, M.; the DOSY Toolbox: A new tool for processing PFG NMR diffusion data. **J Mag Reson.**, v.200, p. 296-302, 2009.

NOVAES, M.R.C.G., SOUZA, J.P., ARAÚJO, H.C. Síntese do anti-helmintíco praziquantel, a partir da glicina. **Quim Nova.**, v. 22, p. 5-10, 1999.

OLIVIER, L.; STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v.38, p.19-23, 1952.

PASSERINI, N., ALBERTICI, B., PERISSUTI, B., RODRIGUEZ, 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.

PELLEGRINO, J. & SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Rev. bras. Malar.**, v. 8 p. 589-597, 1956.

PELLGRINO J, OLIVEIRA C A, FARIA J, CUNHA A S. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **Amer J Trop Med Hyg.** v.11 p. 201-215, 1962.

PEPPAS, N.A., BURES, P., LEOBANDUNG, W., ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.50, p.27-46, 2000.

PETKOV, V. Nanostructure by high-energy X-Ray diffraction. **Mater Today**, v. 11, p. 28-38, 2008.

PITARRESI, G., PALUMBO, F.S., GIAMMONA, G., CASADEI, M.A., MICHELETTI MORACCI, F. Biodegradable hydrogels obtained by photocrosslinking of dextran and polyaspartamide derivatives. **Biomaterials**, v. 24, p. 4301-4313, 2003.

PRATA, A. Tipos de ovos de *Schistosoma mansoni*. In: **Biópsia retal na esquistossomose mansoni: bases e aplicações no diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária; p.15-60, 1957.

SHUR, J., PRICE R. Advanced microscopy techniques to assess solid-state properties of inhalation medicines. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, p. 369-382, 2012.

SIEPMAN, F., SIEPMAN, J., WALTHER, M., MacRAE, R.J., BODMEIER, R. Polymer blends for controlled release coatings. **J Control Rel.**, v. 125, p. 1-15, 2008.

SINHA, V.R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **Inter J Pharm**, v. 224, p. 19-38, 2001.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Prog Polym Sci.**, v. 36, p. 1254-1276, 2011.

SOUZA, A. L. R. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas solidas contendo praziquantel**. 2011. 92f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara.

SOUZA, A.L.R. **Avaliação do efeito do praziquantel veiculado em dispersões lipídicas no tratamento de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni***. 79f. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara.

STENEKES, R.J.H., TALSMA, H., HENNINK, W.E. Formation of dextran hydrogels by crystallization. **Biomaterials**, v.22, p. 1891-1898, 2001.

STÉPHANE, G., ERWIN, F., JEAN-PIERRE, B., JEAN PIERRE, D. Comparison of different modelings of pure substances during melting in a DSC experiment. **Thermochim Acta**, v. 528, p. 1-8, 2012.

TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 18, p.207-231, 1995.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP 31), The National Formulary (NF 23). By authority of the United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, Inc, 2008 p. 3056-3057.

TORRE, P., TORRADO, S., TORRADO, S. Preparation, Dissolution and Characterization of Praziquantel Solid Dispersion. **Chem Pharm Bull.**, v. 47, p. 1629-1633, 1999.

VAN THIENEN, HORKAY, F., BRAECKMANS, K., STUBBE, B.G., DEMEESTER, J., DE SMEDT, S.C. Influence of free chains on the swelling pressure of PEG-HEMA and dex-HEMA hydrogels. **Int. J. Pharm.** v. 337, p.174-185, 2007.

WATSON, M. Praziquantel. **J Exot Pet Med.**, v. 18, p. 229-231, 2009.

YOUNG-IL, J.; DO HYUNG, K.; CHUNG-WOOK, C.; JIN-JU, Y.; KYUNG HA, C.; CY HYUN, K.; SEUNG HEE, H.; DAE HWAN, K., Doxorubicin-incorporated polymeric micelles composed of dextran-b-poly(DL-lactide-co-glycolide) copolymer. **Int J Nanomedicine.**, v.6, p. 1415-1427, 2011.

YU, L., DEAN, K., LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Prog Polym Sci**, v. 31, p. 576-602, 2006.

YUAN, W.; GENG, Y.; WU, F.; LIU, Y.; GUO, M.; ZHAO, H.; JIN, T. Preparation of polysaccharides glassy microparticles with stabilization of proteins. **Int. J. Pharm.**, v.366, p.154-159, 2009.

ZHANG, Y.; CHU, C.C. Thermal and mechanical properties of biodegradable hydrophilic-hydrophobic hydrogels based on dextran and poly(lactic acid). **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 13, p. 773-781, 2002.

ANEXO**ANEXO A - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA EMPREGADA PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR E DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA**

Este experimento foi realizado para garantir, por meio de estudos experimentais, que a metodologia utilizada para a determinação do teor e da eficiência de incorporação atendesse às exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos. Para tanto, os parâmetros de validação estudados foram: especificidade, linearidade, precisão, recuperação, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (BRASIL, 2003; ICH, 1996; USP 31, 2008).

A1. Especificidade

Com o objetivo de verificar a interferência de algum componente presente na solução hidroalcoólica, ou da formulação na análise para determinar o teor e a eficiência de incorporação, os parâmetros de especificidade foram estabelecidos pela comparação de resultados de amostras contaminadas (solução hidroalcoólica contendo PZQ e DEX-70 ou DEX-148) e de amostras não contaminadas, no caso, uma solução hidroalcoólica contendo PZQ (BRASIL, 2003; ICH, 1996).

No estudo de especificidade do método para determinação do teor de fármaco, utilizou-se a solução hidroalcoólica de PZQ na concentração de 1,0 mg/mL sem interferentes, e em presença de DEX-70 ou DEX-148. Os resultados demonstraram que o método proposto é seletivo e específico, uma vez que não se observou interferência dos polímeros no comprimento de onda de maior absorção do fármaco.

A2. Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da obtenção de uma curva analítica do PZQ em solução hidroalcoólica (Figura 47). Diluições, em água, com concentrações variando de 0,2 a 1,6 mg/mL foram preparadas a partir de soluções estoques contendo álcool etílico, em triplicata.

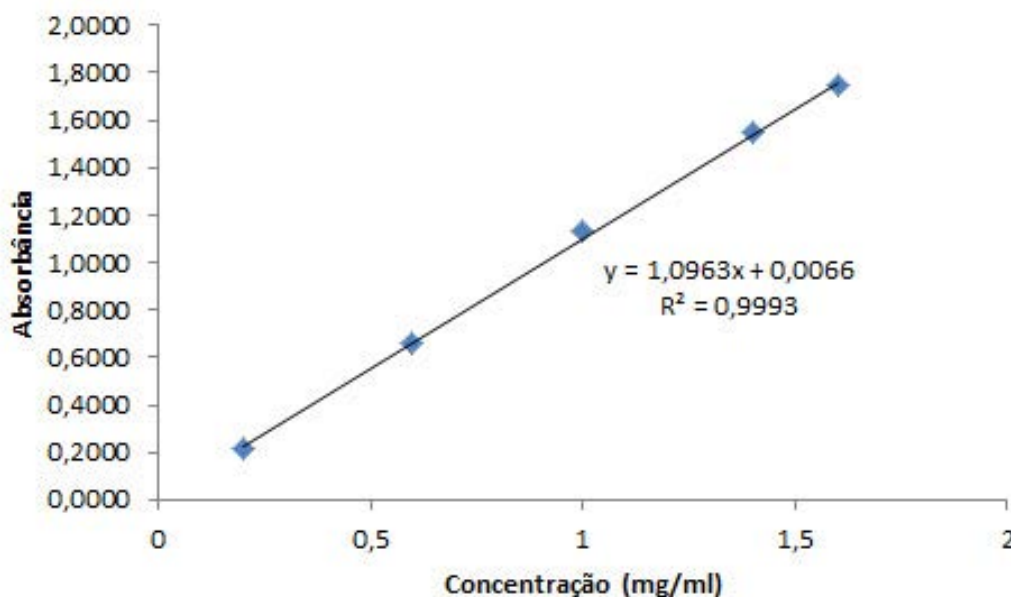
A curva analítica foi concebida relacionando a concentração de PZQ à resposta obtida por espectroscopia na região do UV, através de valores de absorbância a 263 nm correspondentes às concentrações do fármaco (BRASIL, 2003; ICH, 1996).

A regressão linear forneceu a equação da reta:

$$y = 1,0963 + 0,0066x$$

$$R^2 = 0,9993$$

Figura 47 - Curva analítica média final



Fonte: Próprio autor

A3. Precisão

A partir da solução estoque de PZQ em álcool etílico, foram preparadas soluções de PZQ em três níveis de concentração: baixa (0,2 mg/ml), média (1,0 mg/ml) e alta (1,6 mg/mL), correspondentes às concentrações do intervalo linear da curva analítica (Tabela 4). Estas soluções foram analisadas por espectroscopia na região do UV e a análise foi realizada em triplicata (BRASIL, 2003).

Tabela 4 – Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão (n=3)

Concentração (mg/ml)	Absorbância em 263 nm			Media	DP	CV
	N1	N 2	N 3			
0,6	0,658693	0,65712	0,65096	0,6556	0,0041	0,6234
1,0	1,114233	1,1559	1,1162	1,1288	0,0235	2,0827
1,6	1,725433	1,752133	1,7564	1,7447	0,0168	0,9620

Fonte: Próprio autor

Os resultados apresentados na Tabela 4 indicam que o método proposto mostrou-se preciso para a quantificação de PZQ, obtendo-se um coeficiente de variação menor que 5% (ANVISA, 2003).

A4. Recuperação

O teste foi realizado adicionando-se quantidades conhecidas de PZQ na solução hidroalcoólica. A quantidade de fármaco adicionada corresponde às regiões inferior, mediana e superior da curva analítica, respectivamente, 0,2, 1,0 e 1,6 mg/mL. As amostras foram analisadas por espectroscopia na região do UV.

A recuperação foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de fármaco adicionada à amostra, acrescida dos intervalos de confiança, utilizando a equação 1 (BRASIL, 2003):

:

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

onde:

C = média das concentrações determinadas experimentalmente;

C₀ = concentração teórica inicial.

O percentual de recuperação do fármaco é apresentado na Tabela 5. Os resultados mostram índices de recuperação adequados, dentro da faixa recomendada pela ANVISA (2003), cujo intervalo é de 80 a 120%.

Tabela 5 – Percentual de recuperação de PZQ das dispersões sólidas (n = 3)

Concentração (mg/ml)	Media Absorbância	Conc . Experimental (mg/mL)	Recuperação (%)
0,2	0,220	0,207	103,5128
1,0	1,129	1,036	103,5645
1,6	1,745	1,597	99,83898

Fonte: Próprio autor

A5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Para a realização desta análise foram preparadas três soluções em concentrações próximas ao limite inferior da curva analítica e avaliado o desvio padrão dos valores encontrados para que, pelos respectivos cálculos matemáticos, fosse possível determinar LD e LQ. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O LD é determinado pela menor quantidade de fármaco presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

O LD foi calculado baseando-se no desvio padrão (s) e na inclinação da curva analítica (σ) expresso como:

$$LD = \frac{\sigma \times 3}{S} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

σ = desvio padrão

S = inclinação da curva analítica.

O LQ é determinado pela menor quantidade de fármaco em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

O LQ foi calculado baseando-se no desvio padrão (s) e na inclinação da curva analítica (σ) expresso como:

$$LQ = \frac{\sigma \times 10}{S} \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

σ = desvio padrão

S = inclinação da curva analítica

Os valores obtidos na determinação dos limites de detecção e de quantificação estão apresentados nas Tabelas 6. Os resultados mostram que o método analítico é adequado para a quantificação de PZQ, obedecendo a faixa linear da curva analítica que foi de 0,2 a 1,6 mg/mL.

Tabela 6 – Limites de Detecção e Quantificação do PZQ em 263nm (n=3)

Concentração	0,2-1,6 mg/mL
Inclinação as curva (a)	1,096267
Intercepto (b)	0,009833
Desvio padrão	0,004366
Limite de Detecção (LD)	0,013143
Limite de Quantificação(LQ)	0,039828

Fonte: Próprio autor