

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

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO PRAZIQUANTEL

FERNANDA KOLENYAK DOS SANTOS

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO

ARARAQUARA - SP

2011

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

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO PRAZQUANTEL

FERNANDA KOLENYAK DOS SANTOS

Dissertação 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 Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA – SP

2011

Ficha Catalográfica

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

S237d Santos, Fernanda Kolenyak dos
Desenvolvimento e caracterização de carreadores lipídicos
nanoestruturados contendo praziquantel / Fernanda Kolenyak dos Santos. –
Araraquara, 2011
80 f.

Dissertação (Mestrado) – 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. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 3.
Esquistossomose. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

À Neuda e toda sua família por terem me recebido de braços abertos em sua família, por me apoiarem sempre, por torcerem por mim. Tem sido como uma família para mim tem estado ao meu lado em todos os momentos desde os mais alegres aos mais difíceis demonstrando a verdadeira amizade. Algumas pessoas entram na

nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem. Amo muito todos vocês.

À professora Dr^a Maria Palmira Daflon Gremião pela oportunidade, orientação, amizade, pelo incentivo, pela paciência, confiança e, principalmente, pelo exemplo de profissional, pelos conhecimentos adquiridos durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação e por me ajudar no meu crescimento profissional.

Ao professor Dr. Marlus Chorilli, pela amizade, confiança e pelas sugestões dadas no meu exame de qualificação.

Aos professores Raul Cesar, Ana Dóris, Anselmo Gomes, pelos bons momentos e agradáveis conversas.

Aos professores Silmara Marques Allegretti e Beatriz Stringhetti Ferreira Cury, pelas sugestões dadas na minha Defesa de Dissertação.

Agradeço em especial às minhas amigas Fernanda Carbinatto, Hilris e Grazielle que tem me ajudado desde o primeiro dia que estive na UNESP, por tudo que tem me ensinado e por todo apoio que tem dado, pelos conselhos e pelo exemplo de profissionalismo, tem sido como verdadeiras irmãs para mim tem estado ao meu lado em todos os momentos desde os mais alegres aos mais difíceis demonstrando sua amizade e carinho.

Aos amigos, Liliane Pedreiro, Flavio, Ana Luiza, Charlene, pela amizade, apoio, pelos ótimos momentos de descontração, pelos conselhos pela ajuda que me prestaram dentro e fora do laboratório, por todo carinho e atenção que tiveram comigo.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório e de outros laboratórios de Giselle, Gisela, Samanta Siqueira, Gustavo, Priscileila, Flavia, Mariana, Márcia, Andréia, Gabriela, Renan, Cristina Franzini, Kelly, Daniele Vieira, Ana Paula, Juliana, Flavia Ribeiro,

Geysiane, Patricia, Lucas pelos agradáveis momentos que passamos juntos, pela diversão e pela ajuda que me deram sempre que precisei.

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

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

Às funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pela dedicação.

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

À CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença que atinge cerca de 200 milhões de pessoas no mundo todo. A alta incidência desta doença está ligada à falta de condições sanitárias, ao diagnóstico tardio e, principalmente, à falta de tratamento medicamentoso eficiente. O praziquantel é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da esquistossomose. No entanto, falhas no tratamento com este fármaco e relatos de isolamento de *S. mansoni* tolerantes podem comprometer a eficiência do PZQ. Assim, o PZQ representa um fármaco em que pesquisas para melhorar as suas propriedades biofarmacêuticas são necessárias, pois apresenta baixa solubilidade em meio aquoso e biodisponibilidade baixa ou errática. O presente trabalho vê como finalidade desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) contendo praziquantel empregando como sistema lipídico o monoestearato de glicerila (GMS) e o ácido oléico (AO) e como sistema tensoativo a associações de monoestearato de polioxietileno sorbitano 60 (TWEEN60), fosfatidilcolina, Poloxamer (Pluronic F-127 PLU). Os NLCs foram preparados através de dois diferentes métodos, de sonicação e alta velocidade de cisalhamento a quente. Os sistemas foram caracterizados através da avaliação dos parâmetros de distribuição de tamanho, potencial zeta, índice de polidispersidade e eficiência de encapsulação. O transporte intestinal do fármaco foi avaliado através do modelo do saco intestinal invertido. Ambos os métodos de obtenção empregados mostraram-se eficazes para o preparo dos NLCs em escala nanométrica, com índice de polidispersidade homogêneo e um potencial zeta indicando uma boa estabilidade do sistema. Foi possível observar que a absorção do PZQ na formulação contendo fosfatidilcolina e pluronic como sistema tensoativo foi semelhante a do PZQ livre, enquanto que o PZQ na formulação contendo fosfatidilcolina e tween60 foi absorvido em menor quantidade. Ambos os sistemas apresentaram uma eficiência de encapsulação que indica uma grande parcela de fármaco no interior dos NLCs.

ABSTRACT

The Schistosomiasis is a debilitating disease with high misfit in the quality of people life reached about 200 million people worldwide. The high incidence of this disease is linked to poor sanitary conditions, late diagnosis, and especially the lack of effective drug treatment. Praziquantel is the drug of first choice for treatment of schistosomiasis. However, treatment failures with this drug and reports of isolation of *S. mansoni* tolerance may compromise the efficiency of PZQ. Thus, the PZQ represents an example in which surveys to improve the biopharmaceutical properties are needed, since it has low solubility in aqueous and low or erratic bioavailability. This work aims to develop nanostructured lipid carriers (NLC) containing praziquantel employing as lipid system the glycerin monostearate (GMS) and oleic acid (OA) as a surfactant system and some combination of polyoxyethylene sorbitan monostearate 60 (TWEEN60), phosphatidylcholine and Poloxamer (Pluronic F-127 PLU) as a surfactant system. NLCs were prepared by two different methodologies, the sonication and high shear rates to warm. The systems were characterized by determination of size distribution, zeta potential, polydispersity index and encapsulation efficiency. The intestinal transport of the drug was evaluate by using the model of inverted intestinal sac. Both methods were effective for the preparation of NLCs with an average diameter in the nanometer range, the polydispersity index indicating homogeneity of particle size and a zeta potential indicating a good stability of the system. It was observed that the absorption of the formulation containing PZQ PLURONIC as phosphatidylcholine and surfactant system was similar to the free PZQ, PZQ while the formulation containing phosphatidylcholine and tween60 was absorbed in smaller quantities. Both systems showed an efficiency of encapsualção indicates that a large portion of the drug within the NLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global da esquistossomose.....	15
Figura 2. Ciclo de vida das diferentes espécies de <i>Schistosoma mansoni</i>	17
Figura 3. Estrutura química do PZQ.....	19
Figura 4. Efeito de formulações lipídicas na absorção de fármacos.....	21
Figura 5. Classificação do modelo de incorporação de fármacos nos NLCs...	25
Figura 6. Estrutura interna menos ordenada do NLC.....	25
Figura 7. Representação esquemática do método de emulsificação e evaporação do solvente.....	28
Figura 8. Representação esquemática do preparo de nanopartículas empregando o método de microemulsão.....	29
Figura 9 Representação esquemática do método de sonicação.....	30
Figura 10. Representação esquemática do método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente.....	31
Figura 11. Representação esquemática do método de homogeneização e alta pressão a quente.....	33
Figura 12. Preparo dos NLCs empregando o método de sonicação.....	39
Figura 13. Preparo dos NLCs empregando o método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente.....	39
Figura 14. Distribuição do diâmetro médio dos NLC_PC/TW empregando o método de sonicação.....	47
Figura 15. Distribuição de diâmetro médio dos NLC_PC/TW_PZQ empregando o método de sonicação.....	47
Figura 16. Distribuição de diâmetro médio dos NLC_PC/TW empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	48
Figura 17. Distribuição de diâmetro dos NLC_PC/TW_PZQ empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	48
Figura 18. Potencial zeta dos NLC_PC/TW empregando o método de sonicação.....	49
Figura 19. Potencial zeta dos NLC_PC/TW_PZQ empregando o método de sonicação.....	49
Figura 20. Potencial zeta dos NLC_PC/TW empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	49
Figura 21 Potencial zeta dos NLC_PC/TW_PZQ empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	50
Figura 22. . Distribuição de diâmetro dos NLC_PC/PLU preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	52
Figura 23. Distribuição de diâmetro dos NLC_PC/PLU_PZQ preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	52
Figura 24. Distribuição de diâmetro dos NLC_TW/PLU preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	53
Figura 25. Distribuição de diâmetro dos NLC_TW/PLU_PZQ preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	53
Figura 26. Potencial zeta dos NLC_PC/PLU preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	54
Figura 27. Potencial zeta dos NLC_PC/PLU_PZQ preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	54

Figura 28. Potencial zeta para NLC_TW/PLU preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	54
Figura 29. Potencial zeta para NLC_TW/PLU_PZQ preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	55
Figura 30. Espectro de absorção do PZQ em etanol na região do UV.....	56
Figura 31. Curva analítica do PZQ em etanol no comprimento de onda de 264nm.....	58
Figura 32. Porcentagem de PZQ absorvido através do segmento do saco intestinal invertido.....	61
Figura 33. Representação do diâmetro médio para os NLCs contendo PC/TW, PC/PLU, TW/PLU preparados empregando os métodos de sonicação e homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente....	64
Figura 34. Representação do índice de polidispersidade para os NLCs contendo PC/TW, PC/PLU, TW/PLU preparados empregando os métodos de sonicação e homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	64
Figura 35 Representação do potencial zeta para os NLCs contendo PC/TW, PC/PLU, TW/PLU preparados empregando os métodos de sonicação e homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lipídios e tensoativos utilizados no preparo dos NLCs	26
Tabela 2. Proporção dos componentes de fase lipídica do GMS/AO empregados na produção dos NLCs.....	37
Tabela 3. Nomenclatura dos diferentes NLCs.....	38
Tabela 4. Solubilidade do PZQ na fase lipídica (GMS/AO).....	45
Tabela 5. Distribuição de tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta dos NLCs contendo ou não PZQ e PC/TW obtidos pelos métodos de sonicação e homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	50
Tabela 6. Comparação da distribuição de tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta dos NLCs contendo ou não PZQ empregando PC/PLU, PC/TW e TW/PLU, como sistemas tensoativos, empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.....	55
Tabela 7. Precisão intra-corrida.....	59
Tabela 8. Precisão inter-corrida.....	59
Tabela 9. Limite de detecção e limite de quantificação do PZQ.....	60
Tabela 10. Determinação eficiência de encapsulação.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AO	Ácido Oléico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DP	Desvio Padrão
GMS	Monoestearato de glicerila
ICH	International Commission on Harmonisation
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
NLC	Carreadores lipídicos nanoestruturados
PC	Fosfatidilcolina
PLU	Pluronic
PZQ	Praziquantel
SLN	Nanopartículas sólidas lipídicas
TW	Polissorbato 60
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Esquistossomose	13
1.2 Sistemas de liberação controlada de fármacos	21
1.3 Métodos empregados na produção de NLCs	27
2. OBJETIVO	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material	35
3.1.1 Substâncias e Reagentes	35
3.1.2 Equipamentos	35
3.2 Métodos	36
3.2.1 Seleção da proporção de GMS/AO empregadas para preparação dos NLCs.....	36
3.2.2 Determinação da solubilidade do PZQ na fase lipídica	37
3.2.3 Identificação da nomenclatura dos NLCs empregados neste trabalho	37
3.2.4 Desenvolvimento dos NLCs contendo PC/TW empregando o método de sonicação.....	38
3.2.5 Desenvolvimento dos NLCs empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente	39
3.2.6 Caracterização dos sistemas empregando a técnica de análise de diâmetro médio das partículas e potencial zeta	40
3.2.7 Validação da metodologia analítica	41
3.2.8 Determinação da eficiência de encapsulação	43
3.2.9 Avaliação, <i>in vitro</i> , da absorção intestinal do PZQ pelo método do saco intestinal invertido.....	43
4. RESULTADOS	45
4.1 Seleção da proporção de GMS/AO utilizados como fase lipídica dos NLCs.	45
4.2 Desenvolvimento dos NLCs contendo PC/TW como sistema tensoativo empregando o método de sonicação e homogeneização de alta velocidade de cisalhamento a quente	46
4.3 Desenvolvimento e caracterização dos NLCs empregando o método de homogeneização de alta velocidade de cisalhamento a quente contendo diferentes combinações de sistemas tensoativos	51
4.4 Validação da metodologia analítica para determinação de PZQ por espectrometria ultravioleta....	56
4.5 Determinação da eficiência de encapsulação	60
4.6 Avaliação da absorção intestinal <i>in vitro</i> utilizando o saco intestinal invertido	61
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	68
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose

As doenças parasitárias provocadas por protozoários ou helmintos patogênicos são de imensa importância global, pois afetam mais de três bilhões de pessoas no mundo, número que corresponde a quase 50% da população mundial; além disso, as infecções parasitárias causam morbidade e podem provocar mortalidade (LIMA, 2006; DATE *et al.*, 2007). O perfil das doenças parasitárias alterou-se nos últimos anos. Algumas têm se expandido geograficamente devido a fatores como: migração de humanos, climáticos e geográficos; outras se expandiram devido ao movimento da população como viagens para regiões tropicais, levando a doença para áreas distantes do foco endêmico e outras tem se extinguido (SHAW, 2008).

As helmintíases são bastante disseminadas e geram expressivos danos na saúde das populações. Dentre as condições que promovem estas infecções incluem-se: falta de condições sanitárias adequadas, higiene pessoal, debilitação e resistência comprometida do hospedeiro, falta de controle dos vetores parasitários e resistência aos fármacos utilizados no tratamento. Por isso, torna-se necessário o seu combate através de medidas adequadas preventivas, que dependem de educação, melhoria de vida e tratamento adequado (LIMA, 2006).

As infecções parasitárias são conhecidas como doenças negligenciadas e dentre elas as helmintíases, como a esquistossomose que é uma doença crônica que compromete a saúde pública dos países em desenvolvimento (LIMA, 2009; HOTEZ *et al.*, 2007). A prevenção e controle das doenças parasitárias exigem conhecimento dos fenômenos ecológicos que envolvem o homem, o parasito, e os hospedeiros intermediários ou vetores desses parasitos (REY, 2008).

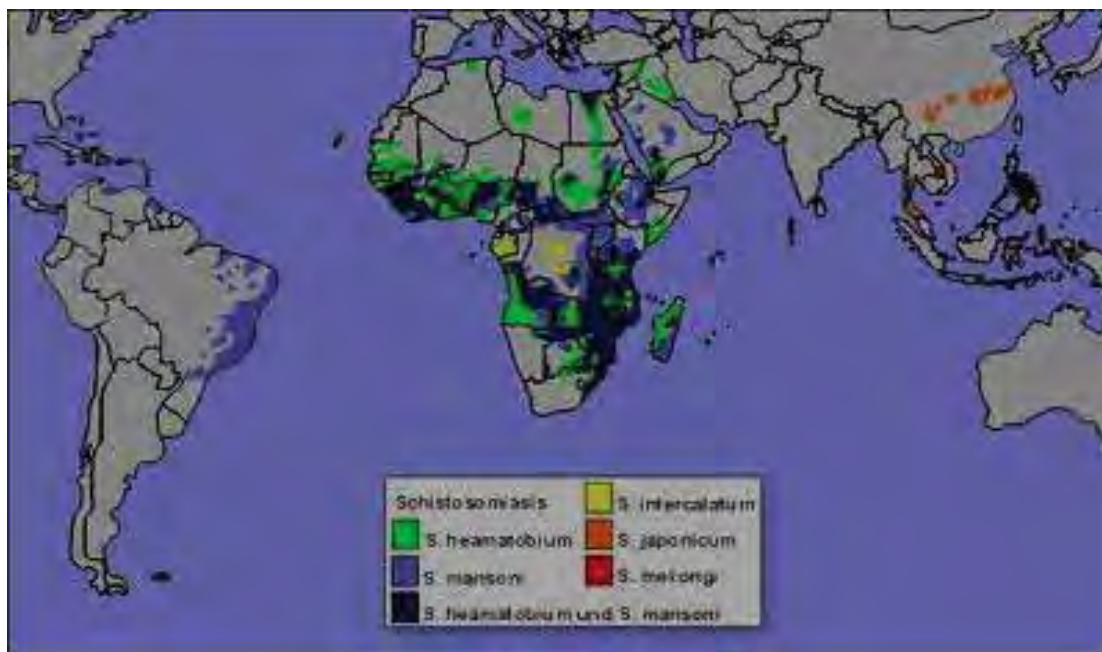
Apesar dos esforços de pesquisa, até o presente, não existem vacinas eficazes contra as doenças parasitárias devido ao fato dessas doenças não suscitarem uma resposta imune pronunciada. Deste modo, o tratamento medicamentoso antiparasitário continua sendo um dos métodos mais eficazes contra essas doenças. Por outro lado, a taxa de desenvolvimento de novos

fármacos é muito baixa comparada aos demais segmentos. Assim, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos representa uma estratégia interessante para melhorar a eficácia de fármacos, a especificidade, a tolerância e o índice terapêutico dos antiparasitários já utilizados na terapêutica (DATE *et al.*, 2007).

Dentre as helmintíases, a esquistossomose, também conhecida como Bilharziose ou barriga d' água, é uma infecção causada por um parasito intravascular de vida longa (LIMA, 2009; KING, 2009), o trematóideo do gênero *Schistosoma*, o qual apresenta várias espécies adaptadas ao parasitismo, como *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum* e o *S. mansoni*. Sendo o *S. mansoni* responsável por esta parasitose no Brasil (LEÃO *et al.*, 2001; JEZIORSKI & GREENBERG, 2006). Apesar de mais de um século de esforços no controle da utilização de esquistomicidas, a esquistossomose continua a ser uma das doenças mais prevalentes mundialmente (KING, 2009). Afeta aproximadamente 200 milhões de pessoas, matando cerca de 280.000 pessoas, com uma grande porcentagem dos indivíduos infectados residindo no continente Africano (JEZIORSKI & GREENBERG, 2006; VAN DER WERF *et al.*, 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), nas áreas tropicais e subtropicais a esquistossomose só é superada pela malária em termos de número de casos e importância sócio-econômica e de saúde pública (DISCH *et al.*, 2002; JABOR *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2000). No mundo, ocorre em 54 países, destacando-se os da África, Leste do Mediterrâneo, América do Sul e Caribe. No Brasil, é considerada uma endemia, que atinge 19 estados, estando presente, de forma endêmica do Maranhão até Minas Gerais com focos no Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Distrito Federal e Rio Grande do Sul. Possui baixa letalidade e alta morbidade e as principais causas de óbito estão relacionadas ao comprometimento de alguns órgãos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). A figura 1 apresenta a distribuição global da esquistossomose.

Figura 1. Distribuição global da esquistossomose, disponível em: www.bueger.de/prima/maps/schisto.htm, acessado em 18/12/2009.



O esquistossoma é um parasita para o hospedeiro vertebrado (homem), mas também vive com um hospedeiro intermediário (molusco) (MONÉ & BOISSIER, 2004). O *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. mekongi* se instalam no intestino e o sistema porta. Os ovos eliminados pelo parasita, parte saem pelas fezes e parte ficam retidos nos órgãos provocando a formação de granulomas. (NEVES, 1985; FERREIRA *et al.*, 2003; REY, 2008).

O ciclo de vida dos esquistossomas é complexo e alterna as gerações, envolvendo uma fase de reprodução sexuada no hospedeiro definitivo (o homem) e uma fase assexuada no hospedeiro intermediário, o caramujo (UTZINGER *et al.*, 2001; MONÉ & BOISSIER, 2004; SILVA *et al.*, 2005; GRYSEELS *et al.*, 2006).

Os vermes adultos alojam-se aos pares em vênulas terminais do plexo mesentérico inferior que drenam o sangue para a parede intestinal, especialmente, o cólon sigmóide e outras porções do intestino grosso humano. A cada dia, cerca de 300 ovos são eliminados pela fêmea no interior das vênulas. A presença de espinho lateral é a característica mais proeminente desses ovos. A inflamação que a presença dos ovos provoca no hospedeiro pode resultar em ruptura da parede da vênula, liberando os ovos nos tecidos

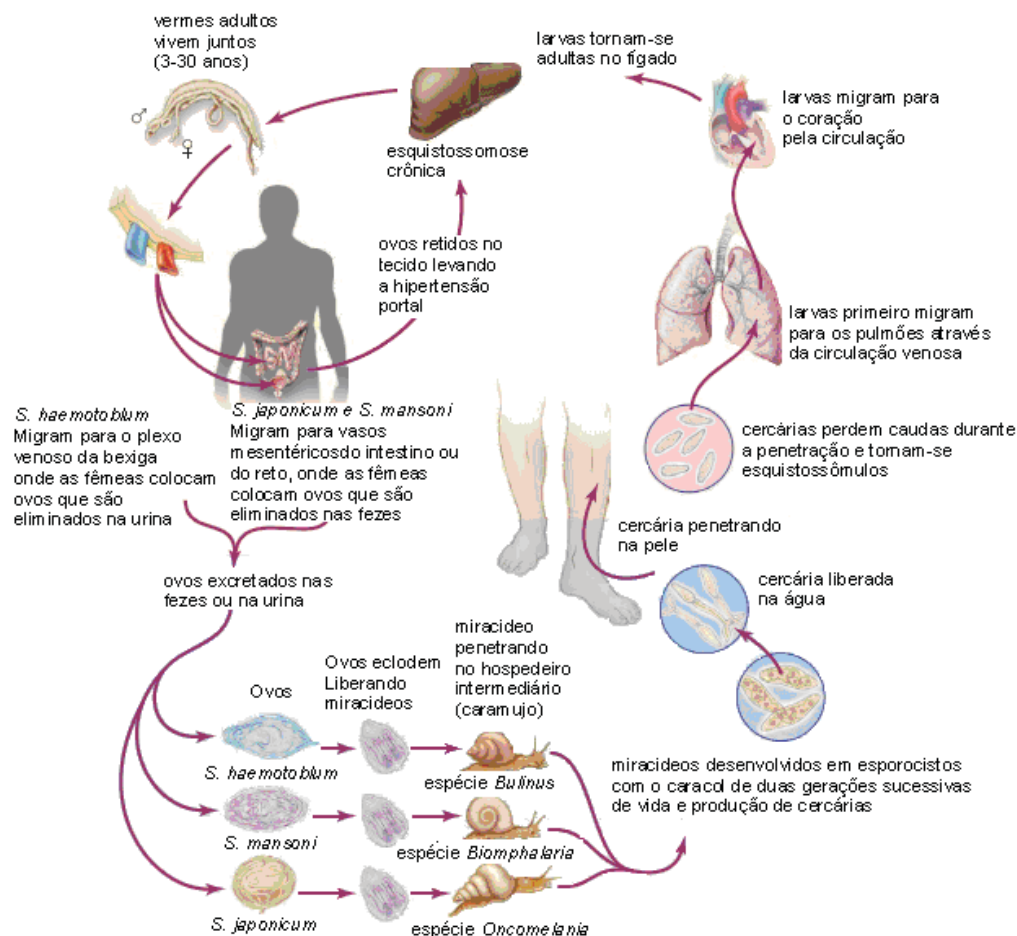
perivasculares e finalmente para a luz intestinal (FERREIRA *et al.*, 2003; MONÉ & BOISSIER, 2004).

Depois de atravessarem a mucosa intestinal, os ovos são eliminados com as fezes e, quando chegam a ser arrastados em tempo útil para dentro das águas superficiais, libertam seus miracídeos, que nadam durante algumas horas até encontrar os moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*. No seu interior, as larvas se transformam em esporócitos primários, que pela multiplicação de suas células germinativas, produzem esporócitos secundários. Cada esporócito secundário produzirá grande número de cercarias, as quais são liberadas na água e podem sobreviver até 2 dias, sendo a forma infectante no homem (KATZ & DIAS, 2001; REY, 2008; MONÉ & BOISSIER, 2004).

Após a penetração na pele humana, a cercária se transforma em esquistossômulo, sendo estes suscetíveis ao ataque da resposta efetora celular mediada por anticorpos que reconhecem antígenos expressos em sua superfície, pois alteram sua bioquímica permitindo que eles escapem do sistema imune do hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2003; HELLEMOND *et al.*, 2006; KATZ & DIAS, 2001; SILVA *et al.*, 2005).

As larvas que não são destruídas conseguem penetrar no vaso e são levadas ao coração e pulmões, em nove dias, migram para o fígado, onde se alimentam e se desenvolvem, alcançando a vida adulta e finalmente atingem as veias mesentéricas, onde formam casais e iniciam a produção de ovos, que podem ficar retidos nos órgãos ou podem ser eliminados pelas fezes, sendo os ovos do *S. haematobium* eliminados pela urina (KATZ & DIAS, 2001; HELLEMOND *et al.*, 2006). Os vermes adultos podem tornar seu tegumento resistente aos mecanismos efetores imunorreguladores que clivam imunoglobulinas e inibem a ação de linfócitos e mastócitos (FERREIRA *et al.*, 2003). A Figura 2 ilustra o ciclo de vida dos diferentes *Shistossomas*.

Figura 2. Ciclo de vida das diferentes espécies de *Schistosoma mansoni* (adaptado de KING, 2009)



A fase aguda geralmente é assintomática, e na fase crônica as manifestações mais comuns desta doença são: febre, calafrios, fraqueza, perda de peso, dores de cabeça, náuseas, vômitos, diarreia, hepatomegalia, esplenomegalia e eosinofilia, em casos mais graves podem ser consideradas neoplasia intestinal e doenças granulomatosas do intestino como colites ulcerativas (NEVES, 1985; FERREIRA *et al.*, 2003; REY, 2008).

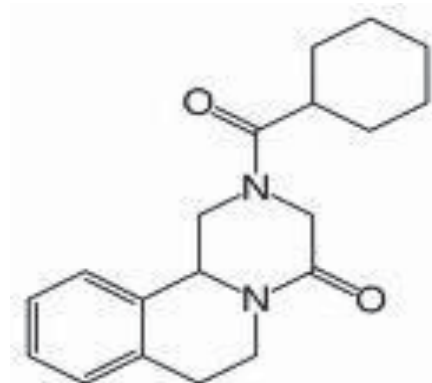
No Brasil, apenas dois fármacos esquistossomicidas são utilizados, a oxamniquina e o PZQ. A oxamniquina apresenta efeitos colaterais no sistema nervoso central, efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Além disso, a decisão da empresa farmacêutica detentora do registro do produto contendo oxamniquina de limitar a produção de medicamentos com este fármaco torna o

PZQ a única alternativa de tratamento para esta parasitose (COURA, 2005; SILVA *et al.*, 2005).

O PZQ descoberto em 1972 foi desenvolvido primeiramente para uso em veterinário contra cestódeos, em seguida para tratamento da esquistosomose humana, sendo o primeiro anti-helmíntico a atender os requisitos da OMS. (COURA, 2005; SILVA *et al.*, 2005; SPERA, 2005). É altamente efetivo contra as espécies de *Schistosoma*. Além da sua atividade esquistomicida é eficaz também contra as espécies de cestódeos, principalmente a *Taenia solium*. *T. saginata*, *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, *Diphyllobotrium* *D. pacificum*, além disso, quando associado a anti-inflamatórios, apresenta-se eficaz para o tratamento de neurocisticercos. Tem pouco ou nenhum efeito adverso e nos últimos anos, seu preço tem sido reduzido substancialmente (MAINARDES, 2004; LIMA, 2006; JEZIORSKI, GREENBERG, 2006; SHAOHONG *et al.*, 2006; SHUHUA, 2005; UTZINGER *et al.*, 2001). Apesar disto, falhas no tratamento com este fármaco, relatos de isolamento de *S. mansoni* resistentes ao PZQ no Egito e no Senegal, juntamente com a capacidade de selecionar linhagens tolerantes em laboratório, aumentam a possibilidade de propagação destes parasitas (GRYSEELS *et al.*, 2006; HAGAN *et al.*, 2004; PICA-MATTOCCIA *et al.*, 2004; CIOLI *et al.*, 2004; SHUHUA *et al.*, 2000).

O PZQ é comumente encontrado como uma mistura racêmica (1:1 na mistura de enantiômeros), em que o R-(-)-enantiômero, ou *levo*, é ativo, enquanto que o S-(+)-enantiômero, ou *dextro*, é inativo, desta forma, a atividade anti-helmíntica está relacionada principalmente ao enantiômero R (-) (FENWICK *et al.*, 2003, SPERA, 2005). Quimicamente, o PZQ é a 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1a] isoquinolin-4-ona; possui como fórmula química $C_{19}H_{24}N_2O_2$, e o peso molecular (PM) é 312,41 g/mol. As especialidades farmacêuticas disponíveis comercialmente são Cestox[®] e Cisticid[®] e sua fórmula estrutural está ilustrada na Figura 3 (SHUHUA, 2005; FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2002; KOROLKOVAS, 2009; USP, 2002).

Figura 3. Estrutura química do PZQ (PM=312,41) Fonte: Farmacopeia Britânica, 2002



A ação anti-helmintica do PZQ devida à inibição da bomba Na^+/K^+ dos esquistossomas. Com resultado, aumenta a permeabilidade da membrana do helminto a cátions monovalentes e divalentes, principalmente o cálcio, que leva a intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espástica. Como consequência, os helmintos separam-se dos tecidos do hospedeiro. Causa despolarização da membrana tegumentar do *S. mansoni*, além de reduzir a atividade ATPase, o nível de ATP e a captura da glicose. As mudanças estruturais dos tegumentos induzidos por PZQ ocorrem na seguinte sequência: despolarização de rede microtrabecular, seguida pela vacuolização e então erosão da superfície. Estes efeitos danificam a função do músculo e a estrutura tegumentar resultando na morte do parasita. O PZQ inibe também, em baixas concentrações, a produção de ovos pelos parasitas fêmeas (SILVA, 2001; MAINARDES, 2004; ISMAIL *et al.*, 1999; JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2006; NOVAES *et al.*, 1999; TALLIMA & RIDI, 2007).

Apesar de ser muito utilizado, o praziquantel apresenta características que limitam o seu uso, como o metabolismo pré-sistêmico, a baixa solubilidade em água, e a biodisponibilidade baixa da forma convencional, os comprimidos (MOURÃO *et al.*, 2005; SPERA, 2005). Assim, o desenvolvimento de alternativas tecnológicas que melhorem estas propriedades é necessário (ISMAIL *et al.*, 1999; JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2006; SHAOHONG *et al.*, 2006; SHUHUA, 2005).

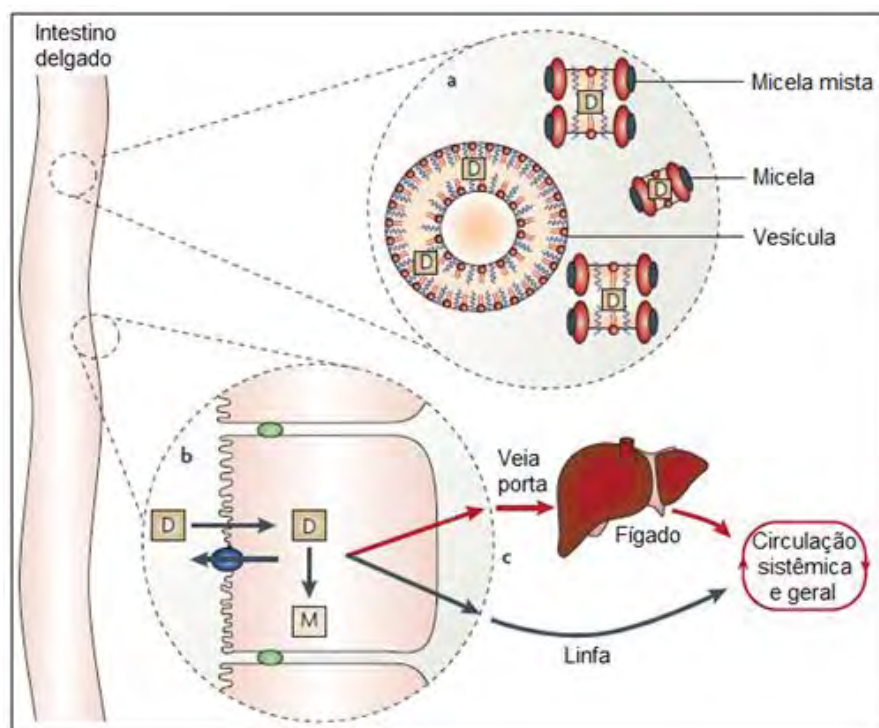
Os fármacos que são pouco solúveis em água apresentam uma taxa de dissolução baixa, levando muito tempo para ser absorvido, resultando em uma biodisponibilidade incompleta ou errática. A importância da biodisponibilidade

de fármacos administrados pela via oral está relacionada às suas propriedades físico-químicas e à fatores fisiológicos como mobilidade intestinal, viscosidade, volume de fluído, entre outros (BONLOKKE *et al.*, 2001; HÖRTER & DRESSMAN, 2001). A absorção de fármacos pouco solúveis em água pode ser limitada pela taxa de dissolução do fármaco (PORTER, *et al.*, 2007).

Embora o mecanismo exato do transporte intestinal de fármacos lipofílicos não seja completamente entendido, Porter *et al.*, 2007 em seu trabalho afirmam que os fármacos podem ser transportados para a circulação sistêmica pela veia porta, entretanto o sistema linfático pode ser o caminho importante de absorção para fármacos altamente lipofílicos e os fármacos incorporados em nanopartículas lipídicas poderiam evitar o efeito pré-sistêmico e chegar a uma redução da dose administrada empregando a via linfática para atingir a circulação sistêmica (YANG *et al.*, 2009).

Neste trabalho os autores discutem as vantagens da utilização de sistemas lipídicos na absorção de fármacos lipofílicos e os mecanismos pelos quais os lipídios ou excipientes lipofílicos podem afetar a absorção, biodisponibilidade e eliminação do fármaco após a administração oral. São eles: a alteração do meio intestinal, o transporte linfático e o transporte através dos enterócitos. Fármacos administrados por via oral podem se difundir através dos enterócitos e serem absorvidos pelos capilares da veia porta, passar pelo do fígado e assim, serem absorvidos para a circulação sistêmica. Fármacos altamente lipofílicos, no entanto, podem associar-se com a lipoproteína da linfa no enterócito e ter acesso ao sistema linfático intestinal e passar para circulação sistêmica, evitando a passagem pelo fígado Porter *et al.*, 2007 (Figura 4).

Figura 4. Efeito de formulações lipídicas na absorção de fármacos. (Porter *et al.*, 2007). D – fármaco solubilizado no meio intestinal e M – estruturas coloidais (micelas ou vesículas). Adaptado de Porter *et al.*, 2007.



1.2 Sistemas de liberação controlada de fármacos

Muitas estratégias têm sido utilizadas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, permitindo o aumento da eficiência de fármacos utilizados na terapêutica atual (CAMPOS, 2009). Com o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, a administração pela via oral passou a apresentar muito mais benefícios aos pacientes, dentre eles se encontram o aumento da eficácia, diminuição da toxicidade, direcionamento do fármaco, diminuição do número de doses, entre outros (OLIVERA, 2005; REDESCHI, 2006). Muitas alternativas tecnológicas que melhoram as propriedades dos fármacos pouco solúveis em água têm sido focadas no desenvolvimento de sistemas de liberação, como os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas, os carreadores lipídicos nanoestruturados, as

micro e nanopartículas poliméricas, as microemulsões, as dispersões sólidas e os cristais líquidos (KREILGAARD, 2002).

A nanotecnologia tem representado um grande avanço no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos, podendo, direcioná-lo para alvos específicos onde exercerá o efeito farmacológico, favorecer a interação com sistemas biológicos, além de poder controlar a velocidade de liberação sem alterar a estrutura química do fármaco transportada (FORMARIZ *et al.*, 2005; URBAN, 2004; OLIVEIRA & SCARPA, 2001).

Os sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos são caracterizados por ter tamanho de partículas reduzido, motivo pelo qual têm sido empregados com sucesso na área farmacêutica e por apresentarem a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente, diversos grupos de agentes terapêuticos e de modificar as propriedades e o comportamento de substâncias ativas em meio biológico (CINTO, 2005; MAINARDES *et al.*, 2005; MOURÃO *et al.*, 2005; SILER-MARINKOVIC *et al.*, 1997). Esses sistemas têm contribuído também para elucidar os mecanismos biológicos, pois podem reproduzir de forma simplificada alguns fenômenos que ocorrem no meio biológico (GREMIÃO *et al.*, 1996).

As nanopartículas têm sido amplamente investigadas como formas farmacêuticas por causa das suas vantagens, tais como liberação controlada de fármacos e melhoria da eficiência do fármaco, pois a redução no tamanho da partícula melhora não somente a taxa de dissolução do fármaco, mas aumenta a área de superfície (OHSHIMA *et al.*, 2009; POLETTO *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de formulações lipídicas tem contribuído para melhorar as propriedades biofarmacêuticas de fármacos lipofílicos. A capacidade de liberar eficientemente fármaco altamente lipofílico a partir de formulação lipídica tem renovado o interesse no transporte linfático de fármacos. Yang *et al.*, (2009) desenvolveram nanopartículas sólidas lipídicas contendo PZQ e verificaram que a curva de concentração plasmática do PZQ após a administração das SLN pela via oral apresentou dois picos, um em 0,25 horas e outro após 4 horas com concentrações plasmáticas máximas de 2,4 e 2,59 µg/mL, respectivamente. Estes autores sugerem que o primeiro pico de

concentração esta relacionado com o fármaco livre e o segundo com o PZQ incorporado nas SLN que estava retido no interior da matriz.

Em particular, sistemas contendo lipídios têm sido desenvolvidos para aumentar a biodisponibilidade de fármacos lipofílicos através do aumento da solubilização do fármaco no trato gastrointestinal, reduzindo a variabilidade sistêmica e podem contribuir, também, para estudo dos mecanismos de transporte através de membranas biológicas (BROGARD *et al.*, 2007; LJUSBERG-WAHREN *et al.*, 2005).

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) foram desenvolvidas no início de 1990 como um sistema carreador alternativo combinando as vantagens das nanopartículas poliméricas (matriz sólida para liberação controlada) e dos lipossomas e emulsões, mas evitando algumas das suas desvantagens em relação à estabilidade e possibilidade de escalonamento (HU *et al.*, 2008; KRISTL *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2007; MÜLLER *et al.*, 2007; RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007; ZHANG *et al.*, 2006). Diferentemente das emulsões e lipossomas, a matriz das nanopartículas lipídicas sólidas é composta de lipídios sólidos ou mistura de lipídios (JOSHI & PATRAVALE, 2008; RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007).

A matriz sólida protege as moléculas de fármacos incorporados contra a degradação química, além de utilizar excipientes com custo relativamente baixa, capacidade de serem produzidas em larga escala e amplo espectro de aplicação (oral, intravenosa, dérmica) (HU *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2007; RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007; SAUPE *et al.*, 2006; SOUTO *et al.*, 2005). Entretanto, há alguns problemas na obtenção das SLNs, devido a presença dos lipídios sólidos, tais como limitação na capacidade de encapsulamento do fármaco, expulsão do fármaco durante armazenamento devido a transformações polimórficas durante a vida útil destes sistemas e alta quantidade de água nas dispersões SLNs. (MÜLLER *et al.*, 2007)

Para diminuir o grau de organização da matriz lipídica em SLNs, bem como aumentar o encapsulamento de fármacos, uma nova geração de nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas e denominadas como carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) (FANG *et al.*, 2008; JANNIN *et al.*, 2008; TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007). Em contraste às SLNs que são produzidas a partir de lipídios sólidos, os NLCs são compostos de uma matriz

lipídica sólida encapsulando nanocompartimentos de lipídios líquidos. Uma das vantagens dos NLCs em relação às SLN inclui a expulsão do fármaco que é dificultada nos NLCs (FANG *et al.*, 2008; JANNIN *et al.*, 2008; TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007).

Os NLCs podem ser administrados pela via oral, ocular, pulmonar e intravenosa, uma outra rota bastante utilizada é a dérmica, pois a aplicação dos NLC sobre a pele pode fornecer muitos aspectos positivos, por exemplo, a formação de filme causa efeito de oclusão, apresentam um perfil de liberação controlada, são compostos biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade (JOSHI & PATRAVALE, 2008; OBEIDAT, *et al.*, 2010; SOUTO & MÜLLER, 2007).

As concentrações das substâncias presentes nos NLCs afetam as propriedades físico-químicas e o perfil de liberação do fármaco. As características dos lipídeos incluindo ponto de fusão, viscosidade, forma de cristalinização e hidrofiliicidade apresentam grande impacto na estabilidade das formulações de NLCs (LIU & WU, 2009). Outro ponto importante é que na presença do lipídio líquido, a matriz da partícula mostra uma redução no ponto de fusão quando comparado com o lipídio sólido isoladamente (JOSHI & PATRAVALE, 2008; OBEIDAT, *et al.*, 2010).

Os NLCs são considerados a geração mais inteligente de sistemas que possuem propriedades de carreamento de fármacos, devido sua natureza lipofílica, são bastante utilizados como sistema de carreadores para alguns fármacos que são mais solúveis em lipídios líquidos do que lipídios sólidos (CHEN *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 2004), o que pode levar a uma maior capacidade de encapsulamento dos NLCs. Sendo assim, os NLCs podem apresentar uma maior capacidade de encapsulamento. Por outro lado, a expulsão do fármaco durante o tempo de armazenamento também é minimizado (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007).

Dependendo da natureza dos lipídios utilizados na preparação dos NLCs, diferentes tipos de matrizes podem ser formados (SOUTO & MÜLLER, 2007), como ilustrado na figura 5.

➤ Tipo I se refere ao tipo de cristal imperfeito, devido a formação de uma matriz única, que podem acomodar o fármaco.

➤ Tipo II é chamado de sistema amorfo, quando a mistura de lipídios não é recristalizada após o resfriamento, e estes obtêm partículas sólidas contendo sua estrutura amorfa.

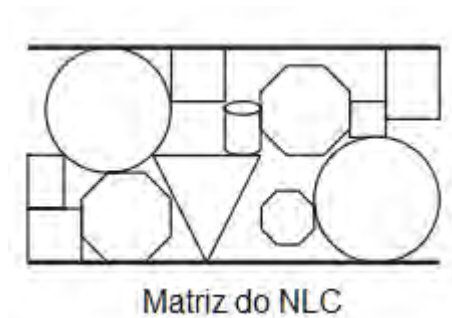
➤ Tipo III também chamado de tipo múltiplo, ocorre com certos números de fármacos que são mais solúveis no lipídio líquido do que no lipídio sólido (SOUTO & MÜLLER, 2007).

Figura 5. Classificação do modelo de incorporação de fármacos nos NLCs (Souto & Müller, 2007)



Como nem sempre é possível produzir gotículas de óleo no interior da matriz sólida, o mais comum, é utilizar lipídios líquidos que sejam miscíveis nos lipídios sólidos quando fundidos. Assim, na solidificação do lipídio sólido, este fixa o lipídio líquido em seu compartimentos (MÜLLER *et al.*, 2004), como ilustrado na figura 6. A adição de lipídios líquidos aos sólidos leva a criação de uma estrutura interna menos ordenada em que as moléculas de fármaco podem estar acomodadas entre as camadas lipídicas e/ou entre as cadeias de ácidos graxos (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007).

Figura 6 Estrutura interna menos ordenada do NLC (Souto & Müller, 2007)



A maioria dos lipídios utilizados são excipientes comercialmente disponíveis para uso em cosméticos ou preparações farmacêuticas (JOSHI & PATRAVALE, 2007). A redução no tamanho da partícula e o aumento da estabilidade geralmente são observadas quando um tensoativo é incorporado na formulação, especialmente quando incorporados em associações. Alguns parâmetros, como, a distribuição do tamanho das partículas e potencial zeta são importantes na avaliação da estabilidade do sistema (HAN, *et al.*, 2008; TAN, *et al.*, 2010).

A escolha dos tensoativos depende não somente das propriedades das partículas a serem suspendidas, mas também dos princípios físicos e a via de administração. De acordo com Han *et al.* (2008) a obtenção das partículas de um sistema coloidal ocorrem com a solidificação do sistema. Durante esse processo pode haver um aumento do tamanho da partículas caso o sistema não seja estável. Portanto para obter partículas estáveis a presença do tensoativo é necessária (MÜLLER *et al.*, 2006; HAN *et al.*, 2007). Várias combinações de tensoativos e fases lipídicas para a preparação dos NLCs são descritas na literatura (Tabela 1).

Tabela 1. Lipídios e tensoativos utilizados para o preparo dos NLCs

Fase lipídica	Tensoativos	Fármaco	Referência
Ácido esteárico/Ácido Oleico	Tiloxapol/ Gicolato de sódio	Clorambucil	SHARMA <i>et al.</i> , 2009
Precirol/ Esqualeno	Miverol/ Fosfatidilcolina de soja	Lovastatina	CHEN <i>et al.</i> , 2010
Monoestearina/ Miglyol®	Fosfatidilcolina, Poloxamer 188, Tween 80, dioxicolato de sódio	—	HAN <i>et al.</i> , 2007
Cera de abelha,	Tween80/Poloxamer 407	Anfotericina B	TAN <i>et al.</i> , 2010

Manteiga de cacau/Ácido Oleico			
Monoestearato de glicerila/Migliol®	Tween 80/Poloxamer 188	dihidroxiarteminina	ZHANG <i>et al.</i> , 2010
Monoestearato de glicerila/Ácido oleico	Poloxamer 188/Óleo de rícino	Ácido retinoico	XIA <i>et al.</i> , 2008

1.3 Métodos empregados na produção de NLCs

Existem diferentes métodos empregados na preparação dos NLCs descritos na literatura, como: método de alta pressão e homogeneização, método de microemulsão, emulsificação e evaporação do solvente, sonicação, entre outros (PARDEIKE *et al.*, 2009; WISSING, *et al.*, 2004). A seguir estes métodos serão brevemente descritos.

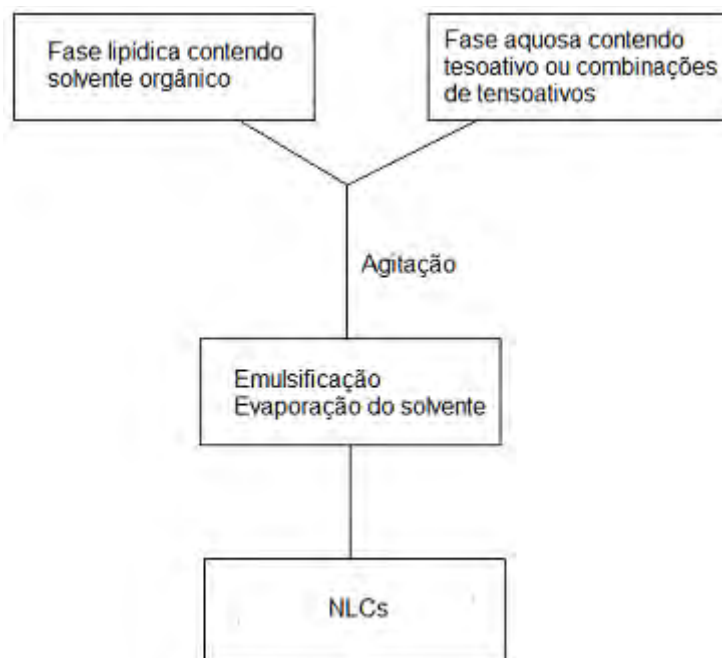
✓ Método de evaporação do solvente

Sjöström e Bergenståhl descreveram um método de produção para preparar dispersões de SLN de emulsão O/A baseado na emulsificação e evaporação do solvente (MEHNERT & MÄDER, 2001; SOUTO & MÜLLER, 2007).

Este método consiste na solubilização da fase lipídica em um determinado solvente orgânico imiscível em água, esta fase é emulsionada em uma fase aquosa contendo tensoativo ou combinações tensoativos, empregando a agitação mecânica, e após a evaporação do solvente as nanopartículas são formadas pela precipitação da fase lipídica no meio aquoso (CORTESI, *et al.*, 2002; WISSING, *et al.*, 2004; SOUTO & MÜLLER, 2007). A

figura 7 representa esquematicamente o preparo das nanoparticulas por esse o método.

Figura 7. Representação esquemática do método de emulsificação e evaporação do solvente



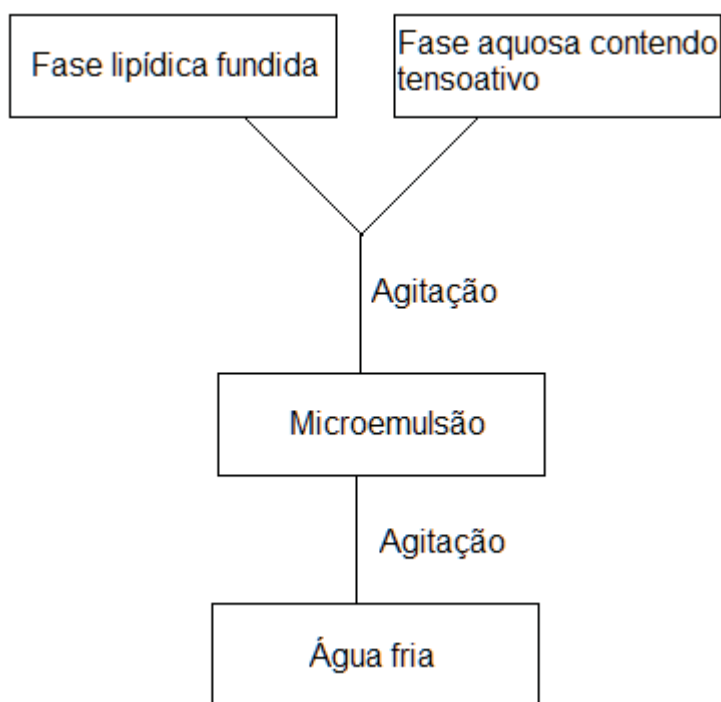
Uma importante vantagem deste método consiste na baixa temperatura utilizada no durante o preparo dos NLCs, sendo um método útil para o encapsulamento de fármacos termosensíveis. Apresenta como desvantagem a possível presença de solvente residual na dispersão final (WISSING, *et al.*, 2004).

✓ Método de microemulsão a quente

Este método foi desenvolvido por Gasco *et al.* para o preparo das SLN e tem sido adaptado e/ou modificado por vários grupos de pesquisadores (WISSING, *et al.*, 2004). As microemulsões são definidas como emulsões transparentes, em que um óleo é disperso em um meio aquoso (ou vice versa), contendo tensoativo associado ou não a um co-tensoativo apropriado gerando um sistema termodinamicamente estável (JORES, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004; FORMARIZ *et al.*, 2005; XIA *et al.*, 2007).

Em condições experimentais a construção de um diagrama de fases serve para obter as regiões de microemulsão e limites de transição entre emulsões, microemulsões e separação de fases (ALLEN *et al.*, 2007). Como ilustrado na figura 8 a produção dos nanopartículas pela técnica de microemulsão consiste em fundir a matriz lipídica e adicionar de tensoativo e/ou co-tensoativo e da água até atingir uma região de microemulsão (MÜLLER, 2004). Em seguida para a precipitação das partículas, a microemulsão é dispersa em água fria sob agitação. De acordo com a literatura a estrutura das gotículas das microemulsões, atingem tamanhos de partículas em escala manométrica não necessitando, desta forma, do uso energia (MEHNERT & MÄDER, 2001).

Figura 8. Representação esquemática do preparo de nanopartículas empregando o método de microemulsão.



Uma vantagem que este método apresenta é a possibilidade de encapsular fármacos lipofílicos e hidrofílicos. Porém apresenta como desvantagem a necessidade de altas concentrações de tensoativo. Pois altas concentrações de tensoativos podem diminuir o potencial zeta dos sistemas devido a redução da espessura da camada difusa (TAN *et al.*, 2010; MÜLLER, *et al.*, 2005; ÜNER, 2006), com isso o sistema pode apresentar baixa

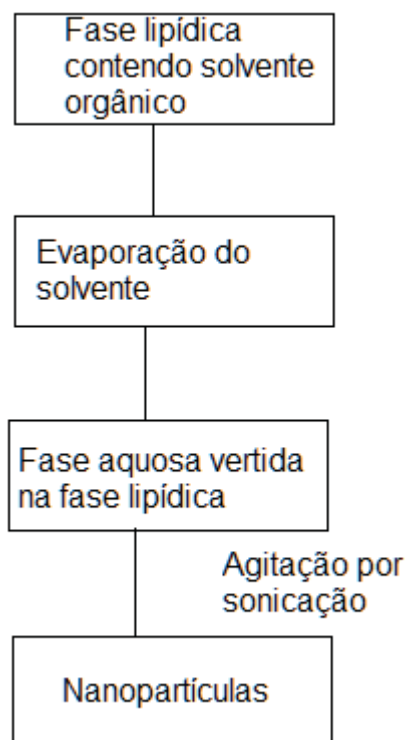
estabilidade. Outra desvantagem é a necessidade de remoção do excesso de água (MÜLLER, *et al.*, 2005; ÜNER, 2006).

✓ Método de sonicação

O método de sonicação gera emulsões através de vibrações mecânicas dirigidas por ultrassom, o ciclo de compressão da sonicação gera bolhas de vapor que aumenta com o tempo, quando essas bolhas atingem um certo tamanho elas se rompem violentamente, gerando energia e liberando radicais de hidroxilas. A turbulência e a alta velocidade fazem com que a fase oleosa seja dispersa na fase aquosa (GUPTA, 2006).

Como representado na figura 9, este método consiste em dissolver quantidade determinada de fase lipídica em um solvente orgânico. O solvente é evaporado utilizando um evaporador rotativo, após a evaporação do solvente, a fase aquosa é vertida na fase lipídica seguida de agitação por sonicação durante tempo determinado (MOURÃO, 2001; LOU *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2009).

Figura 9. Representação esquemática do método de sonicação.

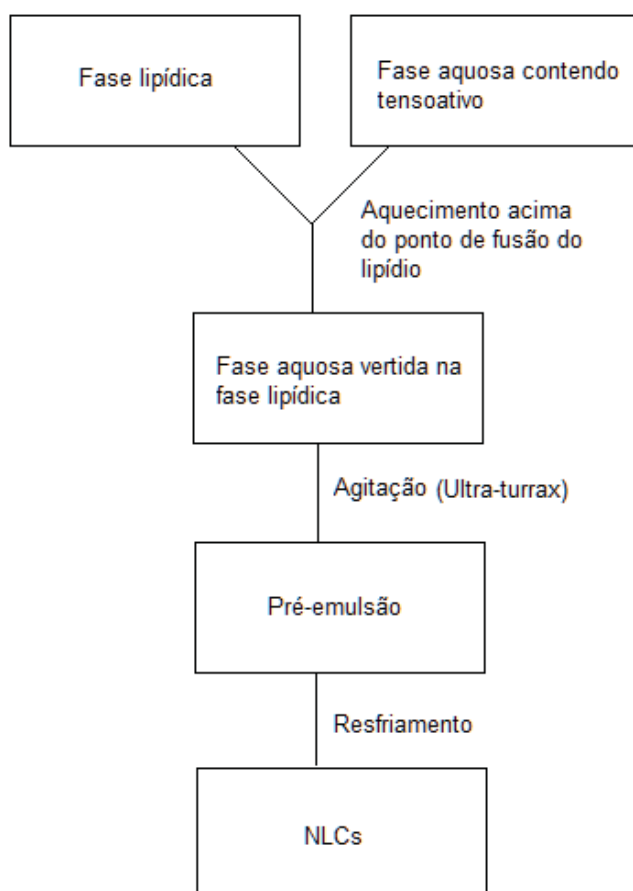


A maior vantagem deste método está relacionado ao fato do equipamento ser comum em todos os laboratórios e a produção é facilmente desenvolvida. Uma desvantagem é que pode ocorrer uma distribuição de partículas grandes, em escala micrométrica e outra desvantagem que é possível ocorrer contaminação do metal durante a sonicação (WISSING *et al.*, 2004).

✓ **Método de alta velocidade de cisalhamento a quente**

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

Figura 10 -Representação esquemática do método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente

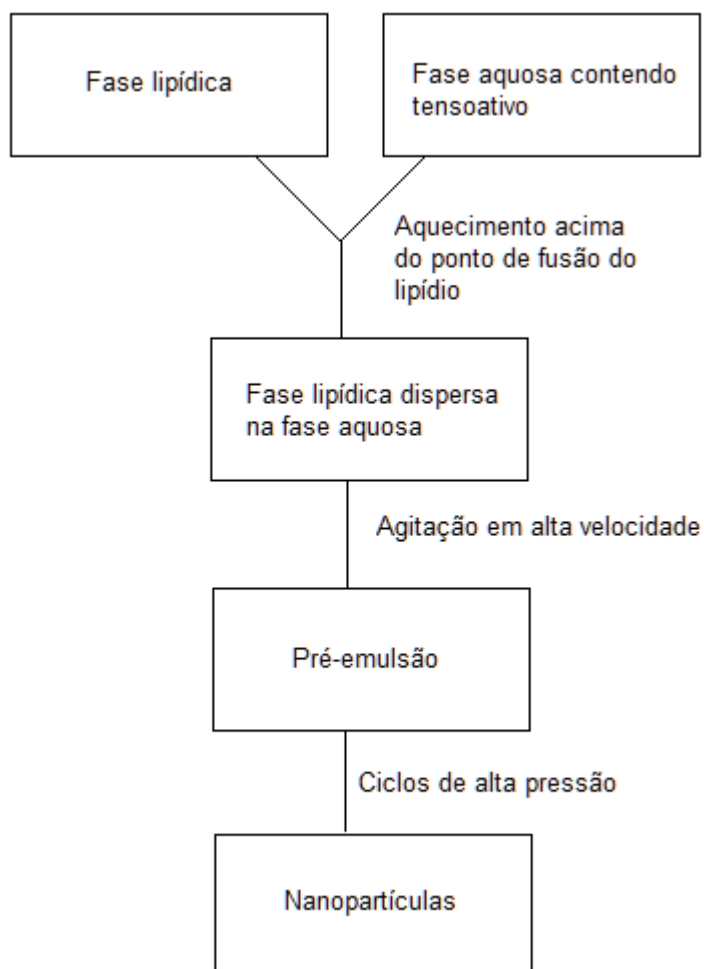


✓ Método de homogeneização e alta pressão

O método de homogeneização e alta pressão a quente foi desenvolvida e patenteada por Müller e Lucks em 1996 (MARCATO, 2009) para alcançar uma distribuição de partículas pequenas com o aumento da estabilidade física da dispersão aquosa (SOUTO & MÜLLER, 2007). É um método adequado para a produção dos NLCs tanto em temperaturas elevadas como temperatura ambiente e o tamanho das partículas é reduzido por cavitação ou turbulência (WISSING *et al.*, 2004).

Este método consiste em aquecer a fase lipídica acima do ponto de fusão do lipídio sólido, a fase aquosa contendo tensoativo ou combinações de tensoativos é aquecida na mesma temperatura, em seguida a fase lipídica é dispersada na solução do tensoativo. A pré-emulsão é formada por agitação em alta velocidade usando Ultra-turrax. As nanopartículas são formadas impulsionando a pré-emulsão através de uma cavidade estreita em ciclos de alta pressão, sendo que na maioria dos casos ciclos de 3 a 5 bars são suficientes (MEHNERT & MÄDER, 2001; WISSING, *et al.*, 2004; SOUTO & MÜLLER, 2007; TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2008). A figura 10 representa esquematicamente o processo de obtenção dos NLCs por este método.

Figura 11. Representação esquemática da metodologia de homogeneização e alta pressão a quente.



Este método apresenta como principal vantagem a facilidade de transposição de escala, o que é um problema para muitas técnicas utilizadas. Outra vantagem está relacionada ao aquecimento, pois a alta temperatura reduz o tamanho da partícula devido a diminuição da viscosidade da fase interna. Porém a alta temperatura pode ser também uma desvantagem, pois pode aumentar a taxa de degradação do fármaco. Outra desvantagem é o risco de coalescência das partículas quando utilizado uma pressão muito alta (MEHNERT & MÄDER, 2001).

Nesse trabalho para a obtenção dos NLCs, foram empregados GMS/AO (lipídio sólido e lipídio líquido), como fase lipídica e associações de tensoativos, como: PC/TW; PC/PLU; TW/PLU, por apresentarem como vantagem o baixo custo e fácil acesso, e serem bem descritos na literatura.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados contendo praziquantel a fim de melhorar as propriedades biofarmacêuticas do fármaco.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Substâncias e Reagentes

Ácido clorídrico, teor 37% (Quimis[®]);
Ácido oléico (Synth[®]);
Água purificada Milli-Q;
Álcool etílico absoluto (Synth[®]);
Fosfatidilcolina de soja (Lipoid[®]);
Hidróxido de sódio (Grupo Quimica[®]);
Monoestearato de Glicerila (Henrifarma[®]);
Poloxamer – 407 (Pluronic- F127) (Sigma[®]);
Polissorbato 60 (Tween 60) (Sigma[®]);
Praziquantel (Henrifarma[®]);

3.1.2 Equipamentos

Aagitador Ultra-Turrax[®] (IKA, mod. TC 25 basic);
Balança analítica (Ohaus - AS200);
Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK);
Espectrofotômetro UV-VIS (Hewlett Packard-Kayak XA);
Liofilizador (Edwards Modulyo[®]);
Sonicador (Sonics Vibra Cell)
Peagômetro (Gehaka[®])
Purificador de água Milli-Q Plus – (Millipore);
Ultra centrífuga (Biofuge Strato).

3.2. Métodos

Preparou-se os NLCs variando o sistema tensoativo para selecionar o mais apropriado para a produção dos mesmos, para tanto utilizou-se combinações de TW/PLU, PC/TW, PC/PLU na proporção de 1:1 tendo o sistema tensoativo a concentração final de 2% na água. A fase oleosa empregada por uma mistura de GMS/AO na proporção de 7:3 respectivamente, tendo como concentração final 10%. Para que fosse possível observar a influência dos tensoativos, na preparação dos NLCs, padronizou-se a temperatura, a concentração do tensoativo e o tempo utilizado em cada etapa, variando apenas as combinações de tensoativos.

As partículas foram preparadas por 2 métodos diferentes, sendo de sonicação e homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente. Os sistemas foram caracterizados por distribuição de tamanho, potencial zeta, índice de polidispersidade e eficiência de encapsulação. Foram avaliados também o transporte intestinal do fármaco empregando o modelo do saco intestinal invertido.

3.2.1 Seleção da proporção de GMS/AO empregadas para preparação dos NLCs

Para a obtenção dos NLCs foi selecionada a fase lipídica contendo GMS (lipídio sólido) e AO (lipídio líquido). Proporções variadas de lipídios líquido e sólidos foram misturadas e aquecidas até a fusão do componente sólido. A tabela 3 mostra proporções testadas de GMS e AO avaliadas e os respectivos valores em massa.

Tabela 2. Proporção dos componentes da fase lipídica (GMS/AO) empregados na produção dos NLCs.

Monoestearato de glicerila (GMS)	Ácido Oléico (AO)	Proporção (GMS/AO)
4,5	0,5	9:1
4,0	1,0	8:2
3,5	1,5	7:3
3,0	2,0	6:4
2,5	2,5	5:5
2,0	3,0	4:6
1,5	3,5	3:7
1,0	4,0	2:8
0,5	4,5	1:9

3.2.2 Determinação da solubilidade do PZQ na fase lipídica

Para avaliar a concentração de fármaco a ser utilizado na preparação das nanopartículas, foi realizado um ensaio de solubilidade do praziquantel na fase lipídica do sistema. O sistema contendo GMS, AO na proporção de 7:3 respectivamente e PZQ foi aquecido à temperatura de 80°C, sem a utilização de agitação. A medida que o PZQ solubilizou, acrescentou-se porções subsequentes de 0,01g do mesmo até precipitação.

3.2.3 Identificação da nomenclatura dos NLCs empregados neste trabalho

Para facilitar a identificação dos NLCs, foram usadas siglas relacionadas com a formulação, contendo ou não PZQ. A tabela 2 contém os dados dos NLCs.

Tabela 3. Nomenclatura dos diferentes NLCs

Nomenclatura	Composição						
	GMS (%)	AO (%)	PC (%)	TW (%)	PLU (%)	PZQ (%)	ÁGUA (%)
NLC_PC/PLU	7	3	1	—	1	—	88
NLC_PC/PLU_PZQ	7	3	1	—	1	0,75	87,25
NLC_TW/PLU	7	3	—	1	1	—	88
NLC_TW/PLU_PZQ	7	3	—	1	1	0,75	87,25
NLC_PC/TW	7	3	1	1	—	—	88
NLC_PC/TW_PZQ	7	3	1	1	—	0,75	87,25

Em que:

(NLC) = Carreadores lipídicos nanoestruturados; (PC) = fosfatidilcolina; (PLU) = pluronic; (TW) = Tween60; (PZQ) = praziquantel.

3.2.4 Desenvolvimento dos NLCs contendo PC/TW empregando o método de sonicação

O GMS, AO e o PC foram dissolvidos em clorofórmio, levados ao rotaevaporador por 40 minutos a fim de evaporar o solvente orgânico, mantendo-se em vácuo à temperatura de 50°C. O TW foi dissolvido na fase aquosa, utilizando à mesma temperatura e então adicionada à fase lipídica com agitação manual. A emulsão formada foi sonicada a 120 W por 40 minutos utilizando banho de gelo. Em seguida na preparação de NLCs contendo PZQ (NLC-PZQ), o fármaco foi dissolvido no solvente orgânico na fase lipídica. As etapas subsequentes do processo de obtenção foram as mesmas empregadas na preparação dos NLCs. A figura 12 ilustra o esquema de preparo dos NLCs utilizando o processo acima mencionado.

Figura 12. Preparo dos NLCs empregando o método de sonicação.



3.2.5 Desenvolvimento dos NLCs empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente

Os NLCs foram preparados utilizando o método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente, em que a fase lipídica contendo GMS/AO foi aquecida a 80°C. A fase aquosa contendo os sistemas tensoativos PLU/TW ou PC/TW ou PC/PLU na mesma temperatura foi vertida na fase oleosa e agitada com o auxílio de um Ultra-Turrax, na velocidade de 11000 rpm por 10 minutos. A solidificação dos NLCs foi obtida dispersando esta emulsão formada em água gelada (temperatura próxima de 0°C) empregando a mesma velocidade de agitação por 1 minuto em banho de gelo, as nanopartículas permaneceram em repouso no banho de gelo por 5 minutos (figura 13). Na preparação de NLCs contendo PZQ (NLC-PZQ), o fármaco foi dissolvido na fase lipídica. As etapas subsequentes do processo de obtenção foram as mesmas empregadas na preparação dos NLCs.

Figura 13. Preparo dos NLCs empregando o método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente. A= GMS/AO_PC ou GMS/AO_PC_PZQ, B= ÁGUA_ TW ou ÁGUA_PLU



3.2.6 Caracterização dos sistemas empregando a técnica de análise de diâmetro médio das partículas e potencial zeta

Espalhamento dinâmico de luz, também conhecida como espectroscopia de correlação de fótons, é uma técnica não invasiva utilizada para caracterizar partículas em suspensão sendo também utilizada para determinar o tamanho médio das partículas (NOBBMANN, *et al.*, 2007). Flutuações na intensidade da luz espalhada por um pequeno volume de dispersão estão diretamente relacionados com o movimento Browniano do soluto (JUNIOR, 2004). Se o tamanho das partículas forem pequenos comparados ao comprimento de onda da luz incidente, o espalhamento pode ser negligenciado até concentrações elevadas de partículas (ELIÇABE *et al.*, 2007).

A polidispersidade alta de uma amostra indica que as partículas no meio não possuem a mesma dimensão, a análise de espectroscopia de correlação de fótons seria facilitada se os sistemas fossem monodispersos, ou seja, todas as partículas em suspensão tivessem exatamente as mesmas dimensões, porém, tal distribuição é rara, ocorrendo em alguns casos quando utilizados polímeros naturais (JUNIOR, 2004).

A diluição do meio é importante, pois em dispersões concentradas as partículas desenvolvem um movimento Browniano mais lento, o que leva ao cálculo do diâmetro da partícula maior do que o real (CHORILLI, 2004).

O potencial zeta resulta das cargas elétricas na superfície da partícula, está relacionada com a estabilidade física do sistema coloidal, podendo ser medido com a amostra diluída em água ou no meio de dispersão original (OBEIDAT *et al.*, 2010). Quando o potencial zeta de um sistema fornece um valor elevado, ou seja, superior a +30mV ou inferior a -30mV, indica que as partículas tendem a repelir umas das outras, o que pode indicar que o sistema será estável, porém se o valor de potencial zeta for baixo ou nulo haverá uma tendência de aproximação das partículas e o sistema pode flocular facilmente (PANDOCHI, 2009).

O diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de todos os NLCs (com e sem PZQ) foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons usando Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK). A

temperatura do sistema foi mantida a 25°C. Para realização dos ensaios, 30 µL de amostra foram diluídas em 970 µL de água Milli'Q.

3.2.7 Validação da metodologia analítica

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida e deve garantir que o método atenda as exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003, ICH, 2005; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010).

A validação foi realizada utilizando a metodologia espectrofotométrica por ultravioleta para o praziquantel foi realizado de acordo com a resolução 899 de 29 de maio de 2003 publicado pela ANVISA (ANVISA, 2003).

- **Obtenção da curva analítica utilizando espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta**

Para obtenção da curva analítica, pesou-se 0,2g de praziquantel, transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL. Transferiram-se alíquotas de solução estoque para um balão volumétrico a fim de obter as concentrações de 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80; 0,90; 1,0 mg/mL de fármaco respectivamente e o volume foi completado com etanol absoluto, essa solução foi então homogeneizada e em seguida a absorbância das amostras foram medidas empregando como comprimento de onda 264nm, em um branco de álcool etílico absoluto. As diluições foram preparadas em triplicata.

- **Linearidade**

A linearidade do método foi determinada através da obtenção da curva analítica de praziquantel em etanol absoluto, descrito no item 4.2.7.1.

- **Precisão**

A precisão foi avaliada por ensaios de repetibilidade, sendo inter e intra dia, realizou-se em três dias diferentes, sendo preparadas e analisadas três

concentrações em cada dia. Para determinar a precisão, a partir da solução estoque de 2mg/mL de PZQ em etanol, preparou-se soluções nas concentrações de 0,2mg, 0,6mg e 1mg o que corresponde as concentrações baixa, média e alta respectivamente da linearidade da curva padrão, os ensaios foram realizados em triplicata.

- **Limite de detecção e limite de quantificação**

O limite de detecção é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinado. Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão (ANVISA, 2003, ICH, 2005, BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010).

Para determinar o limite de detecção e quantificação, preparou-se três soluções em triplicata, próximas ao limite inferior da curva analítica. O limite de detecção foi calculado baseando na equação conforme descrito no ICH que é expresso como:

$$LD = \frac{3,3 \times \alpha}{S} \quad \text{Equação 1}$$

Em que,

α = desvio padrão

S= inclinação da curva de calibração

O limite de quantificação foi calculado baseando-se no desvio padrão e na inclinação da curva analítica, através da equação conforme descrito no ICH (2005).

$$LQ = \frac{10 \times \alpha}{S} \quad \text{Equação 2}$$

Em que,

α = desvio padrão

S= inclinação da curva de calibração

- **Exatidão**

De acordo com a ANVISA a exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA 2003), para a análise quantitativa a exatidão foi determinada pelo teste de recuperação do PZQ em etanol, em que calculou-se a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de fármaco adicionada à amostra. O ensaio foi realizado em três dias consecutivos e em triplicata.

3.2.8 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação corresponde a quantidade de fármaco que foi incorporado pelo sistema (OLIVEIRA, 2005). Para determinar a eficiência de encapsulação, a amostra foi ultra centrifugada na velocidade de 45000 g por 40 minutos à temperatura de 8°C, em seguida separou-se o sobrenadante e este foi diluído em etanol absoluto e quantificado por espectrofotometria no ultravioleta em 264nm. A eficiência de encapsulação foi calculada a partir da concentração de fármaco livre encontrado no sobrenadante.

A eficiência de encapsulação foi determinada utilizando a equação abaixo:

$$EE (\%) = \frac{PZQ \text{ encapsulado}}{PZQ \text{ total}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

PZQ encapsulado = concentração de praziquantel encapsulado

PZQ total = concentração total de praziquantel usado na formulação

3.2.9 Avaliação, *in vitro*, da absorção intestinal do PZQ pelo método do saco intestinal invertido.

A avaliação da absorção intestinal do praziquantel utilizando como modelo a técnica do saco intestinal invertido foi realizada para avaliar o efeito dos NLCs no transporte de PZQ através da membrana intestinal. Ratos machos adultos (210-250g), mantidos em jejum por 8h, foram anestesiados

com tiopental sódico e o intestino delgado (duodeno) foi imediatamente dissecado, lavado com solução tampão TC 199 a 10°C e colocado em meio de cultura para tecido (TC 199) na mesma temperatura e oxigenado (O₂: CO₂ – 95:5). O intestino foi então gentilmente invertido com auxílio de uma haste flexível (~ 2,5mm de diâmetro) com sua extremidade protegida com um fino tecido de seda, uma das extremidades foi fechada utilizando fio de sutura e o segmento intestinal preenchido com TC 199. A outra extremidade do segmento intestinal foi então fechada com auxílio de fios de sutura, de forma que o comprimento final do segmento intestinal fosse de 6 cm. Ao meio de incubação contendo tampão TC 199 foram adicionadas as diferentes formulações contendo PZQ. A incubação foi realizada a 37°C, sob agitação suave do sistema previamente oxigenado. Após o período de 60 min de incubação, as amostras presentes no interior do saco intestinal foram filtradas e a quantidade de PZQ permeado através da membrana foi determinada por CLAE, empregando as mesmas condições reportada por Cinto *et al.*, 2009. Para tanto foi construída uma curva analítica de trabalho de 9 pontos.

Para o presente estudo utilizou-se as mesmas condições cromatográficas estabelecidas por Cinto *et al.*, (2009). Em que a leitura foi realizada por CLAE no comprimento de onda de 215nm. Para a quantificação da absorção as condições cromatográficas foram: fase móvel – Acetonitrila/água (45:55), fase Estacionária: octadecilsílica – C18 (250 x 4,6mm), tamanho de partícula – 5mm (Varian® - Chromsep®), detector: Detector DAD (arranjo de diodos) UV – 215nm, vazão de 1mL/min e o volume de injeção foi de 25µL, e o tempo de corrida de 20 minutos.

- **Análise estatística**

As análises estatísticas (ANOVA) foram realizadas com auxílio do Microsoft Excel e para tanto foi utilizada a análise da variância, considerando estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Seleção da proporção de GMS/AO utilizados como fase lipídica dos NLCs

De acordo com a Farmacopeia Britânica (2002) o GMS tem o ponto de fusão de 54 a 64°C. Observou-se que nas relações 7:3, 6:4, 5:5 a mistura fundiu na temperatura de 50°C, abaixo do ponto de fusão do GMS. Assim, escolheu-se a proporção de 7:3 de GMS e AO respectivamente, pois tal proporção apresenta a maior concentração de lipídio sólido, o que facilita a estruturação dos NLCs. Verificou-se que foi possível solubilizar 16% de PZQ na fase lipídica. A tabela 4 mostra a concentração que foi utilizada em relação a fase lipídica.

Tabela 4. Solubilidade do PZQ na fase lipídica (GMS/AO)

GMS + Ac Oléico 3:7 PZQ			
GMS (g) /AO (g)	PZQ (g)	(%)	Resultado
0,99	0,01	1	Solubilizou
0,98	0,02	2	Solubilizou
0,97	0,03	3	Solubilizou
0,96	0,04	4	Solubilizou
0,95	0,05	5	Solubilizou
0,94	0,06	6	Solubilizou
0,93	0,07	6,5	Solubilizou
0,92	0,08	7,4	Solubilizou
0,91	0,09	8,2	Solubilizou
0,90	0,10	9,1	Solubilizou
0,89	0,11	10	Solubilizou
0,88	0,12	10,7	Solubilizou
0,87	0,13	11,5	Solubilizou
0,86	0,14	12,3	Solubilizou
0,85	0,15	13	Solubilizou
0,84	0,16	14	Solubilizou
0,83	0,17	14,5	Precipitou

4.2. Desenvolvimento dos NLCs contendo PC/TW como sistema tensoativo empregando o método de sonicação e homogeneização de alta velocidade de cisalhamento a quente

Neste trabalho, os NLCs de GMS/AO contendo 2% de PC/TW na proporção de 1:1 como sistema tensoativo foram preparados por dois métodos, o de sonicação e o de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente. No método de sonicação as emulsões são obtidas através de vibrações mecânicas aplicadas por ultrassom (GUPTA, 2006), enquanto que no processo de alta velocidade de cisalhamento gera NLCs pela alta velocidade de agitação (SILVA, *et al.*, 2009).

Os sistemas foram caracterizados quanto ao tamanho das partículas, índice de polidispersidade e potencial zeta. A distribuição do tamanho das partículas é uma característica importante para a avaliação da estabilidade do sistema coloidal, esta estabilidade é assegurada pela escolha adequada de agentes estabilizantes, como tensoativos, polímeros e co-polímeros, pois podem prevenir a agregação das partículas (ABDELWAHED *et al.*, 2006; HAN, *et al.*, 2008).

As figuras 14 e 15 mostram os gráficos da distribuição de tamanho das partículas com e sem PZQ, contendo PC/TW como sistema tensoativos, preparadas empregando o método de sonicação em que é possível observar uma distribuição bimodal das partículas.

Figura 14. Distribuição do diâmetro médio dos NLC_PC/TW empregando o método de sonicação

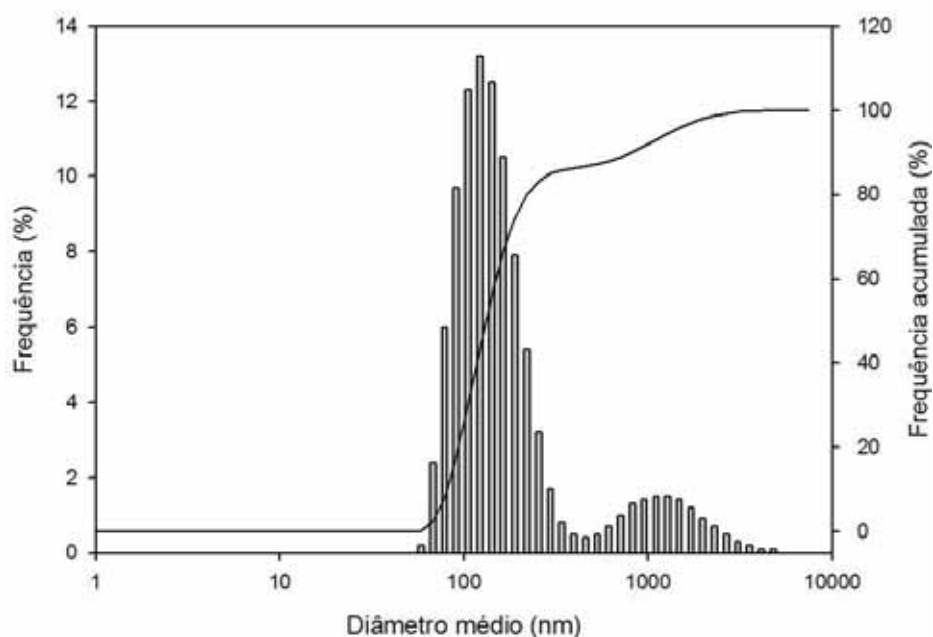
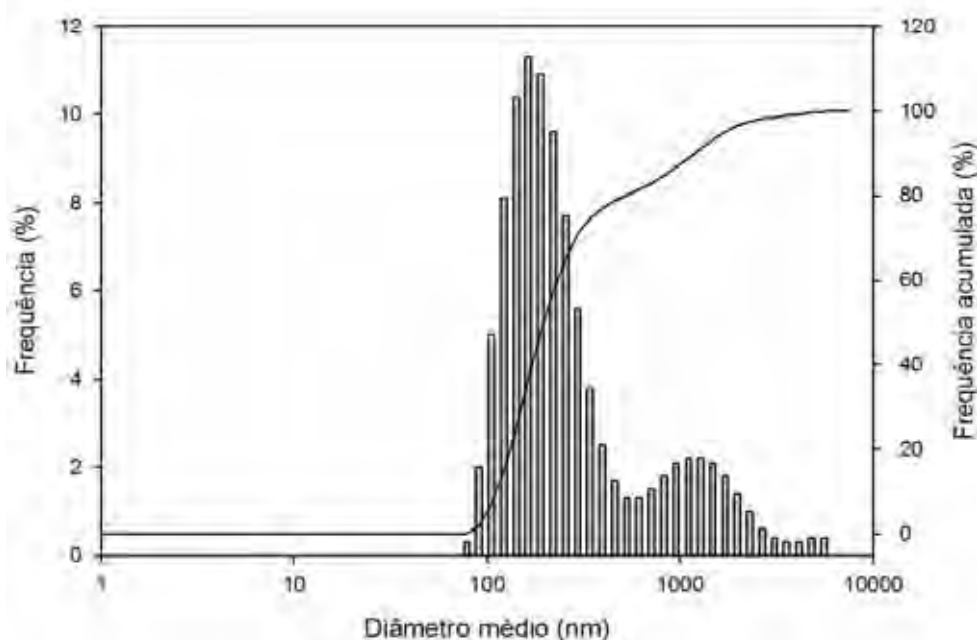


Figura 15. Distribuição de diâmetro médio dos NLC_PC/TW_PZQ empregando o método de sonicação.



As figuras 16 e 17 representam os gráficos dos NLCs contendo ou não PZQ, contendo PC/TW como sistema tensoativo, preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente, em

que é possível observar uma distribuição monomodal para os NLCs sem PZQ e que a incorporação de PZQ modificou a distribuição dos NLCs, provavelmente pelas características do fármaco.

Figura 16. Distribuição de diâmetro médio dos NLC_PC/TW empregando a técnica de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente

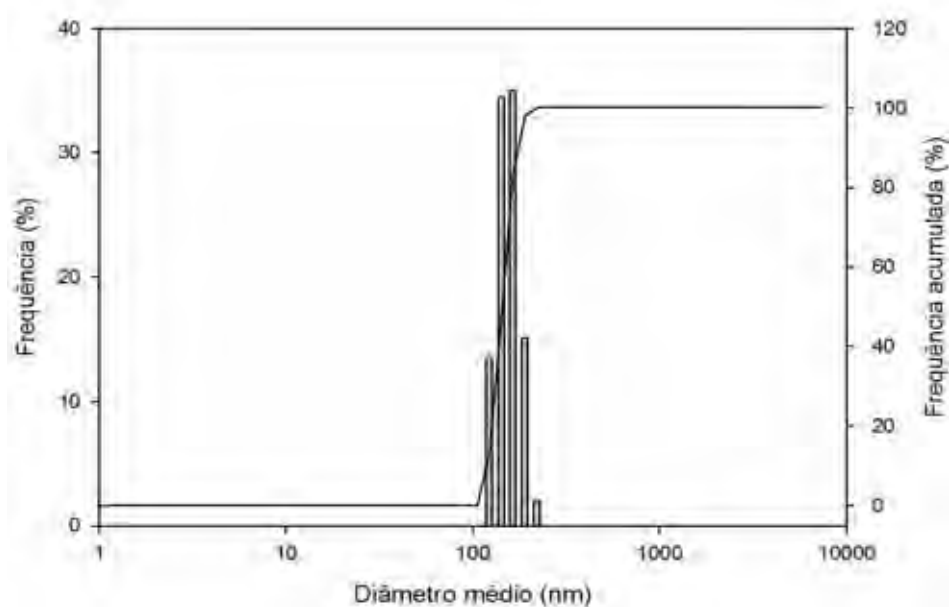
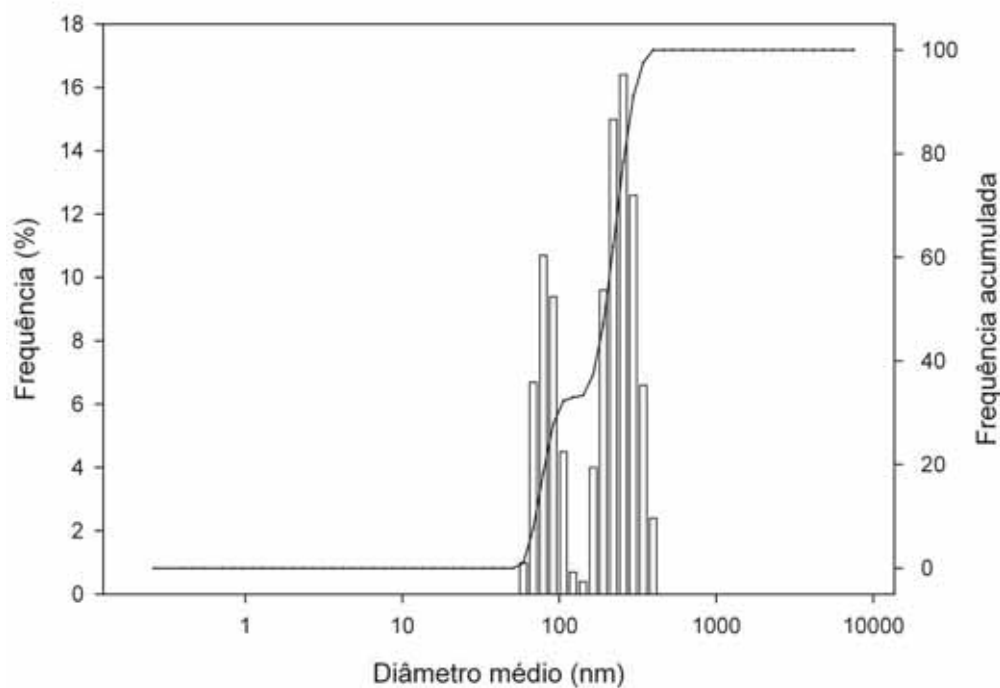


Figura 17. Distribuição de diâmetro dos NLC_PC/TW_PZQ empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente



As figuras 18 e 19 mostram os valores de potencial zeta dos NLCs contendo ou não PZQ empregando PC/TW como sistema tensoativo preparado pelo método de sonicação.

Figura 18. Potencial zeta dos NLC_PC/TW empregando o método de sonicação

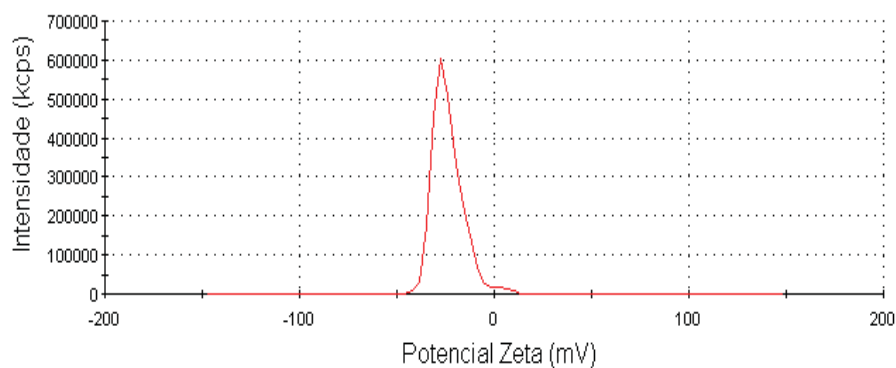
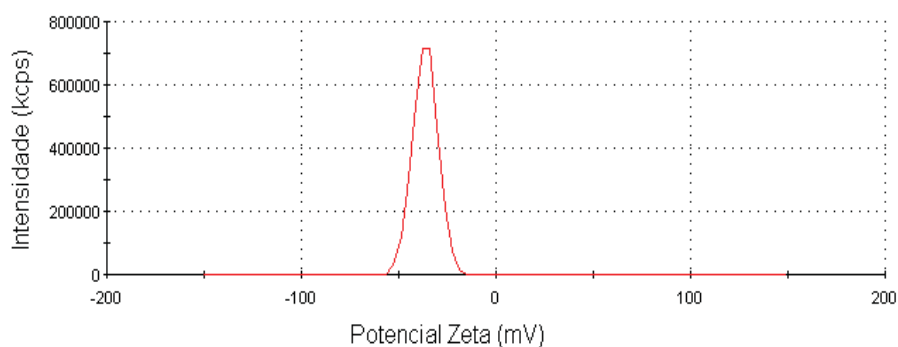


Figura 19 Potencial zeta dos NLC_PC/TW_PZQ empregando o método de sonicação



As figuras 20 e 21 mostram os gráficos obtidos com a análise do potencial zeta para os NLCs contendo ou não PZQ, empregando PC/TW como sistema tensoativo preparado pelo método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.

Figura 20. Potencial zeta dos NLC_PC/TW empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente

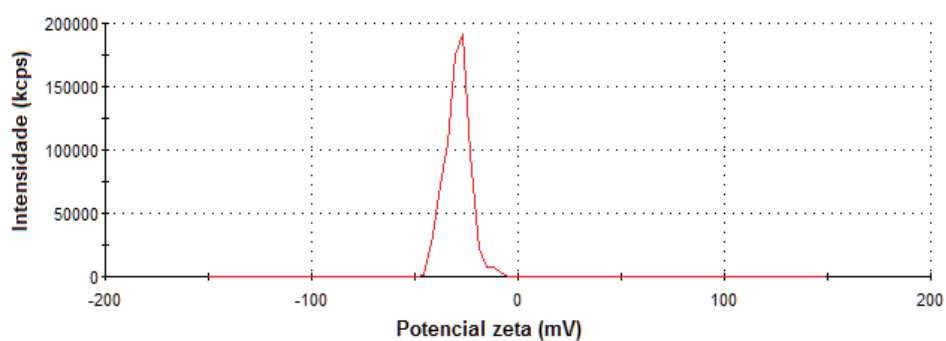
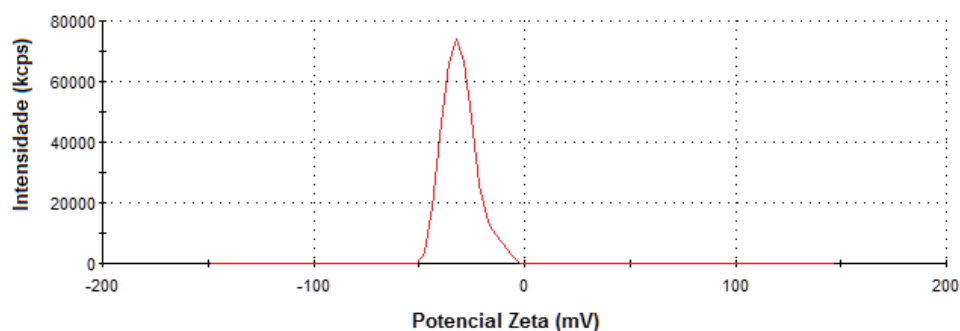


Figura 21. Potencial zeta dos NLC_PC/TW_PZQ empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.



A tabela 5 mostra os resultados obtidos na análise de tamanho médio, índice de polidispersidade e potencial zeta dos NLCs contendo PC/TW como sistema tensoativo empregando o método de sonicação e homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.

Tabela 5. Distribuição de tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta dos NLCs contendo ou não PZQ e PC/TW obtidos pelos métodos de sonicação e homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.

Método	Amostra	Diâmetro médio (nm)	Potencial zeta (mV)	Polidispersidade
Sonicação	NLC_PC/TW	145	-23,9	0,231
	NLC_PC/TW_PZQ	213	-36,4	0,322
Homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente	NLC_PC/TW	343	-29,5	0,600
	NLC_PC/TW_PZQ	377	-30,6	0,394

Os NLCs preparados pelo método de sonicação apresentaram um menor tamanho médio e menor índice de polidispersidade com e sem PZQ. Os sistemas contendo PZQ apresentaram um aumento no potencial zeta. Porém o processo de sonicação apresenta algumas desvantagens, que são superadas pelo método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente, tais como, o tempo necessário para a produção dos NLCs. Sendo que o

processo de sonicação leva aproximadamente duas horas para obter as partículas, e no método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento gasta aproximadamente 45 minutos para a obtenção das partículas. Além disso, há possibilidade de contaminação durante o processo de sonicação e resíduos de solvente orgânico nas dispersões dos NLCs motivos pelos quais o segundo método foi selecionado.

4.3. Desenvolvimento e caracterização dos NLCs empregando o método de homogeneização de alta velocidade de cisalhamento a quente contendo diferentes combinações de sistemas tensoativos

Nesta etapa do presente trabalho o objetivo foi verificar a influência dos tensoativo, a fim de selecionar a combinação mais adequada para o preparo dos NLCs.

Os NLCs contendo PC/PLU e TW/PLU como sistema tensoativo na proporção de 1:1 com e sem PZQ, foram preparados empregando o método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente. Para o preparo dos NLCs, a escolha do tensoativo é importante, pois esta relacionado com a estabilização das partículas (HAN et al.,2008), para obter um sistema estável a presença do tensoativo é necessária (MÜLLER *et al.*, 2006; HAN *et al.*,2007).

Os NLCs foram caracterizados quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta. As figuras 22 e 23 mostram a distribuição do tamanho médio dos NLCs com e sem PZQ contendo PC/PLU como sistema tensoativo. Neste gráfico é possível observar uma distribuição bimodal para ambas formulações. Porém na presença do PZQ a distribuição do tamanho das partículas apresenta um intervalo mais estreito.

Figura 22. Distribuição de diâmetro dos NLC_PC/PLU preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente

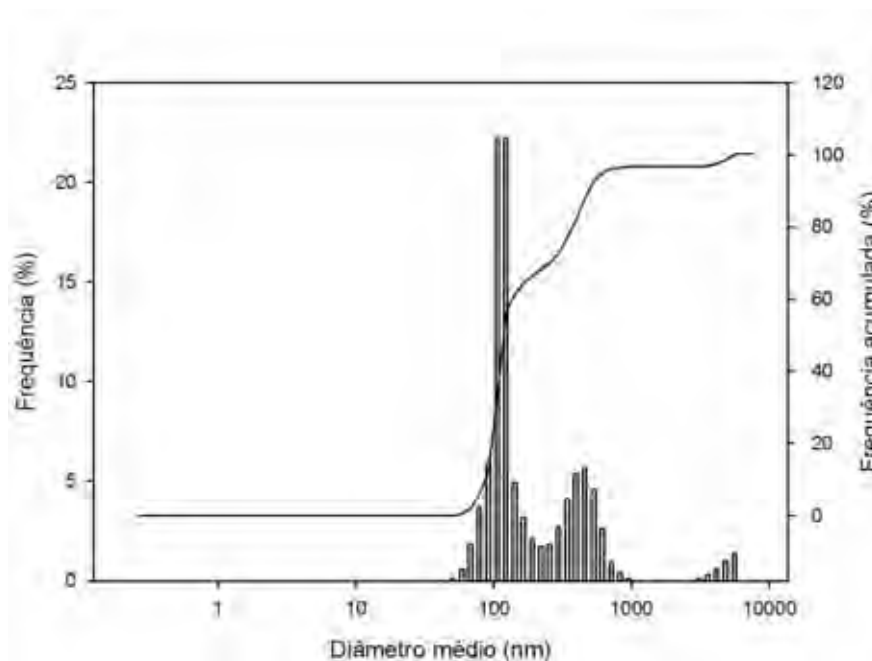
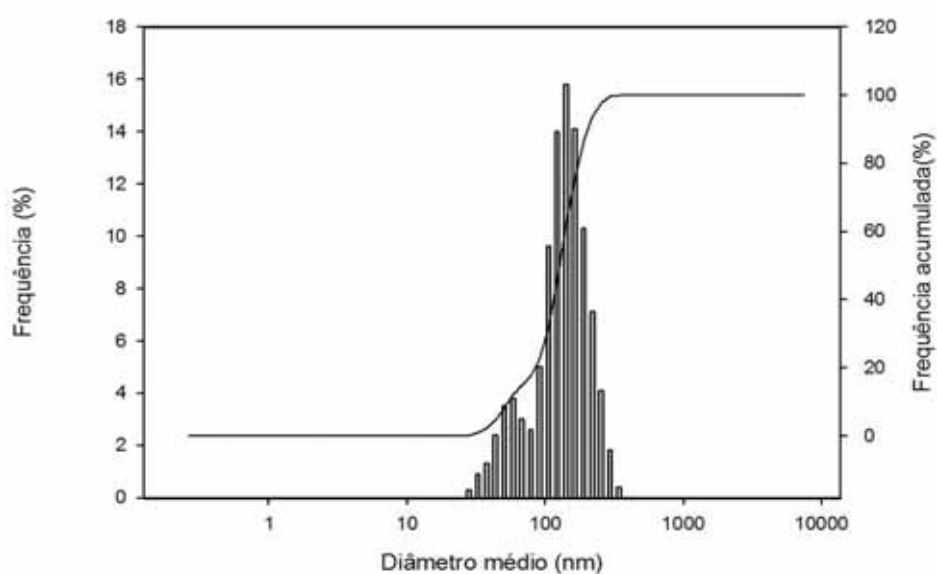


Figura 23. Distribuição de diâmetro dos NLC_PC/PLU_PZQ preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente



As figuras 24 e 25 apresentam a distribuição do tamanho médio dos NLCs contendo TW/PLU como sistema tensoativo, com e sem PZQ respectivamente, em que é possível observar que para os NLCs sem PZQ o

sistema apresenta uma distribuição bimodal das partículas e a adição do PZQ levou a um sistema mais heterogêneo.

Figura 24. Distribuição de diâmetro dos NLC_TW/PLU preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente

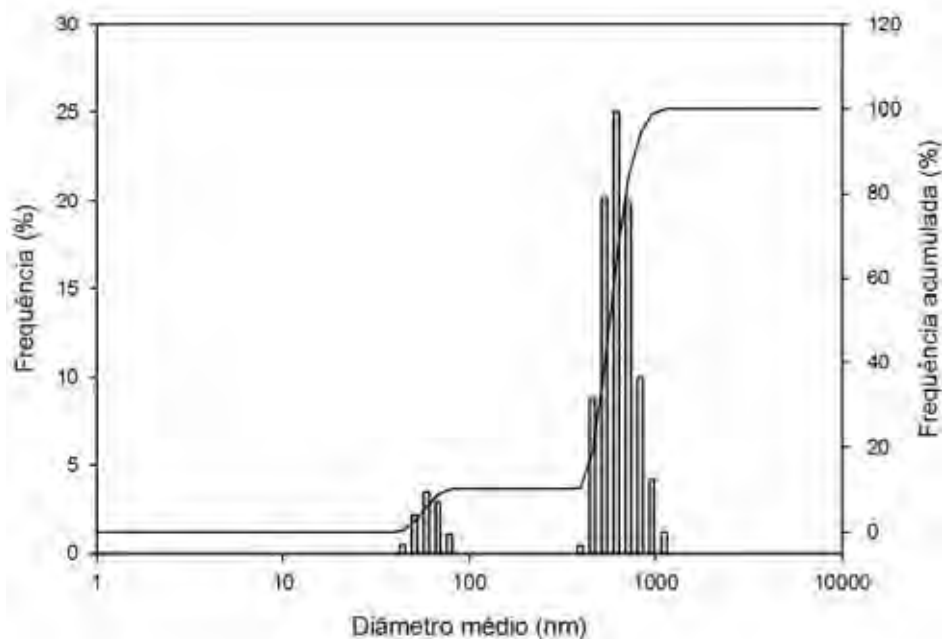
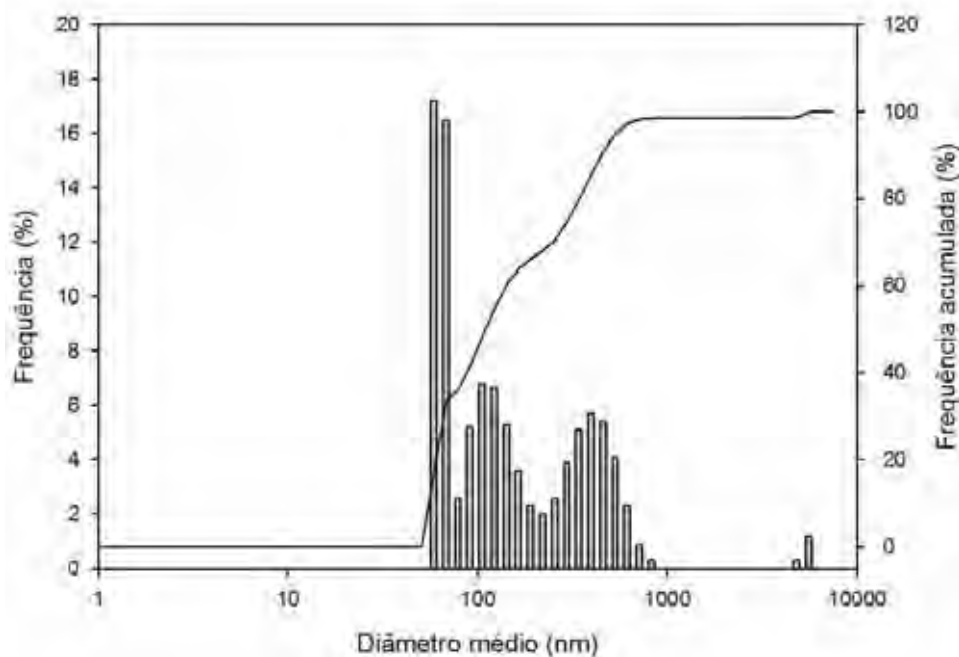


Figura 25. Distribuição de diâmetro dos NLC_TW/PLU_PZQ preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente



As figuras 26 e 27 apresentam os gráficos de potencial zeta para os NLCs contendo PC/PLU como sistema tensoativo, empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.

Figura 26. Potencial zeta dos NLC_PC/PLU preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente

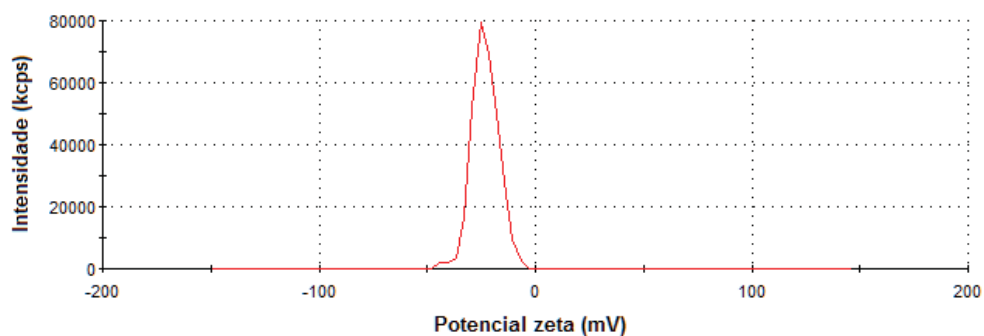
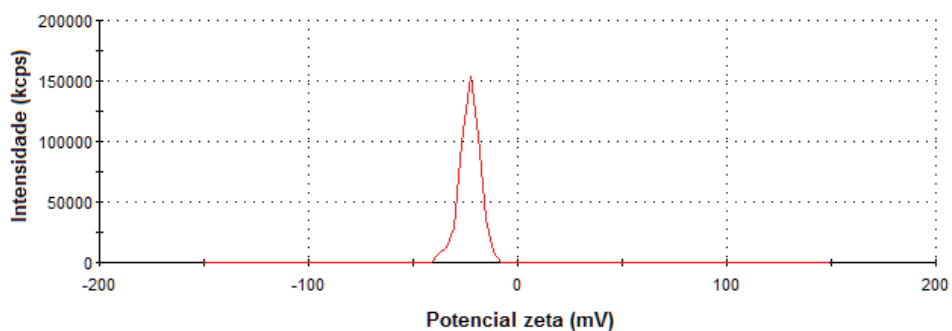


Figura 27. Potencial zeta dos NLC_PC/PLU_PZQ preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente



As figuras 28 e 29 apresentam os gráficos de potencial zeta para os NLCs contendo TW/PLU como sistema tensoativo, contendo ou não PZQ, empregando o método de homogeneização e alta velocidade a quente.

Figura 28. Potencial zeta dos NLC_TW/PLU preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente

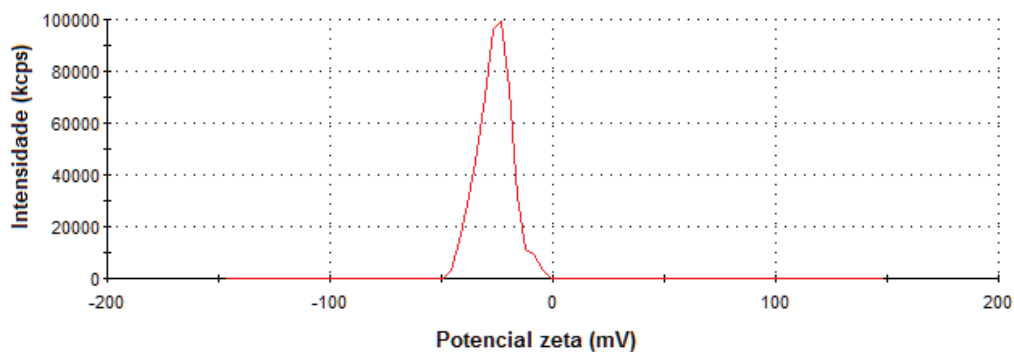
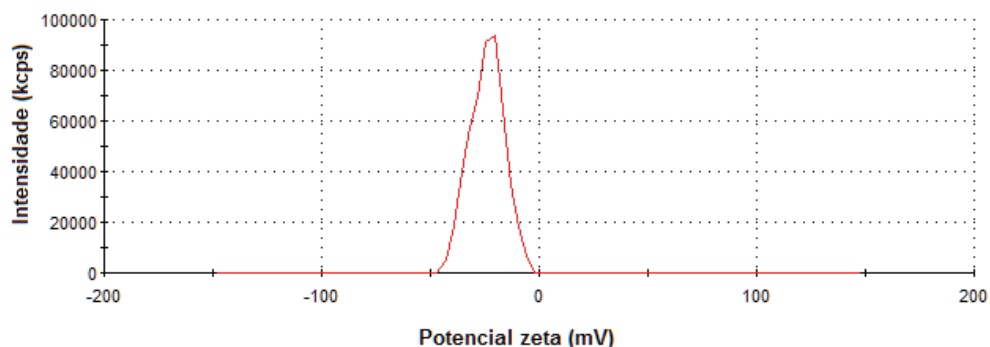


Figura 29. Potencial zeta dos NLC_TW/PLU_PZQ preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente



A tabela 6 apresenta uma comparação dos resultados obtidos pela análise de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta dos NLCs contendo PC/PLU, PC/TW e TW/PLU como sistema tensoativo empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.

Tabela 6. Comparação da distribuição de tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta dos NLCs contendo ou não PZQ empregando PC/PLU, PC/TW e TW/PLU, como sistemas tensoativos, empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente

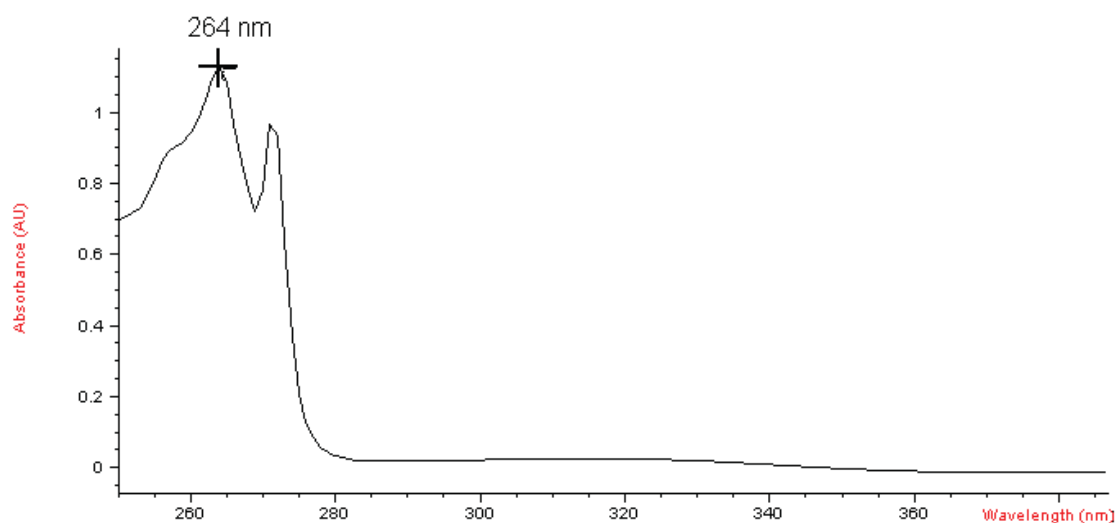
Método	Amostra	Diâmetro médio (nm)	Potencial zeta (mV)	Polidispersidade
Homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente	NLC_PC/PLU	414	-23,2	0,711
	NLC_PC/PLU_PZQ	281	-22,9	0,391
	NLC_PC/TW	343	-29,5	0,600
	NLC_PC/TW_PZQ	377	-30,6	0,394
	NLC_TW/PLU	875	-26,0	0,604
	NLC_TW/PLU_PZQ	261	-24,1	0,596

Como apresentado na tabela 6, para as amostras contendo PLU, verifica-se que o diâmetro médio das partículas diminui com a incorporação de PZQ, sendo a redução maior para as amostras com TW. Para estas amostras, os valores de potencial zeta sofre um pequeno aumento quando o PZQ foi incorporado. Nas amostras sem PLU, NLC_PC/TW verifica-se um pequeno aumento no diâmetro médio das partículas e redução no potencial zeta.

4.4. Validação da metodologia analítica para determinação de PZQ por espectrometria ultravioleta

A figura 30 apresenta o espectro de absorção máxima para o praziquantel em etanol absoluto foi de 264 nm. A figura 30 mostra o espectro de absorção no qual observa-se o pico de absorção máxima para o praziquantel.

Figura 30. Espectro de absorção do PZQ em etanol na região do UV



- **Curva analítica**

Para a quantificação do praziquantel, a análise foi realizada a partir da solução de etanol absoluto, e as medidas de absorção de luz no ultravioleta foram realizadas em 264nm.

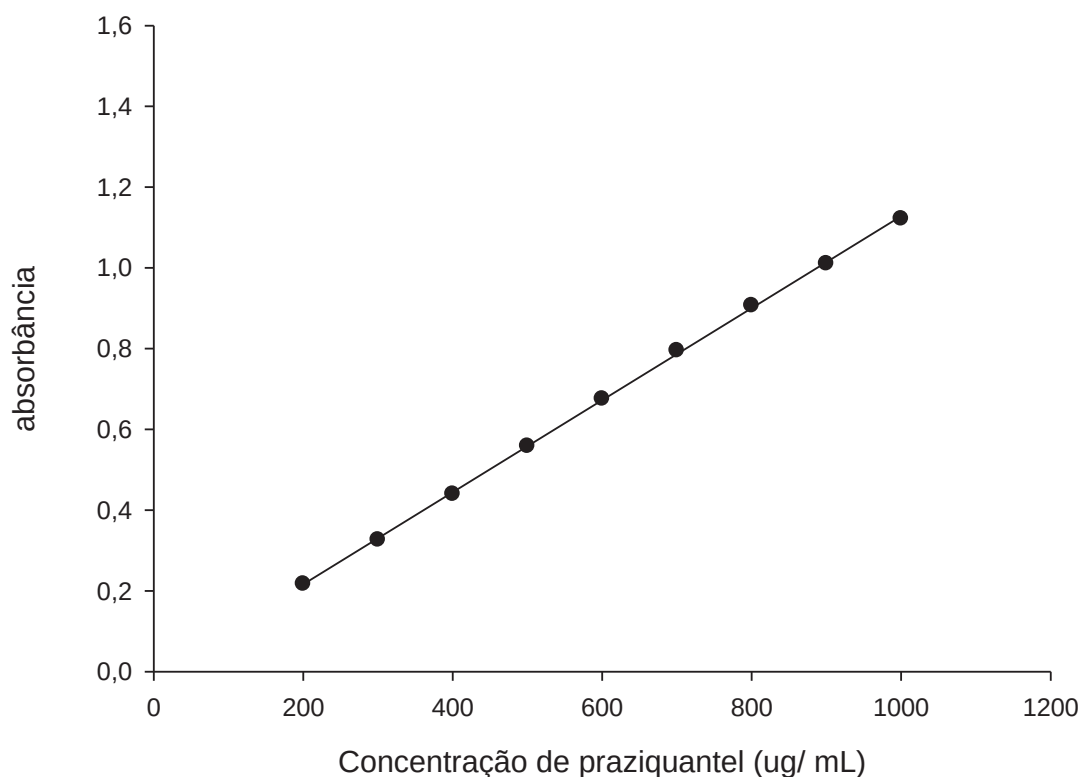
A tabela 7 mostra os valores da curva analítica padrão em solução de etanol contendo praziquantel, sendo o ensaio realizado em triplicata, contendo três réplicas para solução estoque.

A curva analítica padrão foi obtida pela média de três curvas e realizada em triplicata de diluições para cada curva. De acordo com a ANVISA (2003) o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R) deve ser igual 0,99 (ANVISA, 2003). O resultado da regressão linear obtido para a curva analítica confere com o exigido pela resolução da ANVISA.

- **Linearidade**

A linearidade do método de quantificação do PZQ foi determinada através da regressão linear da curva analítica pela equação dos mínimos quadrados onde, $y = 0,0011x - 0,0118$ e o coeficiente de correlação foi $R^2 = 0,9997$.

Figura 31. Curva analítica do PZQ em etanol, no comprimento de onda de 264nm



- **Precisão**

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003; BRITISH PHARMACOPEIA, 2010; ICH, 2005).

Para verificar a precisão, realizou-se ensaios de repetibilidade, (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-corrida), utilizando três níveis de concentração, sendo, a baixa (0,20mg/mL), média (0,60mg/mL) e alta (1,0mg/mL), realizadas em triplicata e com três replicas para cada concentração. Os resultados encontram-se nas tabelas 8 e 9.

Tabela 7. Precisão intra-corrida

Concentração de PZQ	Absorbância (264nm)			Média	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
	N1	N2	N3			
200µg/mL	0,2212	0,2268	0,2223	0,2234	0,0030	1,3448
600µg/mL	0,6840	0,6851	0,6891	0,6861	0,0027	0,3920
1000µg/mL	1,1455	1,1380	1,1545	1,1460	0,0083	0,7209

Tabela 8. Precisão inter-corrida

	Concentração de PZQ	Absorbância (264nm)			Média	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
		N1	N2	N3			
1º dia	200µg/mL	0,2317	0,2318	0,2338	0,2324	0,0012	0,5193
2º dia		0,2046	0,2043	0,2039	0,2043	0,0003	0,1494
3º dia		0,2313	0,2317	0,2309	0,2313	0,0004	0,1816
1º dia	600µg/mL	0,6972	0,7096	0,6995	0,7021	0,0066	0,9388
2º dia		0,6666	0,6648	0,6617	0,6643	0,0025	0,3739
3º dia		0,6862	0,6880	0,6883	0,6875	0,0011	0,1633
1º dia	1000µg/mL	1,1790	1,1755	1,1807	1,1784	0,0027	0,2250
2º dia		1,1099	1,1139	1,1171	1,1136	0,0036	0,3239
3º dia		1,1382	1,1376	1,1317	1,1358	0,0036	0,3163

Os dados apresentados nas tabelas 8 e 9 mostram que o método é preciso para a quantificação do PZQ. Sendo que os coeficientes de variação apresentaram valores inferiores a 5 % conforme o que exige a Resolução da ANVISA (ANVISA, 2003).

- **Limite de detecção e limite de quantificação**

O limite de detecção é a menor quantidade do analito que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, enquanto o limite de

quantificação é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com exatidão e precisão (ANVISA, 2003; BRITISH PHARMACOPEIA, 2010; ICH, 2005). A tabela 10 apresenta os valores obtidos para o limite de detecção e quantificação.

Tabela 9. Limite de detecção e limite de quantificação do PZQ.

Concentração	Inclinação da curva (a)	Intercepto (b)	Desvio Padrão	Limite de detecção (µg/mL)	Limite de quantificação (µg/mL)
150 µg/mL	0,00113	-0,01283	0,00042	1,212264	3,67353
200 µg/mL					
250 µg/mL					

4.5. Determinação da eficiência de encapsulação

A tabela 11 apresenta os dados obtidos para o teor de incorporação e eficiência de encapsulação dos NLCs.

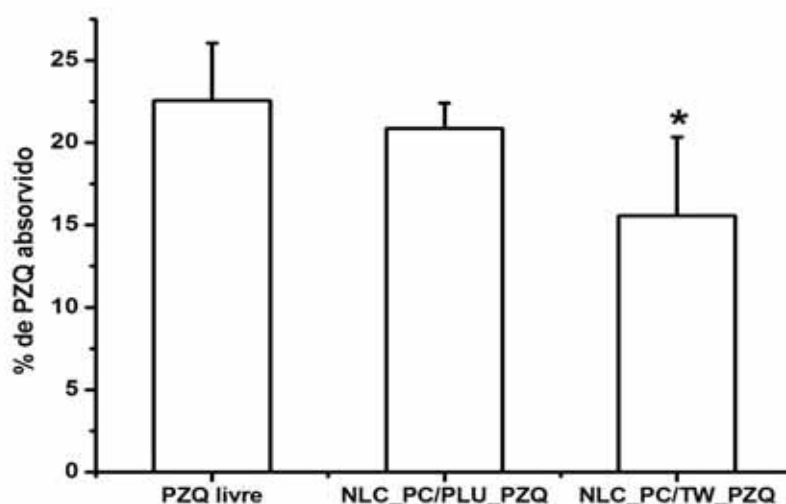
Tabela 10. Determinação da eficiência de encapsulação

Amostra	Concentração teórica (µg)	Concentração fármaco determinado (µg)	Eficiência de encapsulação (%)
NLC_PC/PLU_PZQ	6250	1943,691	83,0%
NLC_PC/TW_PZQ	6250	2040,0	88,0%

4.6. Avaliação da absorção intestinal *in vitro* utilizando o saco intestinal invertido

A figura 32 apresenta a porcentagem de PZQ absorvido pelo segmento intestinal. Os resultados mostram que as quantidades de PZQ absorvida a partir a amostra contendo PZQ disperso no tampão TC199 e o que foi incorporado nos NLC_PC/PLU_PZQ foram semelhantes, porém o PZQ incorporado nos NLC_PC/TW_PZQ apresentaram uma menor taxa de absorção. Existe diferença estatisticamente significativa entre o PZQ disperso em meio tampão e o NLC_PC/TW_PZQ.

Figura 32. Porcentagem de PZQ absorvido através de segmento do saco intestinal invertido.



5. DISCUSSÃO

O PZQ é o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose. Apesar de muito utilizado o PZQ apresenta algumas características que limitam seu efeito, como baixa solubilidade em água e consequentemente a biodisponibilidade baixa ou errática.

Sistemas contendo carreadores lipídicos têm sido muito utilizados com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade de fármacos e reduzir a variabilidade farmacocinética de fármacos lipofílicos. Mourão *et al.*, 2005 mostraram que a incorporação do PRZ em lipossomas de PC melhorou sua solubilidade em sistemas aquosos sem, contudo, alterar sua eficácia *in vitro*. Em estudos *in vivo*, estes sistemas foram mais efetivos que o fármaco disperso em meio aquoso, obtendo-se redução significativa do número de ovos e vermes de *S. mansoni*, linhagem LE e BH, em camundongos (CINTO, 2005; MOURÃO et al 2005, SOUZA, 2008).

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) foram desenvolvidas no início de 1990 como um sistema carreador alternativo combinando as vantagens das nanopartículas poliméricas (matriz sólida para liberação controlada) e dos lipossomas e emulsões O/A, mas evitando algumas das suas desvantagens em relação à estabilidade e possibilidade de escalonamento Yang et. al., 2009 reportaram que a biodisponibilidade oral de praziquantel incorporado em nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) aumentou significativamente em comparação com PZQ na forma comprimidos. Apesar destas vantagens há algumas limitações no uso das SLNs tais como limitação na capacidade de encapsulamento do fármaco, expulsão do fármaco durante armazenamento, devido a transformações polimórficas e alta quantidade de água nas dispersões SLNs que podem limitar sua utilização. Estes problemas são devido à grande presença dos lipídios sólidos, que aumenta o grau de organização da matriz lipídica em SLNs. Assim, os NLCs foram desenvolvidos como uma nova geração de nanopartículas lipídicas. Os NLCs são considerados a geração mais inteligente de sistemas que estão sendo muito explorados como sistema de carreadores de fármacos lipofílicos, além do mais, existe vários fármacos que são mais solúveis em lipídios líquidos do que lipídios sólidos (CHEN et al.

2010; MÜLLER et al. 2004), sendo assim, os NLCs apresentam uma maior capacidade de encapsulamento e a expulsão do fármaco durante o tempo de armazenamento é também minimizado (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar os NLCs contendo PZQ empregando GMS e AO, como fase lipídica, TW, PLU, PC, em associações, como sistemas tensoativos. Inicialmente selecionamos a proporção de GMS e AO a ser utilizada para o desenvolvimento do sistema. Empregando-se GMS e AO nas proporções de 7:3; 6:4; 5:5, respectivamente, observou-se que a mistura fundiu numa temperatura abaixo do ponto de fusão do GMS. A proporção 7:3 foi selecionada por possuir maior concentração de lipídio sólido, o que facilita a estruturação dos NLCs. A concentração máxima de PZQ incorporada neste sistema foi de 16% em relação à fase lipídica.

NLCs contendo TW/PC como sistema tensoativo contendo ou não PZQ foram preparados utilizando as mesmas concentrações dos componentes da formulação, variando apenas os métodos de preparação empregados. Para verificar a influência do método de preparo nas propriedades dos NLCs foram avaliados o tamanho médio índice de polidispersidade e potencial zeta. Os NLCs sem PZQ, produzidos pelo método de sonicação apresentaram uma população bimodal e índice de polidispersidade baixo. A adição do PZQ levou a um aumento do diâmetro médio, e do índice de polidispersidade, possivelmente devido as propriedades do PZQ.

Para os NLCs produzidos pelo método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente, o sistema sem o PZQ apresentou uma distribuição monomodal das partículas. A adição do PZQ levou a uma distribuição bimodal do sistema e uma redução no índice de polidispersidade. Quando comparado com o método anterior, o tamanho médio foi maior (Tabela 5).

Figura 33. Representação do diâmetro médio para os NLCs contendo PC/TW, PC/PLU, TW/PLU preparados empregando os métodos de sonicação e homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.

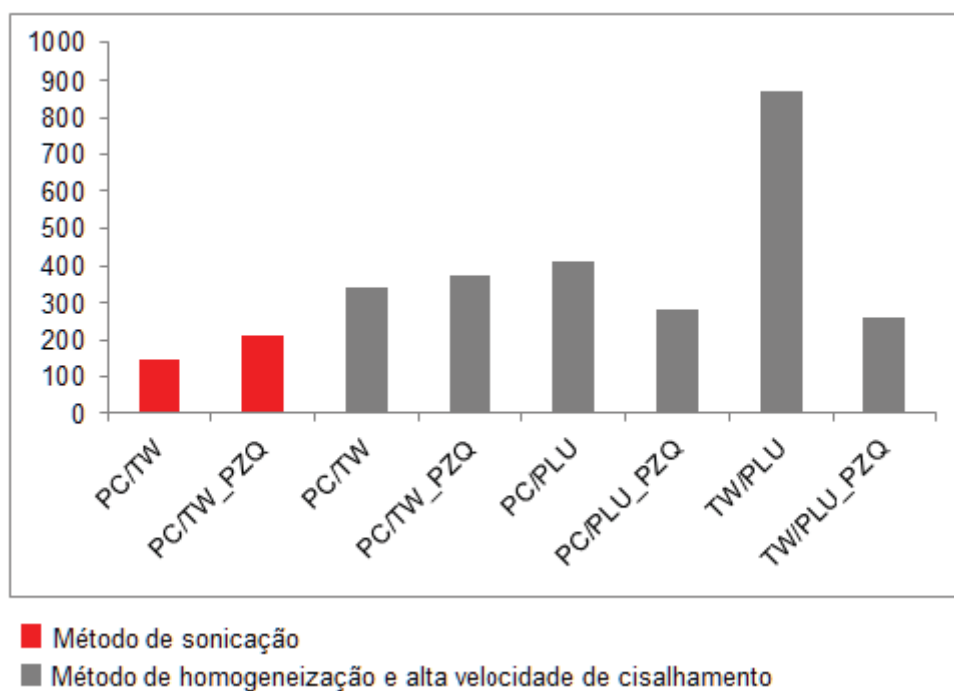
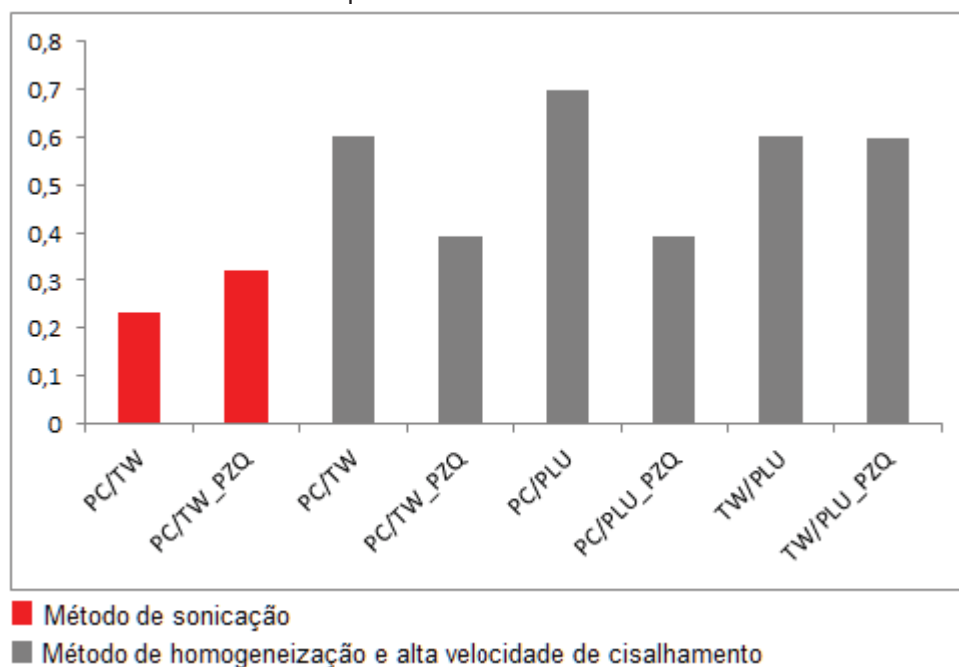


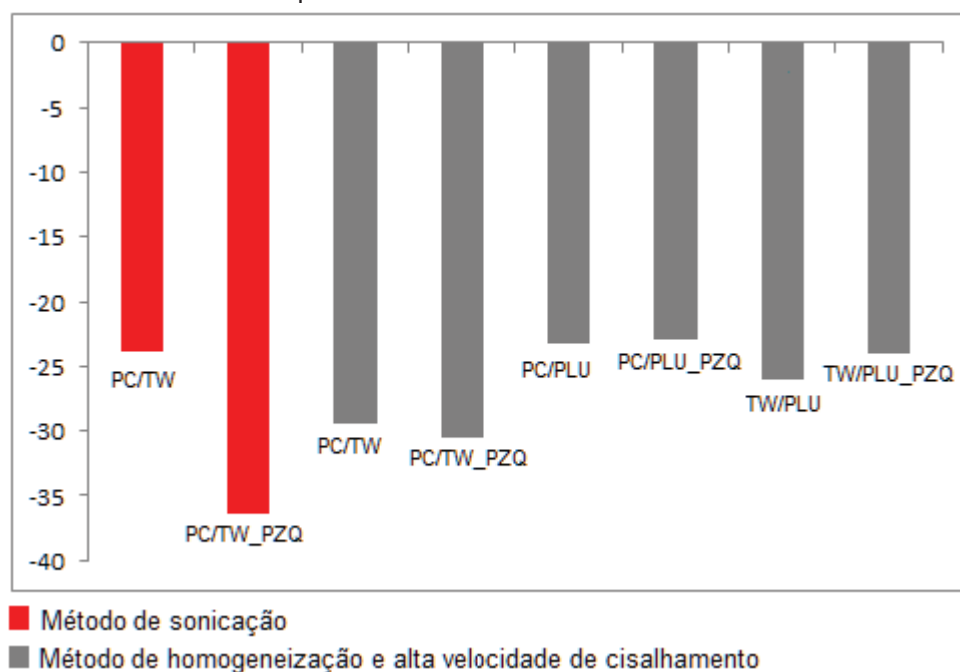
Figura 34. Representação do índice de polidispersidade para os NLCs contendo PC/TW, PC/PLU, TW/PLU preparados empregando os métodos de sonicação e homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.



As partículas preparadas por ambos os métodos empregados apresentaram um diâmetro médio inferior TW/PLU e valores de potencial zeta

entre -22,9 à -30,6 mV (Figura 35) o que indica uma boa estabilidade do sistema. Os valores de potencial zeta estão próximos dos valores obtidos por Chen *et al.*, 2010 que analisou o efeito dos emulsificantes para os NLCs contendo lovastatina, variando as proporções de sistema tensoativo e fase lipídica. Teeranachaideekul *et al.*, (2007) obtiveram partículas com tamanho médio inferior a 450nm quando empregado o método de homogeneização e alta pressão a quente para todos os sistemas, exceto para TW/PLU em que o tamanho médio foi 875nm.

Figura 35. Representação do potencial zeta para os NLCs contendo PC/TW, PC/PLU, TW/PLU preparados empregando os métodos de sonicação e homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente.



O método de sonicação apresenta algumas desvantagens como o longo tempo necessário para a produção dos NLCs, o risco de contaminação por metal durante a sonicação e de resíduos de solvente orgânico na dispersão dos NLCs, tais desvantagens são superadas pelo método de homogeneização de alta velocidade a quente. Outra vantagem apresentada por este método é a possibilidade de produção em grande escala (WISSING *et al.*, 2004; MÜLLER, 2005), motivo que nos levou a optar pelo método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento a quente para a continuidade do trabalho.

Com objetivo de avaliar a influencia de tensoativo, preparou-se os NLCs com diferentes sistemas tensoativos, sendo eles: PC/PLU; PC/TW; TW/PLU na

proporção 1:1 e analisou-se a influencia sobre o diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta. Estes sistemas foram preparados utilizando as mesmas concentrações e condições de obtenção, tais como: velocidade de agitação, tempo de agitação e tempo de repouso em banho de gelo.

Foi observado que a incorporação do PZQ nos NLCs contendo PLU levou uma redução no diâmetro médio das partículas e uma pequeno aumento no potencial zeta. Quando comparado com NLC_PC/PLU_PZQ a redução do diâmetro foi bem maior para os NLC_TW/PLU_PZQ, enquanto que o índice de polidispersidade não variou. Provavelmente a presença do PC modificou a região lipofílica e influenciou na organização dos NLCs. Este sistema (NLC_TW/PLU_PZQ) apresentou-se mais heterogêneo em relação a distribuição de diâmetro médio, provavelmente pelo sistema tensoativo apresentar propriedades mais hidrofílicas que os demais NLCs, motivo no qual nos levou a descartar esta formulação para a sequência do trabalho.

Para os NLCs contendo PC/TW como sistema tensoativo, a adição do PZQ levou a um aumento no tamanho médio, e uma redução no índice de polidispersidade, estes resultados condizem com os descritos por Chen *et al.*, (2010). Houve uma redução no potencial zeta indicando uma boa estabilidade do sistema, pois de acordo com a teoria de DLVO (1983), as forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais dos NLCs. Assim para a continuação do trabalho foram selecionados NLC_PC/PLU e NLC_PC/TW contendo ou não PZQ.

Foi verificado o teor de incorporação e eficiência de encapsulação, sendo o teor de incorporação a quantidade de fármaco incorporado no sistema e a eficiência de encapsulação a porcentagem que este representa na partícula.

Os resultados para ambos NLCs analisados estão próximos aos descritos por Chen *et al.*, (2010) e foram satisfatórios, pois mostram uma alta eficiência de encapsulação na matriz dos NLCs, 83% para os NLC_PC/PLU e 88% para os NLC_PC/TW. A maior eficiência de encapsulação apresentada pelos NLCs contendo o sistema tensoativo PC/TW pode estar relacionado com o maior tamanho das partículas, enquanto a eficiência de encapsulação dos NLC_PC/PLU pode ter sido favorecida pela interação do PZQ com o sistema.

Outro parâmetro estudado foi a influencia dos diferentes tensoativos na absorção intestinal empregando o modelo do saco intestinal invertido. Os resultados mostraram que os NLCs apresentaram quantidades de PZQ absorvidas semelhantes ou inferior a amostra de PZQ disperso no tampão, sendo que para NLC_PC/TW_PZQ houve diferença estatisticamente significativa. Provavelmente pode ter ocorrido uma interação entre as partículas e a membrana intestinal. Resultados semelhantes foram reportados por Cinto, 2005 e Souza, 2008. Nestes estudos os autores sugerem que a presença do PC reduziu a quantidade de PZQ absorvido e esta foi proporcional à concentração deste lipídio. Por outro lado, a diferença entre as quantidades de PZQ absorvidas entre os diferentes NLCs indicam que a presença do TW forma uma matriz mais rígida o que pode prolongar a liberação do fármaco. Outra possibilidade está relacionada com o fato do fármaco estar mais aprisionado nas partículas do NLC_PC/TW_PZQ, devido a maior eficiência de encapsulação, sendo absorvido mais lentamente quando comparado com NLC_PC/PLU_PZQ e PZQ livre.

6. CONCLUSÃO

- Os métodos avaliados para a produção dos NLCs mostraram-se eficientes pois permitiram a obtenção de nanopartículas, porém o método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente mostrou ser mais adequado para a preparação dos carreadores devido as vantagens apresentadas pelo método. O método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento mostrou-se vantajoso pelo tempo gasto (aproximadamente 45 minutos) para a obtenção dos NLCs e apresenta resultados satisfatórios dos NLCs com um diâmetro médio em escala nanométrica e um potencial zet indicando que o sistema pode apresentar uma boa estabilidade.
- Os NLCs apresentaram uma eficiência de encapsulação de 88% e de 83% para NLC_PC/PLU_PZQ e NLC_PC/TW_PZQ respectivamente, o que indica grande parcela de PZQ no interior dos NLCs.
- A absorção intestinal do PZQ livre ou encapsulado nos NLCs, nos NLC_PC/PLU_PZQ apresentaram taxas de absorção semelhantes, o que não ocorreu com os NLC_PC/TW_PZQ. Isto pode ter ocorrido devido à interação entre o PC e o TW o que pode prolongar a liberação do PZQ.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os nanocarreadores lipídicos sólidos têm sido empregados para aumentar a biodisponibilidade e reduzir a variabilidade farmacocinética de fármacos. Estes sistemas podem contribuir, também, para entender os mecanismos do transporte intestinal de fármacos. Assim, como perspectivas futuras deste trabalho, além de desenvolver sistemas lipídicos contendo praziquantel, será analisada a influência da estruturação e composição destes sistemas lipídicos no transporte, no mecanismo de interação com a membrana intestinal e na atividade esquistossomicida deste fármaco, a fim de avaliar o potencial destes sistemas como alternativa terapêutica para administração do PZQ.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 58, p. 1688-1713, 2006.
- ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science.**, v. 14 p. 3-15, 2009.
- ALLEN, J.; LOYD, V. POPOVICH, N. G.; ANSEL, HOWARD, A. C. Formas Farmacêuticas e Sistema de Liberação de Fármacos. Arthemed. Porto Alegre. 2007.
- BILLANY, M. Soluções. In: AUTON, M. E. (Eds). Delineamento de formas farmacêuticas. Porto Alegre: Artemed, 2005, v. 2, p. 317-340.
- BONLOKKE, L.; HOVGGAARD, L.; KRISTENSEN, H.G.; KNUTSON, L.; LENNERNAS, H. Direct estimation of the in vivo dissolution of spironolactone, in two article size ranges, using the single-pass perfusion technique (Loc-I-Gut[®]) in humans, Eur. J. Pharm. Sci. v. 12 p. 239-250 (2001).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- BRITISH PHARMACOPOEIA – London: The Stationery Office, 2002.
- BRITISH PHARMACOPOEIA – London: The Stationery Office, 2010.
- BROGARD, M.; TROEDSSON, E.; THURESSON, K.; LJUSBERG-WAHREN, H. A new standardized lipolysis approach for characterization of emulsions and dispersions. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 308, p. 500-507, 2007.
- CAMPOS, F. S. **Desenvolvimento de hidrogéis de dextrano contendo Praziquantel**. Araraquara, 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- CHEN, C.; C.; TSAI, T.; H.; HUANG, Z.; R., FANG, Y. J. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid

carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 74, p. 474-482, 2010.

CHORILLI, M. **Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo cafeína veiculados em géis hidrofílicos: estudos de estabilidade e liberação *in vitro***. Araraquara, 2004. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

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

CINTO, P. O.; SOUZA, A.L.R.; LIMA, A. C.; CHAUD, M.V.; GREMIÃO, M. P. D. LC Evaluation of Intestinal Transport of Praziquantel. *Chromatographia*. v. 69 p. 213-217, 2009.

CIOLI, D.; BOTROS, S. S.; FRANCKLOW, K. W.; MBAYE, A.; SOUTHGATE, V.; TCHUENTÉ, A.T.L.; PICA-M. L.; TROIANI, A. R.; DIN, S. H.; SABRA, A. N. A.; ALBIN, J.; ENGELS, D.; DOENHOFF, J. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **Int Journ. Parasitol.** v. 34 p. 979-987, 2004.

CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; LUCA, G.; NASTRUZZI, C. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. **Biomaterials.**, v. 23, p. 2283-2294, 2002.

DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Adv. Drug Delivery Rev.** V. 59 p. 505–521, 2007.

DISCH, J.; KATZ, N.; PEREIRA e SILVA, Y.; VIANA, L. G.; ANDRADE, M. O; RABELLO, A. Factors associated with *Schistosoma mansoni* infection 5 years after selective treatment in a low endemic area in Brazil. **Acta Trop.**, v. 81, p. 133-142, 2002.

DLVO (DERJAGUIN- LANDAU-VERWEY-OVERBEEK). Theory and solvation forces between mica surfaces in polar and hydrogen-bonding liquids. **J. Chem. Soc.** v. 80, p.1933-1946, 1983.

ELIÇABE, G. E.; SCHROEDER, W. F.; FRONTINI, G.L.; PETTARIN, V. Particle Systems Characterization Using a Flat Cell Static Light Scattering Apparatus. Part. Part. Syst. Charact. v. 24, p. 163-172, 2007.

FALLER, B.; ERTL, P. Computational approaches to determine drug solubility. **Adv. Delivery Rev.** v. 59, p. 533-545, 2007.

FANG, J.-Y.; FANG, C.-L.; LIU, C.-H.; SU, Y.-H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 70, p. 633-640, 2008.

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

FERREIRA, M. U.; FORONDA, A. S.; SCHUMAKER, T. T. S. Trematódeos. In: Fundamentos biológicos da parasitologia humana. São Paulo: Manoli, 2003, ed. 1, p. 125- 135.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Braz J. Pharm. Scie.** 2005, 41, 301-313.

GREMIÃO, M. P. D.; CELLI, C. M.; CHAIMOVICH, H. Anticardiolipin antibodies from syphilis and systemic lupus erythematosus induce leakage in cardiolipin vesicles. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 489-494, 1996.

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

GUPTA, R. B. Polymer or protein stabilized nanoparticles from emulsions. In: Nanoparticle technology for drug delivery. Taylor & Francis, v. 159, p. 85-102, 2006.

HAGAN, P.; APPLETON, C. C.; COLES, G. C.; KUSEL, J. R.; TCHUENTCHUENTÉ, L.-A. Schistosomiasis control: keep taking the tablets. **Trends Parasitol.**, v. 20, n. 2, p. 92-97, 2004.

HAN, F.; LI, S.; YIN, R.; LIU, H.; XU, L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.**, v. 315, p. 210-216, 2008.

HELLEMOND, J. J. V.; RETRA, K.; BROUWERS, J. F.H.M.; BALKOM, B. W. M. V.; YAZDANBAKHS, M.; SHOEMAKER, C. B.; TIELENS, A. G. M. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. **Int. J. Parasitol.** v. 36, p.691-699, 2006.

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 46, p. 75-87, 2001.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 357;10, p. 1018-1027, 2007.

HU, F.-Q.; ZHANG, Y.; DU, Y.-Z.; YUAN, H. Nimodipine loaded lipid nanospheres prepared by solvent diffusion method in a drug saturated aqueous system. **Int. J. Pharm.**, v. 348, p. 146-152, 2008.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), 2005. Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_gb/document_library/scientific_guideline/2009/09/wc500002662.pdf acessado em: 25/03/2010.

ISMAIL, M.; BOTROS, S.; METWALLY, A.; WILLIAM, S.; FARGHALLY, A.; TAO, L.-F.; DAY, T. A.; BENNETT, J. L. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, n. 6, p. 932-935, 1999.

JABOR, V.A.P.; ROCHA, G.M.; BONATO, P.S. Enantioselective analysis of praziquantel in plasma samples. **J. Chromatogr. B.**, p. 307-311, 1997.

JEZIORSKI, M. C.; GREENBERG, R. M. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: potential role in praziquantel action. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, p. 625-632, 2006.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; SAHAPHONG, S.; SOBHON, P.; RIENGROJPITAK, S.; KANGWANRANGSAN, N. *Schistosoma mekongi*: the *in vitro* effect of praziquantel and artesunate on the adult fluke. **Exp. Parasitol.**, v. 113, p. 16-23, 2006.

JORGENSEN, W. L.; DUFFY, E.M. Prediction of drug solubility from structure. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 54, p. 355-366, 2002.

JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. **Int. J. Pharm.**, v. 346, p. 124-132, 2008.

- JOSHI, M.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; PATRAVALE, V. Design and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: Nanoject. **Int. J. Pharm.**, v. 364, p. 119-126, 2008.
- JUNIOR, S.V.C. Técnicas de caracterização de polímeros, São Paulo, Artliber, 2004
- KATZ, N.; DIAS, L. C. S. Esquistossomose Mansonii. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. (Eds). Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo: Atheneu, 2001, ed. 2, p. 212-221.
- KING, C. Toward the Elimination of Schistosomiasis. **N. Engl. J. Med.** v. 360;2 p. 106-109, 2009.
- KOROLKOVAS, A.; ALBUQUERQUE, F. F.; FRANCA, C. Dicionário Terapêutico. São Paulo: Guanabara Koogan, ed.1, 2009.
- KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* v. 54, p. 77-98, 2002.
- KRISTL, J.; VOLK, B.; AHLIN, P.; GOMBAČ, K.; ŠENTJURC, M. Interactions of solid lipid nanoparticles with model membranes and leukocytes studied by EPR. **Int. J. Pharm.**, v. 256, p. 133–140, 2003.
- KUMAR, V. V.; CHANDRASEKAR, D.; RAMAKRISHNA, S.; KISHAN, V.; RAO, Y. M.; DIWAN, P. V. Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: Influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics. **Int. J. Pharm.**, v. 335, p. 167-175, 2007.
- LEÃO, A. M. A. C.; GADÊLHA, M. M. S.; ARAÚJO, R. V. S.; ARAÚJO, F. V. S.; SANTANA, J. V.; IACOMINI, M.; MAGALHÃES, N. S. S. avaliação do efeito do polissacarídeo da goma de *anacardium occidentale* livre e encapsulado em lipossomas sobre infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*. UFC, 2001
- LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. . **Int. J. Pharm.** v. 363, p. 26-39, 2008.
- LI, Y.S.; SLEIGH, AC.; ROSS, AG.P.; WILLIANMS, G.M.; TANNER,M.; MCMANUS, D.P. Epidemiology of *Schistossoma japonicum* in China: morbity and strategies for control in the dongting lake region. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 273-281, 2000.

LI, X.; NIE, S.; KONG, J.; LI, N.; JU, C.; PAN, W. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 363, p. 177-182, 2008.

LIMA, A. C. **Obtenção e caracterização de dispersões sólidas de praziquantel**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

LIMA, A. C. **Preparação de dispersões sólidas de praziquantel com polivinilpirrolidona pelo processo do fluido supercrítico**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

LIN, X.; LI, X.; ZHENG, L.; YU, L.; ZHANG, Q.; LIU, W. Preparation and characterization of monocaprates nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.** v. 311, p. 106-111, 2007.

LIU, C. H.; WU, T.C. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.** v. 353, P. 149-156, 2010.

LJUSBERG-WAHREN, H.; NIELSEN, F. S.; BROGÅRD, M.; TROEDSSON, E.; MÜLLERTZ, A. Enzymatic characterization of lipid-based drug delivery systems. **Int. J. Pharm.**, v. 298, p. 328–332, 2005.

LONGO, D. P. **Obtenção, caracterização e estudo de liberação in vitro e permeação in vivo de sistemas microestruturados contendo cafeína**. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2006.

LUO, Y.; CHEN, D.; REN, L.; ZHAO, X.; QIN, J. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. **J. Control. Release**, v. 114, p. 53-59, 2006.

MAINARDES, R. M. **Preparação e caracterização de nanopartículas de ácido poli (D, L-láctico – Co-Glicólico) contendo praziquantel**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery. **Curr. Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 363-371, 2005.

MARCATO, P. D.; preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 01-37, 2009.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de Medicamentos: fundamentos, aplicações aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 47, p. 165-196, 2001.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a doença. In Parasitologia humana. São Paulo, Atheneu, 2005, ed.11 p. 193- 211.

MIYAZAKI, Y.; ONUKI, Y.; YAKOU, S.; TAKAYAMA, K. Effect of temperature-increase rate on drug release characteristics of dextran microspheres prepared by emulsion solvent evaporation process. **Int. J. Pharm.**, v. 324, p. 144-151, 2006.

MONÉ, H.; BOISSIER, J. Sexual Biology of Schistosomes. **Adv. Parasitol.** v. 57 p. 89-189, 2004.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 158f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

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

MOURÃO, S. C.; COSTA, P. I.; SALGADO, H. R. M.; 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.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **Int. J. Pharm.**, v. 242, p. 121-128, 2002.

MÜLLER, R. H.; RUNGE, S. A.; RAVELLI, V.; THÜNEMANN, F.; MEHNERT, W.; SOUTO, E. B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): Drug–lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 2007.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **Encyclopedia of nanoscience and nanotechnonology**. v. 10, p. 43-56, 2004.

MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J.; BUSHRAB, F. N. Manufacturing of nanoparticles by milling and homogenization techniques. In: Nanoparticle technology for drug delivery. Taylor & Francis, v. 159, p. 21- 51, 2006.

NEVES, D. P. *Schistosoma mansoni*. In: NEVES, D. P. Parasitologia humana. São Paulo: Atheneu, 1985, ed. 6, p. 173-202.

NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P.; ARAÚJO, H. C. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. **Quím. Nova**, v. 22, n. 1, p.5-10, 1999.

OBEIDAT, W. M.; SCHWABE, K.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **Eur J Pharm Biopharm**. v. 76 p. 56 – 67, 2010.

OHSHIMA, H.; MIYAGISHIMA, A.; KURITA, T.; MAKINO, Y.; IWAO, Y.; TAKASHI, S.; ITAI, S. Freeze-dried nifedipine-lipid nanoparticles with long-term nano-dispersion stability after reconstitution. **Int. J. Pharm.**, v. 377, p. 180-184, 2009.

OLIVEIRA, G. F. **Incorporação de polímeros gastrorresistentes à sistemas multiparticulado a base de quitosana**. Araraquara, 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

OLIVEIRA, G. F. **Sistema multiparticulado magnético: desenvolvimento e avaliação in vivo através da biossusceptometria AC**. Araraquara, 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

OLIVEIRA, A. G. & SCARPA, M. V. Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma, Brasília**, 1(8), 73-79 2001

- OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. nova**, v. 27, n.1 p. 131-138, 2004.
- PARDEIKE, J.; HOMMOS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products **Int. J. Pharm.**, v. 366, p. 170-184, 2009.
- PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 527-533, 2004.
- POLETTO, F.S.; JÄGER, E.; CRUZ, L.; POHLMAN, A.R.; GUTERRES, S. S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug –loaded nanocapsules. **Mat. Sci. Eng.** V. 28, p. 472-478, 2008
- PORTER, C. J. H.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N. lipidis and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6 p. 231-248, 2007.
- RADOMSKA-SOUKHAREV, A. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 59, p. 411–418, 2007.
- REDESCHI, M. C. M. **Preparação e caracterização de filmes a base de xiloglucana extraída de sementes de *ymenaea Courbaril* (jatobá).** Araraquara, 2006. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- REY, L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomíase: O parasito. In parasitologia: Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008, ed.4, p. 435-446.
- SAUPE, A.; GORDON, K. C.; RADES, T. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. **Int. J. Pharm.**, v. 314, p. 56-62, 2006.
- SHAOHONG, L.; KUMAGAI, T.; QINGHUA, A.; XIAOLAN, Y.; OHMAE, H.; YABU, Y.; SIWEN, L.; LIYONG, W.; MARUYAMA, H.; OHTA, N. Evaluation of the antihelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. **Parasitol. Int.**, v. 55, p. 63-68, 2006.

- SHARMA, P.; GANTA, S.; DENNY, W. A.; GARGA, S. Formulation and pharmacokinetics of lipid nanoparticles of a chemically sensitive nitrogen mustard derivative: Chlorambucil. **Int. J. Pharm.** v. 367, p. 187-194, 2009.
- SHUHUA, X.; JIQING, Y.; JINYING, M.; HUIFANG, G.; PEIYING, J.; TANNER, M. Effect of praziquantel together with artemether on *Schistosoma japonicum* parasites of different ages in rabbits. **Parasitol. Int.**, v. 49, p. 25-30, 2000.
- SHUHUA, X.. Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to praziquantel and the artemisinins. **Acta Trop.**, v. 96, p. 153-167, 2005.
- SILER-MARINKOVIC, S.; MOJOVIC, L.; DAVINIC, V.; BUGARSKI, B. Liposomes as carriers of antimicrobial drugs. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 23, n. 5, p. 483-488, 1997.
- SILVA, L. C.; CHIEFFI, P.P; CARRILHO, F. J. *Schistosomiasis mansoni* – Clinical features. **Gastroenterol Hepatol.**, v.28, p. 30-39, 2005
- SPERA, L.J. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de microesferas de etilcelulose contendo praziquantel para serem veiculadas em suspensão para administração oral.** Araraquara, 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- SOUTO, E. B.; ANSELM, C.; CENTINI, M.; MÜLLER, R. H. Preparation and characterization of *n*-dodecyl-ferulate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®). **Int. J. Pharm.**, v. 295, p. 261–268, 2005.
- SOUTO, E. B.; WISSING, S. A.; BARBOSA, C. M.; MÜLLER, R.H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 278, p. 71–77, 2004.
- SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Drug Delivery. In: *Nanoparticles for Pharmaceuticals Applications*, ed. Copyright, cap. 5, p. 103-122, 2007.
- SOUZA, A. L. R. **Avaliação do efeito do praziquantel veiculado em dispersões lipídicas no tratamento camundongos infectados com *Scistossoma mansoni*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

TAN, S.W.; BILLA, N. ROBERTS, C.R.; BURLEY, J. C. Surfactant effects on the physical characteristics of Amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. *Physicochem.Eng. Aspects.* v. 372 p. 73-79. 2010.

TALLIMA, H.; RIDI, R. E. Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult worm actin. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, p. 570-575, 2007.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; JUNYAPRASERT, V. P.; MÜLLER, R. H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies **Eur J Pharm Biopharm.** v. 67 p. 141-148 2007.

URBAN, M.C.C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona.** Araraquara, 2004. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

ÜNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical proprieties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructure lipid carriers (NCL): Their benefits as colloidal drug carrier system. *Phamazie.* v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

USP 25. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. Rockville: The United StatesPharmacopeial Convention, 2002.

UTZINGER, J.; SHUHUA, X.; KEISER, J.; MINGGAN, C.; JIANG, Z.; TANNER, M. Current progress in the development and use of artemether for chemoprophylaxis of major human schistosome parasites. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, p. 1841-1859, 2001.

VAN DER WERF, M. J.; VLAS, S. J.; BROOKER, S.; CASPAR, W. N.; LOOMAN, N. J. D.; NAGELKERKE, J.; HABBEMA, D. F.; ENGELS, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Trop.**, v. 86, p. 125-139, 2003.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p. 1257-1272, (2004).

XIA, Q.; HAO, X.; LU, Y.; XU, W.; MA, Q.; GU, N. Production of drug-loaded lipid nanoparticles based on phase behaviors of special hot microemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v.313-314, p. 27-30, 2008.

YANG, L.; GENG, Y.; LI, H.; ZHANG, Y.; YOU, J.; CHANG, Y. Enhancement the oral bioavailability of praziquantel by incorporation into solid lipid nanoparticles. *Pharmazie*, v. 64, p. 86–89, 2009.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M. C.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 13-18, 2002.

ZHANG, N.; PING, Q.; HUANG, G.; XU, W.; CHENG, Y.; HAN, X. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. **Int. J. Pharm.**, v. 327, p. 153–159, 2006.

ZHANG, X.-G.; MIAO, J.; DAI, Y.-Q.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; HU, F.-Q. Reversal activity of nanostructured lipid carriers loading cytotoxic drug in multi-drug resistant cancer cells. **Int. J. Pharm.**, v. 361, p. 239–244, 2008.

ZHANG, X.; LIU, J.; QIAO, H.; LIU, H.; NI, J.; ZHANG, W.; SHI, Y. Formulation optimization of dihydroartemisinin nanostructured lipid carrier using response surface methodology. **Powder Technology** v.197, p. 120–128, 2010.