



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS
CONTENDO PRAZQUANTEL

ANA LUIZA RIBEIRO DE SOUZA

ARARAQUARA - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS
CONTENDO PRAZIQUANTEL

ANA LUIZA RIBEIRO DE SOUZA

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

ORIENTADOR: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento

ARARAQUARA – SP

2011

Ficha Catalográfica

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

S729d Souza, Ana Luiza Ribeiro de
Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel / Ana Luiza Ribeiro de Souza. – Araraquara, 2011
92 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

Co-orientador: Victor Hugo Vitorino Sarmento

1. Nanopartículas lipídicas sólidas. 2. Praziquantel. 3. Schistosoma mansoni. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Sarmento, Victor Hugo Vitorino, co-orient.. II. Título.

CAPES: 40300005

ANA LUIZA RIBEIRO DE SOUZA

**“DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO
PRAZIQUANTEL”**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Tese de
Doutorado, em sessão pública realizada em 11/07/2011, considerou a candidata
Ana Luiza Ribeiro de Souza:

() REPROVADA

(X) APROVADA

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

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

3) Examinador (*Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud*) _____

4) Examinador (*Prof. Dr. Marlus Chorilli*) _____

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

*Ao meu pai (in memoriam) e à minha mãe, por todo amor,
carinho, apoio e ensinamentos que formaram os alicerces da
minha história.*

E aos meus irmãos, por fazerem parte da minha vida!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu a vida com suas dificuldades e obstáculos, para que a cada superação, pudesse refletir e amadurecer.

À minha mãe, que me ensinou que mesmo perante as adversidades da vida, devo permanecer sempre no caminho do bem e honestamente. Agradeço também pelo amor incondicional, apoio e coragem que sempre me transmitiu.

À minha família, em especial aos meus irmãos Rodrigo e Rogério, às minhas cunhadas, ao meu primo Marcelo e sua esposa Elis, à minha madrinha e à minha tia Fúlvia, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a seguir em frente, independente das dores e provações.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, por toda a dedicação, transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, sempre com muita paciência, confiança, compreensão e amizade. Sou inteiramente grata por essa orientação que ultrapassa a tese.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento, meu co-orientador, pela sabedoria transmitida ao longo destes anos e pela colaboração nas análises por SAXS. Meu muitíssimo obrigado pelas múltiplas e inestimáveis contribuições.

À Profa. Dra. Eliana Souto, por ter me dado a oportunidade de desenvolver meu doutorado sanduíche, por toda a orientação prestada e pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Amélia M. Silva por ter me recebido em Portugal e me auxiliado em todos os experimentos durante todo o período que estive por lá. Obrigada pela sua amizade, dedicação, apoio, confiança e carinho!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pela amizade e oportunas manifestações de companheirismo, além das frutíferas discussões sobre este trabalho.

À Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti pela colaboração nos estudos *in vitro* e contribuir para meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud por sua ajuda no estudo de absorção e pela contribuição na discussão da tese.

Ao Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro pela importante contribuição nas análises de DSC e discussão dos resultados e pela disponibilização do Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNESP – Araraquara para a realização dos experimentos.

À Profa. Dra. Adélia Emília de Almeida, pelo auxílio nas análises de DSC e pela valorosa discussão na qualificação.

À Charlene, por todos os momentos de amizade, encorajamento e paciência.

Aos meus amigos Andréa Lima, Andréia Meneguim, Beatriz, Cristina Bruno, Cristina Franzini, Fabíola, Fernanda Carbinatto, Fernanda Kolenyak, Flávia Chiva, Flávio, Gabriela, Giovanna, Gisela, Gisele, Graziela, Gustavo, Hilris, Juliana Galli, Kelly, Lilian, Liliane, Márcia, Mariana Barbi, Marcelo, Priscileila, pela alegre convivência, longas conversas, sugestões e, sobretudo, amizade. A vocês, muito obrigada!

Ao Renan, meu “pupilo”, que aceitou o desafio de me auxiliar no desenvolvimento deste projeto, com muita disposição e cuidado.

À Tatiana, que se fez uma grande amiga, sempre tão dedicada e preocupada comigo. Com certeza, sem essa cumplicidade e carinho tudo teria sido muito mais difícil. Sou eternamente grata à sua amizade!!!

Agradecimentos

Às minhas amigas Ana Luísa e Polyanna, que apesar de não terem dividido o mesmo laboratório, me auxiliaram a superar momentos de dificuldade e de dor.

À Manuela, por toda a ajuda, carinho e apoio.

À Slavka, por ter me auxiliado no desenvolvimento das nanopartículas lipídicas sólidas.

Ao Douglas Cassimiro, pelo auxílio nas análises de DSC.

À Profa. Dra. Ana Dóris de Castro, ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira e ao Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista, pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Fernando M. Nunes, pelo apoio e colaboração na utilização do HPLC e outros equipamentos importantes para o desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Romeu Videira, por permitir a utilização de seus equipamentos durante todo o período que estive em Portugal.

Ao Prof. Dr. Dario Santos e à Profa. Dra. Paula F. Martins Lopes, pelo interesse, estímulo e colaboração em experimentos de toxicidade celular e em nível de DNA.

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 à Fátima.

Às funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pelo apoio e dedicação, em especial à Sônia, pela paciência e auxílio com toda documentação necessária para a bolsa PDEE.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcelo Ornaghi Orlandi do Laboratório de Microscopia por Varredura de Alta Resolução do Instituto de Química da UNESP – Araraquara pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura, em especial ao Tarek Fernandes pela imensa ajuda nas análises.

Ao Departamento de Biologia e Ambiente, na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (DeBA-UTAD), Vila Real, Portugal, pela disponibilização do Laboratório de Biologia Celular e Bioenergética do Centro de Investigação e de Tecnologias e de Ciências Agro-Ambientais e Biológicas (CITAB).

Ao Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP pela disponibilização do Laboratório, em especial à Rosimeire Nunes de Oliveira pela realização dos experimentos *in vitro* empregando cultura de *Schistosoma mansoni*.

À Faculdade de Ciências da Saúde da UNIMEP pela disponibilização do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa para realização do estudo de absorção *in vitro*.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) – Campinas.

À CAPES pelo suporte financeiro tanto no Brasil quanto na etapa sanduíche realizada na UTAD em Portugal (Bolsa PDEE).

A todos que eventualmente eu tenha esquecido de citar os nomes e que foram de extrema importância para a realização deste projeto.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

O praziquantel (PZQ) é o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose, sendo ativo contra todas as espécies de *Schistosoma*. Devido à sua baixa solubilidade em água e o risco de resistência ou tolerância do parasita a este fármaco, é importante desenvolver alternativas terapêuticas que possam aumentar sua eficácia e melhorar sua biodisponibilidade. As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) combinam as vantagens de diferentes carreadores coloidais tais como emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas, e também evitam algumas das suas desvantagens em relação à estabilidade e dificuldade de produção em larga escala. Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização de SLN contendo PZQ (SLN-PZQ) a fim de melhorar as propriedades biofarmacêuticas deste fármaco. O ácido esteárico foi selecionado como fase lipídica para o desenvolvimento das SLN devido à capacidade de solubilização do PZQ e baixo custo. As SLN foram preparadas por um método modificado de microemulsão óleo-em-água sob homogeneização a alta velocidade de cisalhamento utilizando Poloxamer 188 como tensoativo. O diâmetro médio e potencial zeta das SLN-PZQ foram $505,6 \text{ nm} \pm 27,2 \text{ nm}$ e $-34,0 \text{ mV} \pm 1,1 \text{ mV}$, respectivamente. As nanopartículas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura revelando a presença de partículas esféricas. Os resultados obtidos por calorimetria exploratória diferencial indicam que as SLN se apresentam no estado sólido e o fármaco está molecularmente disperso na matriz lipídica. A eficiência de encapsulação e capacidade de carga do PZQ determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência foram $99,06 \% \pm 0,3 \%$ e $17,48 \% \pm 0,05 \%$, respectivamente. A formação das SLN foi confirmada por espalhamento de raio-X a baixo ângulo revelando a presença de uma estrutura lamelar com efetiva incorporação do PZQ nas partículas. A estabilidade de SLN-PZQ armazenada em temperatura ambiente e a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ foi investigada em relação a tamanho de partícula, potencial zeta e eficiência de encapsulação. Resultados mostraram uma estabilidade física após armazenamento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 dias. O transporte do fármaco através da membrana intestinal foi avaliado pelo método do saco intestinal invertido. Foi observado uma absorção de

11,97 % \pm 5,85 % para o PZQ encapsulado em SLN e de 22,57 % \pm 3,49 % para o PZQ livre, sugerindo que as SLN-PZQ podem prolongar o efeito do fármaco. O estudo *in vitro* foi realizado em parasitas de *S. mansoni* recuperados por perfusão a partir do sistema porta-hepático de camundongos infectados. As SLN e SLN-PZQ apresentaram efeitos similares *in vitro* em cultura de *S. mansoni* e foram mais eficazes do que o PZQ livre, sugerindo um efeito sinérgico entre as SLN e o PZQ. A citotoxicidade foi investigada em linha celular HepG2 e foi observada uma toxicidade diminuída do fármaco quando incorporado nas SLN, em comparação a solução de PZQ de concentração similar. O grau de toxicidade mostrou ser dose-dependente. Estes resultados fazem das SLN um promissor sistema de liberação de praziquantel.

ABSTRACT

Praziquantel (PZQ) is a drug of choice for the treatment of schistosomiasis, being active against all species of *Schistosoma*. Due to its low water solubility and risk of parasite resistance or tolerance to this drug, it would be useful to develop therapeutical alternatives that can increase its efficacy and improve the bioavailability. Solid lipid nanoparticles (SLN) combine the advantages of different colloidal carriers such as emulsions, liposomes, and polymeric nanoparticles, and also avoid some of their disadvantages in relation to the stability and difficulty of large scale production. Thus, the aim of this research was the development and characterization of PZQ-loaded SLN (SLN-PZQ) to improve the biopharmaceutical properties of this drug. The stearic acid was selected as lipid phase to development of SLN due to solubilization capacity of the PZQ and low cost. The SLN were prepared by a modified oil-in-water microemulsion method under high-shear homogenization using Poloxamer 188 as surfactant. The mean particle size and zeta potential to PZQ-loaded SLN were $505.6 \text{ nm} \pm 27.2 \text{ nm}$ and $-34.0 \text{ mV} \pm 1.1 \text{ mV}$, respectively. The nanoparticles were observed by scanning electron microscopy (SEM) revealing the presence of spherical particles. The results obtained by differential scanning calorimetry indicate that the SLN are presented in the solid state and the drug is molecularly dispersed in the lipid matrix. The entrapment efficiency and loading capacity of PZQ determined by high performance liquid chromatography were $99.06 \% \pm 0.3 \%$ and $17.48 \% \pm 0.05 \%$, respectively. The SLN formation was confirmed by small angle X-ray scattering revealing the presence of a lipid lamellar structure with effective incorporation of the PZQ into particles. The stability of PZQ-loaded SLN stored at room temperature and at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ was investigated concerning particle size, zeta potential and entrapment efficiency. Results showed a long-term physical stability after storage at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 60 days. The transport of the drug through the intestinal membrane was evaluated by means of the everted gut sac model. It was observed an absorption of $11.97 \% \pm 5.85 \%$ to PZQ encapsulated into SLN and $22.57 \% \pm 3.49 \%$ to the free PZQ, suggesting that the PZQ-loaded SLN can prolong the effect of the drug. The *in vitro* study was carried out using *S. mansoni* parasites

recovered by perfusion from the hepatic portal system of infected mice. The effect of PZQ-unloaded and PZQ-loaded SLN *in vitro* on *S. mansoni* culture was similar and more effective than PZQ free, suggesting a synergistic effect of the SLN and the PZQ. The cytotoxicity was investigated in the HepG2 cell line and it was observed a decreased toxicity of the drug when incorporated into SLN, in comparison to a conventional PZQ solution of similar concentration. The degree of toxicity was shown to be dose-dependent. These results make the SLN a promising praziquantel drug delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do praziquantel.....	21
Figura 2. Modelos de incorporação de fármaco nos três tipos de SLN.....	29
Figura 3. Efeito de formulações lipídicas na absorção de fármacos.....	33
Figura 4. Diâmetro da formulação PI1-PZQ15.....	53
Figura 5. Diâmetro da formulação PA1-PZQ15.....	53
Figura 6. Potencial zeta da formulação PI1-PZQ15.....	54
Figura 7. Potencial zeta da formulação PA1-PZQ15.....	54
Figura 8. Fotomicrografias da formulação PA1.....	55
Figura 9. Fotomicrografias da formulação PA1-PZQ15.....	56
Figura 10. Curva DSC da matéria-prima PZQ.....	57
Figura 11. Curva DSC da matéria-prima SA.....	58
Figura 12. Curva DSC para a mistura física binária SA/PZQ.....	59
Figura 13. Curva DSC para a mistura física binária SA/PZQ aquecida até 90 °C.	59
Figura 14. Curva DSC da matéria-prima P-188.....	61
Figura 15. Curva DSC para a mistura física binária PZQ/P-188.....	62
Figura 16. Curva DSC para a mistura física binária PZQ/P-188 aquecida até 90 °C.....	62
Figura 17. Curva DSC para a formulação PA1.....	63
Figura 18. Curva DSC para a formulação PA1-PZQ15.....	64
Figura 19. Curva analítica do PZQ em água, obtida por CLAE.....	65
Figura 20. Curva de SAXS das amostras PA1 e PA1-PZQ15.....	66
Figura 21. Porcentagem de PZQ absorvido através do segmento intestinal invertido, após incubação com o fármaco livre e encapsulado nas SLN.....	69
Figura 22. <i>S. mansoni</i> incubado em RPMI 1640 (grupo controle).....	71
Figura 23. <i>S. mansoni</i> incubado em PA1.....	72
Figura 24. <i>S. mansoni</i> incubado em PA1-PZQ15.....	72
Figura 25. Porcentagem de redução do Alamar Blue® de células HepG2 tratadas com PZQ em diferentes concentrações.....	73
Figura 26. Porcentagem de redução do Alamar Blue® de células HepG2	

tratadas com PA1-PZQ15 em diferentes concentrações.....	74
Figura 27. Efeito das formulações na viabilidade celular de células HepG2 tratadas com PZQ livre e encapsulado em SLN (PA1-PZQ15) na concentração de PZQ igual a 60 µg mL ⁻¹	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de lipídeos e tensoativos utilizados no desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas.....	25
Tabela 2. Exemplos de SLN que aumentam a biodisponibilidade oral de fármacos.....	34
Tabela 3. Composição das nanopartículas lipídicas sólidas contendo os diferentes lipídeos e tensoativos (%).....	39
Tabela 4. Estudo de solubilidade utilizando 1 % de praziquantel.....	49
Tabela 5. Estudo de solubilidade utilizando 5 % de praziquantel.....	50
Tabela 6. Estudo de solubilidade utilizando 10 % de praziquantel.....	50
Tabela 7. Estudo de solubilidade utilizando 15 % de praziquantel.....	51
Tabela 8. Diâmetro médio, Pdl e potencial zeta das SLN desenvolvidas.....	51
Tabela 9. Dados de DSC para a mistura binária SA/PZQ aquecida até 90 °C.....	60
Tabela 10. Dados de DSC para a mistura binária PZQ/P-188 aquecida até 90 °C.....	63
Tabela 11. Dados de DSC para a formulação PA1.....	64
Tabela 12. Dados de DSC para a formulação PA1-PZQ15.....	64
Tabela 13. Diâmetro médio, Pdl, potencial zeta e EE da formulação PA1-PZQ15 armazenada a 4 °C ou em temperatura ambiente durante 60 dias.....	67
Tabela 14. Diâmetro médio, Pdl, potencial zeta e EE da formulação PA1-PZQ15 congelada com e sem crioprotetor e liofilizada.....	68
Tabela 15. Teste <i>in vitro</i> com as formulações PA1 e PA1-PZQ15 em cultura de <i>Schistosoma mansoni</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EE	Eficiência de encapsulação
GMS	Monoestearato de glicerila 40 – 55%
LC	Capacidade de carga
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
P-188	Poloxamer 188
PC	Fosfatidilcolina de soja
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
PZQ	Praziquantel
SA	Ácido esteárico
SAXS	Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
SLN-PZQ	Nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel
T-450	TegoCare [®] 450

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Praziquantel.....	21
1.2. Nanopartículas lipídicas sólidas.....	24
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1. MATERIAIS.....	36
3.1.1. Substâncias e Reagentes.....	36
3.1.2. Equipamentos e Acessórios.....	37
3.1.3. Animais.....	37
3.2. MÉTODOS.....	38
3.2.1. Estudo de solubilidade do praziquantel em diferentes lipídeos.....	38
3.2.2. Desenvolvimento das nanopartículas lipídicas sólidas.....	38
3.2.3. Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas sólidas.....	40
3.2.3.1. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersidade das nanopartículas lipídicas sólidas.....	40
3.2.3.2. Determinação do potencial zeta das nanopartículas lipídicas sólidas.....	41
3.2.3.3. Avaliação morfológica das nanopartículas lipídicas sólidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	41
3.2.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	42
3.2.3.5. Determinação da eficiência de encapsulação e capacidade de carga.....	42
3.2.3.5.1. Separação entre fármaco livre e fármaco encapsulado.....	42
3.2.3.5.2. Metodologia analítica para determinação do praziquantel por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	43
3.2.3.5.3. Eficiência de encapsulação e Capacidade de carga.....	43

3.2.3.6. Espalhamento de Raio-X a Baixo ângulo (SAXS).....	44
3.2.4. Avaliação da estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel.....	44
3.2.4.1. Estabilidade das SLN-PZQ frente ao armazenamento a 4 °C ou em temperatura ambiente.....	44
3.2.4.2. Estabilidade das SLN-PZQ frente ao processo de liofilização com e sem crioprotetor.....	44
3.2.5. Avaliação, <i>in vitro</i> , da absorção intestinal do praziquantel pelo método do saco intestinal invertido.....	45
3.2.5.1. Análise Estatística.....	45
3.2.6. Estudo do efeito das SLN em <i>S. mansoni in vitro</i>	46
3.2.7. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel em células HepG2.....	46
3.2.7.1. Cultura celular.....	46
3.2.7.2. Tratamento das células.....	47
3.2.7.3. Ensaio de citotoxicidade utilizando Alamar Blue®.....	47
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Estudo de solubilidade do praziquantel em diferentes lipídeos.....	49
4.2. Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas sólidas.....	51
4.2.1. Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas lipídicas sólidas.....	51
4.2.2. Avaliação morfológica das SLN por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	54
4.2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	56
4.2.4. Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (LC).....	65
4.2.4.1. Metodologia analítica para determinação do PZQ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	65
4.2.4.2. Eficiência de encapsulação (EE) e Capacidade de carga (LC).....	65
4.2.5. Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	66

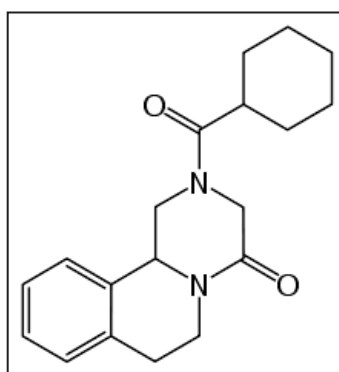
4.3. Avaliação da estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel.....	67
4.3.1. Estabilidade das SLN-PZQ frente ao armazenamento a 4 °C e em temperatura ambiente.....	67
4.3.2. Estabilidade das SLN-PZQ frente ao processo de liofilização com e sem crioprotetor.....	67
4.4. Avaliação, <i>in vitro</i> , da absorção intestinal do praziquantel pelo método do saco intestinal invertido.....	68
4.5. Estudo do efeito das SLN em <i>S. mansoni in vitro</i>	69
4.6. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel em células HepG2.....	72
5. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

INTRODUÇÃO

1.1. PRAZIQUANTEL

O praziquantel (PZQ) (Figura 1) é um fármaco pertencente à classe das pirazinoisoquinolonas, que foi originalmente desenvolvido para aplicações veterinárias, sendo atualmente um dos fármacos anti-parasitários mais importantes para o uso humano e veterinário (ALI, 2006).

Figura 1 - Estrutura química do praziquantel.



FENWICK *et al.*, 2003.

O PZQ foi o primeiro fármaco anti-helmíntico a atender os requisitos da Organização Mundial de Saúde para o tratamento da população em uma ampla faixa de infecções parasitárias (REICH *et al.*, 1995). Tem atividade contra um amplo espectro de trematódeos e cestódeos, mas é ineficaz contra outros organismos, tais como nematódeos (GREENBERG, 2005; JEZIORSKI; GREENBERG, 2006).

Na esquistossomose, apesar do mecanismo de ação não estar completamente elucidado, há evidências experimentais que o PZQ aumenta a permeabilidade das membranas dos esquistossomas aos íons cálcio (Ca^{2+}), induzindo a contração dos parasitas, resultando em paralisia no estado contraído. Os parasitas mortos são desalojados do seu local de ação no organismo do hospedeiro e podem entrar na circulação sistêmica ou serem destruídos pelo sistema imune do hospedeiro (GREENBERG, 2005; JEZIORSKI; GREENBERG, 2006).

Por apresentar baixos efeitos toxicológicos, o PZQ tornou-se o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose. É altamente efetivo contra as cinco espécies de *Schistosoma*, tem pouco ou nenhum efeito adverso e ao longo dos anos, seu preço tem sido reduzido substancialmente (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995; JEZIORSKI, GREENBERG, 2006; REICH *et al.*, 1995; SHAOHONG *et al.*, 2006; SHUHUA, 2005; UTZINGER *et al.*, 2001).

Apesar do praziquantel ser rapidamente e quase que completamente absorvido, apresenta biodisponibilidade baixa ou errática devido a um significativo efeito de metabolismo pré-sistêmico após administração oral (ALI, 2006). Vários estudos desenvolvidos com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade oral do PZQ estão descritos na literatura. Metwally e colaboradores (1995) demonstraram que a biodisponibilidade do PZQ pode ser duplicada quando administrado com cimetidina. A utilização de polivinilpirrolidona aumentou a taxa de dissolução do PZQ na forma de dispersões sólidas (EL-ARINI; LEUENBERGER, 1998). Castro e colaboradores (2000) reportaram que a administração concomitante de PZQ com alimentos aumenta a concentração plasmática deste fármaco. Giorgi e colaboradores (2003) encontraram que tanto o suco de toranja liofilizado quanto o suco líquido comercial aumentaram significativamente a concentração plasmática e $t_{1/2}$ do PZQ em cães.

Para superar problemas de baixa biodisponibilidade e alta variabilidade farmacocinética, muitos estudos têm focado no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos. Estes nanocarreadores incluem carreadores poliméricos ou baseados em lipídeos tais como: lipossomas, vesículas nas quais um volume aquoso é totalmente rodeado por uma membrana de bicamada fosfolipídica; micelas, que são agregados anfífilicos em uma solução aquosa; micro/nanoemulsão, sistemas compostos por água e óleo, estabilizados por moléculas anfífilicas e que são opticamente isotrópicas e termodinamicamente estáveis e nanopartículas, incluindo nanoesferas e nanocápsulas (HEURTAULT *et al.*, 2003; ROGER *et al.*, 2010).

Mourão e colaboradores (2005) estudaram o efeito *in vitro* e *in vivo* do PZQ encapsulado em lipossomas de fosfatidilcolina de soja (PC) contra a linhagem LE de *Schistosoma mansoni*. Observou-se uma melhora da solubilidade aquosa do PZQ

encapsulado em lipossomas, sem haver alteração da sua eficácia *in vitro*. No teste *in vivo* realizado em camundongos, os lipossomas contendo PZQ causaram uma redução de 51,56 % na quantidade de ovos e de 43,51 % na quantidade de parasitas. Já o PZQ livre, reduziu 17,18 % e 0 %, respectivamente. Estes resultados ressaltam o aumento da efetividade do PZQ quando encapsulado em lipossomas.

Mainardes e colaboradores (2006) desenvolveram nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) como carreadores do praziquantel. Utilizando o modelo do saco intestinal invertido, o PZQ livre apresentou permeação 4 vezes maior do que quando encapsulado em nanopartículas de PLGA. Cinto (2005) também observou uma diminuição da absorção do PZQ quando encapsulado em lipossomas em comparação ao fármaco livre. Estes estudos mostraram a possibilidade do uso de sistemas nanoparticulados como reservatório de fármaco e/ou como forma de exercer um efeito mais localizado na membrana intestinal por um período de tempo prolongado, o qual aumentaria a eficácia do PZQ.

Ampliando o estudo sobre o efeito dos lipossomas contendo PZQ empregando a linhagem BH (oriunda de Belo Horizonte), linhagem patogênica que não foi exposta ao fármaco, observou-se que as doses comumente empregadas não apresentaram resultados adequados, sendo necessário aumentar a dose do fármaco. Assim, foram desenvolvidos e caracterizados lipossomas contendo concentrações bem maiores que as utilizadas anteriormente. O aumento das concentrações de PC e PZQ levou a formação de um gel com alta viscosidade contendo vesículas densamente empacotadas. Estes sistemas foram os mais efetivos, contrariando o que era esperado pois o aumento da estruturação do sistema poderia levar a uma menor difusão do fármaco (SOUZA, 2008).

Atualmente, as nanopartículas lipídicas sólidas ocupam uma posição de destaque entre os sistemas lipídicos para liberação de fármacos disponíveis por aumentar a biodisponibilidade de fármacos e reduzir a variabilidade farmacocinética de fármacos lipofílicos.

1.2. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

A utilização de matrizes lipídicas sólidas para a liberação prolongada de fármacos é conhecida na área farmacêutica há muitos anos, como liberação a partir de *pellets* lipídicos (ELDEM; SPEISER; HINCAL, 1991; MEHNERT; MÄDER, 2001). No início da década de 1980, pesquisadores desenvolveram micropartículas lipídicas sólidas por *spray drying* (ELDEM; SPEISER; HINCAL, 1991) e *nanopellets* lipídicos para administração oral (SPEISER, 1986). O termo nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) só foi introduzido na década de 1990 por Gasco (1993) e por Müller e Lucks (1996).

As SLN foram desenvolvidas como sistemas carreadores alternativos combinando as vantagens das nanopartículas poliméricas (matriz sólida para liberação controlada), lipossomas e emulsões O/A, mas evitando algumas das suas desvantagens em relação à estabilidade, como por exemplo, expulsão do fármaco ou coalescência, e dificuldade de escalonamento (FRICKER *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2008; KRISTL *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2007; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MÜLLER *et al.*, 2008; RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007; WESTESEN; BUNJES, 1995; ZHANG *et al.*, 2006).

As SLN apresentam um tamanho coloidal entre 50 e 1000 nm e podem ser utilizadas como sistemas carreadores para fármacos hidrofóbicos e, com menor capacidade de carga, para fármacos hidrofílicos (FRICKER *et al.*, 2010; SEETAPAN *et al.*, 2010; VIGHI *et al.*, 2010).

A matriz das nanopartículas lipídicas sólidas é composta por lipídeos que são sólidos em temperatura ambiente e corporal, tensoativo(s) e água. O termo lipídeo utilizado aqui inclui triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e ceras. Todas as classes de tensoativos (iônico ou não-iônico com diferentes pesos moleculares) têm sido utilizadas para estabilizar a dispersão lipídica e a sua escolha depende da via de administração (MEHNERT; MÄDER, 2001). A Tabela 1 apresenta diferentes lipídeos e tensoativos utilizados no desenvolvimento de SLN.

Tabela 1 - Exemplos de lipídeos e tensoativos utilizados no desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas.

Lipídeo	Tensoativo (s)	Fármaco (s)	Referência
Ácido esteárico	Lecitina de soja/Poloxamer 188	camptotecina	YANG <i>et al.</i> (1999)
Ácido esteárico	Álcool polivinílico (PVA)	rifampicina, isoniazida e pirazinamida	PANDEY; SHARMA; KHULLER (2005)
Palmitato de cetila	Diestearato de metilglicose poliglicerila-3	-	SAUPE; GORDON; RADES (2006)
Monoestearato de glicerila	Polissorbato 80/Lecitina de soja	vimpocetina	LUO <i>et al.</i> (2006)
Palmitato de cetila	Poloxamer 188	nitrendipina	KUMAR <i>et al.</i> (2007)
Monoestearato de glicerila 40 – 50%	Monoestearato de glicerila polioxietilado/Colato de sódio	ciclosporina	MÜLLER <i>et al.</i> (2008)
Behenato de glicerila/Acetato de butila	Poloxamer 188/Estearato de sódio/Fosfatidilcolina	praziquantel	YANG <i>et al.</i> (2009)
Palmitoestearato de glicerila	Poloxamer 188	-	ALI <i>et al.</i> (2010)
Triestearato de glicerila	Polissorbato 80	17-valerato de betametasona	JENSEN <i>et al.</i> (2010)
Behenato de glicerila	Poloxamer 188	morfina	KÜCHLER <i>et al.</i> (2010)

A grande vantagem das SLN é o fato da matriz lipídica ser produzida a partir de lipídeos fisiológicos que diminuem a toxicidade aguda e crônica, além de serem biodegradáveis (FREITAS; MÜLLER, 1998; JOSHI; PATRAVALE, 2008; MEHNERT;

MÄDER, 2001; RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007; VIGHI *et al.*, 2010; WESTESEN; BUNJES, 1995).

A matriz sólida protege as moléculas de fármacos incorporados contra a degradação química, além de apresentar custo relativamente baixo dos excipientes, capacidade de serem produzidos em larga escala e amplo espectro de aplicação (oral, intravenosa, dérmica, oftálmica) (HU *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2007; RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007; SAUPE; GORDON; RADES, 2006; SOUTO *et al.*, 2005).

Métodos de Preparação

As SLN podem ser obtidas por vários métodos descritos na literatura, entre eles: microemulsão a quente, emulsificação e evaporação de solvente, difusão de solvente, homogeneização a quente empregando alto cisalhamento e/ou ultrassom, homogeneização à alta pressão (HPH), entre outros.

Método de Microemulsão a Quente

O método de microemulsão a quente foi desenvolvido inicialmente por Gasco (1993) e com modificações posteriores. Neste método, o lipídeo é fundido (5 – 10 °C acima da temperatura de fusão do lipídeo) e misturado com uma solução aquosa composta por tensoativo e co-tensoativos na mesma temperatura do lipídeo fundido formando uma microemulsão. Então, esta microemulsão quente é dispersa em água gelada (2 – 3 °C) sob agitação e o excesso de água é removido por ultra-filtração, liofilização ou diálise. O método de microemulsão é, em geral, utilizado para encapsular fármacos lipofílicos, mas fármacos hidrofílicos também podem ser encapsulados utilizando emulsão A/O/A (HOU *et al.*, 2003; MEHNERT; MÄDER, 2001; PEDERSEN *et al.*, 2006).

Emulsificação e Evaporação de Solvente

Neste método, o lipídeo é completamente dissolvido em um solvente orgânico imiscível em água que é emulsificado em uma fase aquosa contendo tensoativo. Após evaporação do solvente sob pressão reduzida, uma dispersão de

nanopartícula é formada pela precipitação do lipídeo no meio aquoso. A grande vantagem deste método é a incorporação de fármacos altamente termolábeis, pois não é utilizado aquecimento durante a preparação (MEHNERT; MÄDER, 2001; MENDOZA *et al.*, 2009). Entretanto, apresenta desvantagens como, por exemplo, solvente residual na dispersão final e o fato das dispersões serem muito diluídas, devido à limitada solubilidade do lipídeo no solvente orgânico (WISSING; KAYSERB; MÜLLER, 2004). Outra desvantagem é a produção de micropartículas lipídicas e não de nanopartículas, o que pode ser revertido utilizando homogeneização à alta pressão ou ultrassom (MARCATO, 2009).

Difusão de Solvente

Na técnica de difusão do solvente, solventes orgânicos parcialmente miscíveis em água são utilizados. Inicialmente, o solvente é saturado com água para obtenção de certo balanço termodinâmico inicial de ambos os líquidos. Depois, o lipídeo é dissolvido nesta solução de solvente saturada e subsequentemente emulsificado com uma solução aquosa de tensoativo saturada em temperatura elevada. A obtenção das SLN se dá através da precipitação após a evaporação do solvente orgânico à baixa pressão (MARCATO, 2009; MENDOZA *et al.*, 2009). É um método simples que não requer nenhum equipamento especial, mas apresenta como desvantagens o uso de solvente orgânico e a dificuldade de produção em larga escala (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2008; HU; JIANG; DU, 2005; HU *et al.*, 2006).

Homogeneização a quente empregando alto cisalhamento e/ou ultrassom

Estas técnicas dispersantes não requerem o uso de solventes orgânicos ou grandes quantidades de tensoativos. O lipídeo fundido é disperso em uma solução aquosa com a ajuda de um homogeneizador de alto cisalhamento e/ou ultrasonicação. A emulsão obtida é resfriada em temperatura ambiente.

Tanto o alto cisalhamento quanto o ultrassom são métodos amplamente difundidos e fáceis de manusear. Entretanto, a qualidade da dispersão é frequentemente comprometida pela presença de uma pequena quantidade de partículas (MEHNERT; MÄDER, 2001; MENDOZA *et al.*, 2009).

Homogeneização à alta pressão (HPH)

Patenteado por Müller e Lucks (1996), a homogeneização à alta pressão tem emergido como uma técnica confiável e poderosa para a preparação de SLN. Em contraste às outras técnicas, o escalonamento é possível já que homogeneizadores de diferentes tamanhos estão disponíveis comercialmente.

As nanopartículas lipídicas sólidas podem ser preparadas por esta técnica por dois métodos básicos: homogeneização a quente e homogeneização a frio (MARCATO, 2009).

Na homogeneização a quente, o fármaco é disperso ou dissolvido no lipídeo sólido fundido, normalmente 5 – 10 °C acima do ponto de fusão do lipídeo. Depois, a mistura fármaco-lipídeo fundida é dispersa em uma solução aquosa de tensoativo mantida na mesma temperatura e agitada a alta velocidade, formando uma pré-emulsão O/A. Esta emulsão é passada através do homogeneizador de alta pressão, na temperatura acima do ponto de fusão do lipídeo, obtendo nanoemulsão O/A quente. A solidificação da nanoemulsão por resfriamento em temperatura ambiente leva a formação das SLN. Este método é utilizado principalmente no encapsulamento de fármacos lipofílicos.

Entretanto, a alta temperatura no processo a quente pode aumentar a velocidade de degradação do fármaco e do carreador, e modificar a conformação de proteínas, enquanto a alta pressão pode ocasionar a coalescência das partículas (HU *et al.*, 2006).

Na técnica de homogeneização a frio, o fármaco é dissolvido no lipídeo fundido com ou sem tensoativo. Em seguida, esta mistura é solidificada em nitrogênio líquido ou gelo seco, levando a formação de uma solução sólida, na qual é realizada moagem para formação de micropartículas (50 – 100 µm). Então, estas micropartículas lipídicas sólidas são dispersas e emulsificadas em uma fase aquosa fria contendo tensoativo. Em seguida, esta pré-suspensão é homogeneizada a alta pressão à temperatura ambiente ou a 0°C. Este método é mais apropriado para fármacos hidrofílicos e termolábeis. Em comparação à homogeneização a quente, tamanhos maiores de partículas e uma distribuição mais ampla de tamanho são observadas (MARCATO, 2009; MEHNERT; MÄDER, 2001; MENDOZA *et al.*, 2009).

Dependendo do método de homogeneização (a frio ou a quente) utilizado e das condições de preparação das SLN, o fármaco será incorporado de diferentes maneiras dentro das nanopartículas, o que influenciará diretamente na sua liberação. Além disto, a incorporação do fármaco nas SLN não depende somente das propriedades físico-químicas do fármaco, mas também da miscibilidade e solubilidade do fármaco no lipídeo fundido, tipo de material da matriz e o grau de cristalinidade e forma polimórfica (MARCATO, 2009; MENDOZA *et al.*, 2009).

Tipos de nanopartículas lipídicas sólidas

Há três modelos diferentes descritos na literatura para explicar os mecanismos de incorporação do fármaco: em uma matriz homogênea (solução sólida), cápsula rica em fármaco e núcleo rico em fármaco (Figura 2).

Figura 2 - Modelos de incorporação de fármaco nos três tipos de SLN.



MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000.

Na matriz, o fármaco está molecularmente disperso no lipídeo fundido formando uma mistura, sendo obtida a SLN por homogeneização a frio. O segundo e terceiro tipo são obtidos por homogeneização a quente. O tipo cápsula rica em fármaco contém uma camada externa enriquecida com fármaco, que cobre uma matriz lipídica. Pode ser explicada como uma função da solubilidade do fármaco na mistura tensoativo-água em temperatura mais elevada durante o processo de produção. Parte do fármaco deixa a partícula lipídica e se dissolve na fase aquosa durante o processo de homogeneização. O processo de resfriamento reduz a solubilidade do fármaco na fase aquosa e o fármaco tenta se distribuir no interior das

partículas lipídicas levando ao enriquecimento da cápsula da partícula caso o núcleo da partícula tenha iniciado sua solidificação. A SLN tipo núcleo rico em fármaco (ou sistema tipo reservatório) é formada quando o resfriamento da emulsão O/A leva a precipitação do fármaco primeiro e a concentração de fármaco está perto da sua concentração de saturação no lipídeo fundido (FRICKER *et al.*, 2010; MARCATO, 2009; MENDOZA *et al.*, 2009).

Os diferentes perfis de distribuição do fármaco nas nanopartículas lipídicas sólidas influenciam diretamente na sua liberação. A cápsula rica em fármaco pode resultar em liberação imediata (“*burst*”), enquanto a liberação prolongada indica interações lipídeo-fármaco intensivas e localização do fármaco no núcleo das SLN (KÜCHLER *et al.*, 2010). A liberação do fármaco a partir da matriz lipídica sólida ocorre por difusão e adicionalmente pela degradação da nanopartícula lipídica (MENDOZA *et al.*, 2009). Além disso, o tipo de lipídeo e tensoativo utilizado no desenvolvimento das SLN podem afetar a liberação do fármaco consideravelmente.

Jensen e colaboradores (2010) mostraram que a composição lipídica das SLN tem influência no perfil de liberação *in vitro* do 17-valerato de betametasona (BMV), em que a maior liberação foi obtida para a SLN preparada com o lipídeo que continha maior quantidade de monoglicerídeo.

Em outro estudo, Paliwal e colaboradores (2009) mostraram que a taxa de liberação do metotrexato a partir das SLN contendo Compritol 888 ATO (19,0 %) foi cerca de 90 % maior do que das SLN contendo ácido esteárico (10,4 %), em formulações desenvolvidas com igual quantidade de lipídeos.

Aplicações

As nanopartículas lipídicas sólidas podem ser administradas por diversas vias que incluem dérmica, parenteral, ocular, pulmonar e oral. Cavalli e colaboradores (2002) estudaram a administração oftálmica de SLN contendo tobramicina. As nanopartículas foram desenvolvidas pelo método de microemulsão O/A a quente utilizando o ácido esteárico como lipídeo. O diâmetro médio das SLN contendo tobramicina obtidas foi 80 nm e índice de polidispersidade igual a 0,12. Quando comparada com uma dose igual de tobramicina administrada por colírio comercial

padrão, SLN contendo tobramicina produziram significativamente uma maior biodisponibilidade da tobramicina no humor aquoso. Estes resultados demonstram que SLN aparecem como um veículo promissor para administração ocular da tobramicina.

Teskač e Kristl (2010) desenvolveram SLN contendo resveratrol para administração cutânea e avaliaram o efeito citotóxico nos queratinócitos do resveratrol livre e incorporado em SLN. Mudanças morfológicas associadas com necrose vistas com o resveratrol estavam ausentes quando o fármaco estava encapsulado em SLN. A citotoxicidade global associada ao resveratrol foi evitada pela sua encapsulação em SLN, as quais são rapidamente absorvidas e bem toleradas pelas células. As SLN protegem as células contra os efeitos citotóxicos associados ao resveratrol livre, o que sugere o potencial para o desenvolvimento de uma formulação para tratamento do câncer de pele.

Recentemente, a via pulmonar tem sido explorada como uma via de administração alternativa não-invasiva tanto para liberação sistêmica como local. Liu e colaboradores (2008) desenvolveram e otimizaram SLN contendo insulina com propriedades de deposição desejadas. Não foi encontrada nenhuma citotoxicidade óbvia em linha celular pulmonar A549, o que sugere a segurança das SLN para liberação pulmonar. Os nanocarreadores foram homoganeamente distribuídos nos alvéolos pulmonares e uma liberação prolongada da insulina foi observada tanto pelo aumento do seu nível plasmático quanto pelos perfis de glicose mais favoráveis. Uma biodisponibilidade farmacológica de 24,33 % e uma biodisponibilidade relativa de 22,33 % (comparada com a insulina administrada por via subcutânea) foram obtidas após inalação de SLN contendo insulina, as quais foram quase 4 vezes maior do que o controle. Estes resultados indicam que SLN podem ser aplicadas com sucesso como carreador pulmonar para a insulina.

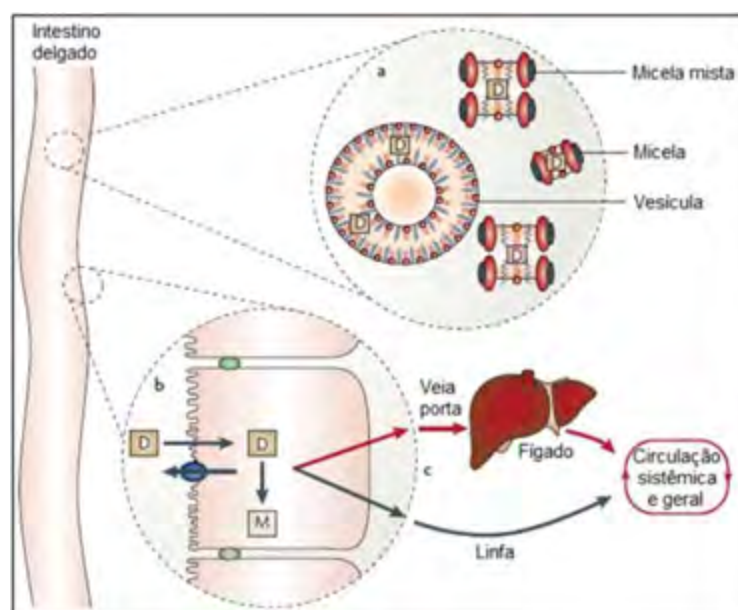
Ye e colaboradores (2008) estudaram a formulação intravenosa de SLN contendo actarite, um fármaco frequentemente utilizado no tratamento da artrite reumatóide, preparada por método modificado de difusão - evaporação de solvente. As SLN apresentaram forma elipsoidal ou esférica. O diâmetro médio foi de 241 nm, potencial zeta de -17,14 mV e eficiência de encapsulação de 50,87 %. Comparado

com solução de actarite, as SLN contendo este fármaco exibiram, em coelhos, um tempo de residência prolongado do fármaco na circulação sanguínea, e melhorou significativamente a eficiência global de direcionamento para o baço de camundongos. Estes resultados sugerem que as SLN contendo actarite podem reduzir o número e a frequência de dose e toxicidade, melhorando assim a adesão do paciente.

A via oral é a via mais comum para administração de fármacos devido à facilidade e maior adesão do paciente ao tratamento. Entretanto, a absorção oral é limitada por várias barreiras fisiológicas, que necessitam ser moduladas para alterar a baixa e variável biodisponibilidade oral de vários fármacos (ROGER *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de formulações lipídicas tem contribuído para melhorar a biodisponibilidade oral de fármacos lipofílicos. Há três mecanismos primários pelos quais lipídeos e excipientes lipofílicos afetam a absorção, biodisponibilidade e disposição de fármacos após administração oral. São eles: (a) aumento da solubilização de fármacos no meio intestinal através de alterações na composição e características do ambiente fisiológico; (b) transporte baseado em enterócito e processos metabólicos, alterando potencialmente absorção, efluxo, disposição e a formação de metabólitos do fármaco dentro dos enterócitos; (c) estimulação do transporte linfático intestinal para a circulação sistêmica (Figura 3) (FRICKER *et al.*, 2010; MENDOZA *et al.*, 2009; PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007).

Figura 3 - Efeito de formulações lipídicas na absorção de fármacos. (D) fármacos; (M) metabólitos.



PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007.

A capacidade de liberar eficientemente fármacos altamente lipofílicos a partir de formulação lipídica tem renovado o interesse no transporte linfático de fármacos. A maioria dos fármacos administrados por via oral se difunde através dos enterócitos, são absorvidos no interior das veias mesentéricas pelos capilares da veia porta, passam através do fígado e posteriormente para a circulação sistêmica. Entretanto, alguns fármacos lipofílicos (tipicamente com $\log P > 5$ e solubilidade > 50 mg em triglicerídeos de cadeia-longa) se associam a lipoproteínas no interior dos enterócitos e alcançam a circulação sistêmica via sistema linfático intestinal com a vantagem de redução do metabolismo hepático do fármaco e aumento da biodisponibilidade oral (FRICKER *et al.*, 2010; PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007).

Na literatura, muitos estudos têm demonstrado o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos lipofílicos encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas (Tabela 2).

Tabela 2 - Exemplos de SLN que aumentam a biodisponibilidade oral de fármacos.

Animal	Fármaco	AUC do fármaco livre	AUC do fármaco encapsulado	Referência
Camundongo	Camptotecina	62 ng.h.g ⁻¹	88 ng.h.g ⁻¹	YANG <i>et al.</i> (1999)
Rato	Vimpocetina	2,30 µg.mL ⁻¹ .h	9,56 µg.mL ⁻¹ .h	LUO <i>et al.</i> (2006)
Rato	Quercetina	56,73 µg.mL ⁻¹ .h	324,18 µg.mL ⁻¹ .h	LI <i>et al.</i> (2009)
Rato	Sinvastatina	7,14 ng.mL ⁻¹ .h	24,05 ng.mL ⁻¹ .h	ZHANG <i>et al.</i> (2010)

OBJETIVO GERAL

Como visto anteriormente, há um grande interesse nas nanopartículas lipídicas sólidas como sistemas de liberação de fármacos na área farmacêutica. Vários métodos de preparação estão disponíveis e têm sido aprimorados durante os últimos anos. Além disso, as SLN podem ser administradas por diferentes vias e demonstram grande potencial para liberação sistêmica e local de fármacos. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas como sistema de liberação para o praziquantel a fim de melhorar as características biofarmacêuticas deste fármaco.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel (SLN-PZQ);
- Investigar a estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) armazenadas durante 60 dias a 4 °C e em temperatura ambiente, e frente ao processo de liofilização;
- Avaliar, *in vitro*, as características das SLN envolvidas na permeação do praziquantel através da membrana intestinal;
- Avaliar, *in vitro*, as características das SLN obtidas sobre *Schistosoma mansoni* adultos em cultura de célula;
- Avaliar a citotoxicidade das SLN-PZQ em células HepG2, através do ensaio de AlamarBlue®.

MATERIAIS

3.1.1. Substâncias e Reagentes

- Ácido esteárico - Acofarma, Portugal;
- Ácido fórmico - Panreac Química, Espanha;
- Água deionizada Milli'Q;
- AlamarBlue[®] - Invitrogen, Life Technologies;
- Antibióticos penicilina/estreptomicina - Gibco, Life Technologies;
- Behenato de glicerila, uma mistura de ~ 15% monoglicerídeos, 50 % diglicerídeos e 35 % triglicerídeos do ácido behênico, Compritol[®] 888 ATO - Gattefossé, França;
- Diestearato de metilglicose poliglicerila-3, TegoCare[®] 450 Ester – Goldschmidt GmbH, Alemanha;
- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM sem L-glutamina) - Lonza, Biowhittaker;
- Etanol - Panreac Química, Espanha;
- Glicerídeos de coco hidrogenados, Witepsol[®] E 75 Pastillen - Sasol, Alemanha GmbH;
- Glicerol – Merck, Alemanha;
- L-glutamina - Gibco, Life Technologies;
- Metanol absoluto - Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Alemanha;
- Metanol grau CLAE - Panreac Química, Espanha;
- Monoestearato de glicerila, 40 – 55 %, Imwitor[®] 900 P - Sasol, Alemanha GmbH;
- Monoestearato de glicerila, > 90 %, Imwitor[®] 491 - Sasol, Alemanha GmbH;
- Palmitato de cetila, Hexadecanoato de hexadecil (C₃₂H₆₄O₂), 98 % - Aldrich, USA;
- Palmitoestearato de glicerila, Precirol[®] ATO 5 - Gattefossé, França;
- Pentobarbital de sódio – Abbott, Brasil;
- Poloxamer 188, Lutrol[®] F 68 - BASF ChemTrade GmbH;

- Praziquantel - Henrifarma[®], Brasil;
- Soro fetal bovino - Gibco, Life Technologies;
- TC 199 – Cloreto de sódio 145 mM, cloreto de potássio 4,56 mM, cloreto de cálcio diidratado 1,25 mM, fosfato de sódio monobásico 5 mM, pH 7.4;
- Triestearato de glicerila, Dynasan[®] 118 - Sasol, Alemanha GmbH;
- Tripsina 0,05 % - Gibco, Life Technologies.

3.1.2. Equipamentos e Acessórios

- Analisador de partículas *Light Scattering* – Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments;
- Balança analítica - SCALTEC;
- Calorímetro exploratório diferencial DSC 1 – METTLER TOLEDO;
- Câmara de fluxo laminar - FASTER BH-EN 2004;
- Coluna de octadecilsílica para CLAE (25 cm x 5 µm de tamanho de partícula) – ACE[®] 5;
- Estufa - BINDER;
- Leitor de microplacas - Multiskan EX, Labsystem;
- Liofilizador - Dura Dry MP;
- Microscópio Eletrônico de Varredura – JEOL JSM 7500F;
- Placa de aquecimento - FALC;
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Dionex - mod. UltiMate 3000[®], equipado com detector espectrofotométrico com fotodiodo (PDA-100);
- Sonicador Sonic Vibra cell 25 kHz – Reagente 5;
- Ultra-centrífuga - Sigma 3K30;
- Ultra-Turrax[®] T25 - IKA[®] Works Inc., NC, USA.

3.1.3. Animais

- Camundongos *Mus musculus*, linhagem Swiss-SPF, fêmeas com 30 dias. Protocolo do Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP): 1117-1;

- Ratos albinos, linhagem *Wistar*, machos adultos, 210-250g. Protocolo do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar): 003/2011.

MÉTODOS

3.2.1. Estudo de solubilidade do praziquantel em diferentes lipídeos

A solubilidade do praziquantel em oito diferentes lipídeos (ácido esteárico, behenato de glicerila, glicerídeos de coco hidrogenados, monoestearato de glicerila 40 – 55 %, monoestearato de glicerila > 90 %, palmitato de cetila, palmitoestearato de glicerila e triestearato de glicerila) foi avaliada pela mistura do fármaco em concentrações crescentes (1, 5, 10 e 15 %) com o lipídeo fundido a temperatura de 90 °C, com agitação manual. A solubilidade foi determinada visualmente, observando a presença ou ausência de cristais do fármaco, a cada 15 min pelo período de 1 h a 90 °C (SOUTO *et al.*, 2005).

3.2.2. Desenvolvimento das nanopartículas lipídicas sólidas

O desenvolvimento das nanopartículas lipídicas sólidas foi baseado na metodologia descrita por Martins e colaboradores (2009), com algumas modificações. O lipídeo foi aquecido a aproximadamente 90 °C (para sua completa fusão) e a solução aquosa de tensoativo foi aquecida à mesma temperatura da fase lipídica, em béquer separado. Então, a fase aquosa foi vertida na fase lipídica e homogeneizada com o auxílio de um Ultra-Turrax, na velocidade de 8000 rpm durante 10 min a 90 °C. A solidificação das SLN foi obtida dispersando esta emulsão formada em água gelada (0 °C) a 3400 rpm em Ultra-Turrax durante 1 min. Após este tempo, a dispersão de SLN foi deixada em repouso em banho de gelo por 5 min e armazenadas a 4 °C ou em temperatura ambiente. Na preparação das SLN contendo o fármaco, a incorporação do PZQ foi feita na fase lipídica utilizando a mesma abordagem experimental descrita anteriormente.

Os lipídeos utilizados no preparo das SLN foram escolhidos a partir do ensaio de solubilidade do PZQ e são eles, o ácido esteárico (SA) e o monoestearato de glicerila 40 – 55 % (GMS) e como tensoativo, foi utilizado o TegoCare[®] 450 (T-450)

ou o Poloxamer 188 (P-188). A composição final das SLN desenvolvidas está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição das nanopartículas lipídicas sólidas contendo os diferentes lipídeos e tensoativos (%).

(continua)

Formulações	Composição (%)					
	SA	GMS	P-188	T-450	PZQ	Água q.s.p.
TA1	5,00	-	-	1,2	-	100
TA1-PZQ15	4,25	-	-	1,2	0,75	100
TA1-PZQ10	4,50	-	-	1,2	0,50	100
TA1-PZQ5	4,75	-	-	1,2	0,25	100
TA2	5,00	-	-	1,5	-	100
TA2-PZQ15	4,25	-	-	1,5	0,75	100
TA2-PZQ10	4,50	-	-	1,5	0,50	100
TA2-PZQ5	4,75	-	-	1,5	0,25	100
TA3	5,00	-	-	1,8	-	100
TA3-PZQ15	4,25	-	-	1,8	0,75	100
TA3-PZQ10	4,50	-	-	1,8	0,50	100
TA3-PZQ5	4,75	-	-	1,8	0,25	100
TI1	-	5,00	-	1,2	-	100
TI1-PZQ15	-	4,25	-	1,2	0,75	100
TI1-PZQ10	-	4,50	-	1,2	0,50	100
TI1-PZQ5	-	4,75	-	1,2	0,25	100
TI2	-	5,00	-	1,5	-	100
TI2-PZQ15	-	4,25	-	1,5	0,75	100
TI2-PZQ10	-	4,50	-	1,5	0,50	100

Tabela 3 - Composição das nanopartículas lipídicas sólidas contendo os diferentes lipídeos e tensoativos (%).

(conclusão)

Formulações	Composição (%)					
	SA	GMS	P-188	T-450	PZQ	Água q.s.p.
TI2-PZQ5	-	4,75	-	1,5	0,25	100
TI3	-	5,00	-	1,8	-	100
TI3-PZQ15	-	4,25	-	1,8	0,75	100
TI3-PZQ10	-	4,50	-	1,8	0,50	100
TI3-PZQ5	-	4,75	-	1,8	0,25	100
PI1	-	5,00	1,0	-	-	100
PI1-PZQ15	-	4,25	1,0	-	0,75	100
PI1-PZQ10	-	4,50	1,0	-	0,50	100
PI1-PZQ5	-	4,75	1,0	-	0,25	100
PI2	-	5,00	1,5	-	-	100
PI3	-	5,00	2,0	-	-	100
PA1	5,00	-	1,0	-	-	100
PA1-PZQ15	4,25	-	1,0	-	0,75	100

3.2.3. Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas sólidas

3.2.3.1. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersidade das nanopartículas lipídicas sólidas

O diâmetro médio e o índice de polidispersidade das diferentes SLN foram determinados através da técnica de espalhamento de luz com comprimento de onda de 633 nm (*Dynamic Light Scattering*), também denominada espectroscopia de correlação de fótons (PCS; Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK-Malvern) a 25 °C sob um ângulo de 173°. Todas as amostras foram diluídas com Água Milli-Q

antes da medida. As medidas foram feitas em triplicata com 10 determinações de diâmetro médio para cada uma delas.

3.2.3.2 Determinação do potencial zeta das nanopartículas lipídicas sólidas

O potencial zeta das SLN foi determinado através da mobilidade eletroforética das partículas. As análises foram realizadas em Analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments acoplado a um MPT – Multi Purpose Titrator.

A medida efetuada por este equipamento é baseada no “efeito de Doppler”, ou seja, na alteração da frequência sofrida pela luz dispersa por uma partícula em movimento. Como a frequência da luz é elevada, a alteração desta pode ser medida com a utilização de barras de interferência causadas pelo cruzamento de dois raios laser originados de uma mesma fonte. As partículas então interagem com as barras, causando a dispersão da luz, que é medida por um fotomultiplicador focado para o ponto de confluência dos lasers. A contagem dos fótons permite a elaboração de um espectro de frequência a partir do qual o potencial zeta das partículas pode ser calculado.

Para a realização das medidas do potencial zeta, as amostras foram dispersas em Água Milli'Q, analisadas em triplicatas e foram feitas 10 determinações de potencial zeta para cada uma delas, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios padrões.

3.2.3.3. Avaliação morfológica das nanopartículas lipídicas sólidas por Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises foram medidas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 7500F em modo Alto Vácuo. O estudo foi feito após secagem da amostra em temperatura ambiente (25 °C), que foi colocada sobre pino de alumínio e fixada em cola de carbono. Seguidamente, tornou-se a amostra condutora por deposição de uma camada de ouro.

3.2.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Foi utilizado um módulo DSC 1 STAR[®] da Mettler Toledo capaz de operar de 100 a 450 °C, acoplado à um módulo de resfriamento por N₂ (IntraCooler), empregando precisão e exatidão de temperatura igual à ± 0,02 °C e ± 0,2 °C, respectivamente. A calibração do sistema foi realizada com padrões de Índio e Zinco, conforme as recomendações fornecidas pelo fabricante.

As curvas DSC foram obtidas em atmosfera de N₂ (50 mL min⁻¹). Como suporte de amostra, foi empregado um cadinho de alumínio sem tampa e como referência um similar vazio. A massa da amostra foi da ordem de 4,00 mg. As razões de aquecimento e resfriamento utilizadas foram de 10 °C min⁻¹. Convencionalmente adotou-se como exotérmico a disposição dos picos indicados no sentido ascendente. Neste estudo, a investigação do comportamento térmico das amostras seguiu o seguinte procedimento: aquecimento entre 25 °C a 160 °C, seguido de resfriamento até -50 °C e posterior reaquecimento até 160 °C.

As amostras analisadas por DSC foram as matérias-primas SA, PZQ e P-188, misturas físicas binárias (SA/PZQ, PZQ/P-188) e formulações PA1 e PA1-PZQ15.

O índice de recristalização (RI) das SLN, expresso como porcentagem, foi calculado a partir da equação 1, em que ΔH representa a entalpia de fusão (J g⁻¹) (FREITAS; MÜLLER, 1999):

$$RI (\%) = \frac{\Delta H_{SLN}}{\Delta H_{matéria-prima} \times concentração_{fase\ lipídica}} \times 100 \quad (1)$$

3.2.3.5. Determinação da eficiência de encapsulação e capacidade de carga

3.2.3.5.1. Separação entre fármaco livre e fármaco encapsulado

A eficiência de encapsulação (EE) da formulação PA1-PZQ15 foi determinada por CLAE pela medida da concentração do PZQ livre no meio aquoso das dispersões de SLN após ultracentrifugação. Aproximadamente 1,0 g da dispersão foi centrifugada a 35000 g durante 1 h a 4 °C.

3.2.3.5.2. Metodologia analítica para determinação do praziquantel por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A concentração de PZQ nas dispersões de SLN foi determinada por CLAE utilizando coluna com fase estacionária de octadecilsílica – C₁₈ (250 x 4,6 mm), tamanho de partícula – 5 µm (ACE 5[®]).

Foi construída a curva analítica do PZQ em água. A partir de solução estoque de 1 mg mL⁻¹ de PZQ em metanol, foram preparadas diluições correspondentes às concentrações de 20 – 100 µg mL⁻¹. Cada concentração foi preparada em triplicata e as soluções resultantes foram filtradas em membranas de acetato de celulose (Millipore[®]) com poros de 0,22 µm de diâmetro e analisadas por CLAE.

A detecção do PZQ foi feita em UV com comprimento de onda de 262 nm utilizando solução de ácido fórmico 5%:metanol (30:70, v/v) como fase móvel (YANG *et al.*, 2009), fluxo de 1 mL min⁻¹, volume de injeção de 50 µL e tempo de corrida de 10 min. A aquisição dos dados foi feita utilizando o software cromatográfico Chromeleon Chromatography Management System (CMS).

3.2.3.5.3. Eficiência de encapsulação e Capacidade de carga

A eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (LC) foram subsequentemente calculadas a partir das equações 2 e 3 (ADITYA *et al.*, 2010):

$$EE (\%) = \frac{\text{quantidade de PZQ encapsulado}}{\text{quantidade total teórica de PZQ adicionado às SLN}} \times 100 \quad (2)$$

$$LC (\%) = \frac{\text{quantidade de PZQ encapsulado}}{\text{quantidade total de lipídeo}} \times 100 \quad (3)$$

A quantidade de PZQ encapsulado nas SLN foi calculada pela subtração da quantidade de PZQ livre na fase aquosa a partir da quantidade de PZQ adicionado às SLN.

3.2.3.6. Espalhamento de Raio-X a Baixo ângulo (SAXS)

A nanoestrutura das formulações PA1 e PA1-PZQ15 foi analisada por espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS). As medidas de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo, Brasil. O comprimento de onda utilizado foi de 1,488 Å. A distância amostra-detector utilizada abrangeu um vetor de espalhamento (q) variando de 0,20 a 6,0 nm⁻¹ e utilizou-se um detector bidimensional Pilatus. As amostras foram colocadas em uma célula a 25 °C entre duas folhas de kapton.

O espalhamento parasita do ar e das fendas foi subtraído da intensidade total espalhada. As curvas resultantes foram normalizadas levando em conta os efeitos do decaimento natural, da intensidade da fonte de radiação síncrotron, da sensibilidade do detector e da transmitância. Cada padrão de SAXS corresponde a um tempo de coleta de dados de 5 s. Behenato de prata em pó foi utilizado como padrão para calibrar a distância amostra-detector, a inclinação do detector e a posição do feixe direto.

3.2.4. Avaliação da estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel

3.2.4.1. Estabilidade das SLN-PZQ frente ao armazenamento a 4 °C ou em temperatura ambiente

A estabilidade física da formulação PA1-PZQ15 foi avaliada através de medidas de diâmetro médio, potencial zeta e eficiência de encapsulação após armazenamento da amostra a 4 °C ou em temperatura ambiente após um período de 60 dias.

3.2.4.2. Estabilidade das SLN-PZQ frente ao processo de liofilização com e sem crioprotetor

Aproximadamente 5,0 g da formulação PA1-PZQ15 foram colocadas em um frasco e congeladas sem crioprotetor e com glicerol (1:1, *m/m*). Cada frasco foi congelado a -20 °C e então as amostras foram liofilizadas durante 48 h utilizando

uma bomba de vácuo acompanhada por um condensador de vapor ($-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 184 mT). Após a liofilização, a formulação PA1-PZQ15 foi reconstituída em água Milli'Q na mesma proporção utilizada anteriormente e agitada em vortex para rehidratação e em sonicador de ponta. O diâmetro médio, potencial zeta e a eficiência de encapsulação foram determinados como descrito acima para as suspensões de nanopartículas lipídicas não liofilizadas.

3.2.5. Avaliação, *in vitro*, da absorção intestinal do praziquantel 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 da formulação lipídica na eficiência do transporte de PZQ através da membrana intestinal. Ratos machos adultos (210 – 250 g), mantidos em jejum por 8h, foram anestesiados com éter e o intestino delgado foi imediatamente dissecado, lavado com solução TC 199 a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e colocado em meio de cultura para tecido (TC 199) na mesma temperatura e oxigenado ($\text{O}_2:\text{CO}_2 - 95:5$). O intestino foi então cuidadosamente invertido a partir da primeira porção do duodeno com auxílio de uma haste flexível (~ 2,5 mm 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 foram adicionadas as diferentes formulações contendo PZQ (PZQ disperso em TC 199 e PA1-PZQ15). A incubação foi realizada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 (CINTO *et al.*, 2009).

3.2.5.1. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas com auxílio do Microsoft Excel 2007 e para tanto, foi

utilizada a Análise da Variância (ANOVA), considerando estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $P \leq 0,05$.

3.2.6. Estudo do efeito das SLN em *S. mansoni* in vitro

Os testes *in vitro* foram realizados no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp. A linhagem de *S. mansoni* utilizada foi a BH (oriunda de Belo Horizonte, MG).

Após 45 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados, por meio de deslocamento cervical, e os parasitas adultos de *Schistosoma mansoni* foram recuperados através da perfusão do sistema porta-hepático. Os casais de parasitas foram mantidos em meio RPMI 1640 a 37 °C com 5% CO₂, penicilina (1000 UI mL⁻¹) e estreptomicina (1000 µg mL⁻¹), sendo incubados com PA1 e PA1-PZQ15 em duas concentrações diferentes (25 µg mL⁻¹ e 50 µg mL⁻¹ de PZQ e volume equivalente de SLN). O grupo controle foi incubado com meio RPMI 1640.

As amostras foram aplicadas em 5 réplicas para cada concentração, diretamente sobre os vermes adultos de *S. mansoni*. Os parasitas adultos de *S. mansoni* foram distribuídos em placas de cultura com 24 poços, a fim de avaliar seu efeito na sobrevivência, motilidade, oviposição, separação dos casais e danos tegumentares.

Foram realizadas cinco observações em microscópio óptico invertido. A primeira observação logo após colocar todos os casais em seus respectivos poços, e as demais foram realizadas durante as primeiras seis horas do experimento, em um intervalo de duas em duas horas e após 24, 48 e 72 h.

3.2.7. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel em células HepG2

3.2.7.1. Cultura celular

Células HepG2 (ATCC nº HB-8065; isoladas a partir de carcinoma hepatocelular humano) disponíveis no Laboratório de Cultura Celular do Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas da Universidade de

Trás-os-Montes e Alto Douro (CITAB, UTAD), Vila Real, Portugal, foram rotineiramente cultivadas em meio de cultura completo contendo meio base *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM sem L-glutamina) suplementado com 2 mM de L-glutamina, antibióticos (200 U mL⁻¹ penicilina e 200 µg mL⁻¹ estreptomicina) e 10 % de soro fetal bovino e incubadas em uma atmosfera umidificada de 5 % de CO₂/95 % de ar a 37 °C, em frascos de cultura ventilados. Em confluência (próximo de 80 – 90 %), as células HepG2 foram subcultivadas por tripsinização (0,05 % Tripsina-EDTA), de forma a evitar uma diminuição do índice mitótico e mesmo a morte celular (PHELAN, 2007; WILLARD; MERRITT; DEAN, 1965).

3.2.7.2. Tratamento das células

Células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços a uma densidade de 5 x 10⁴ células/mL (5000 células/poço) e incubadas por 24 h com meio completo para restabelecimento das condições. Após as 24 h de cultura, o meio foi removido e substituído por 100 µL de meio de cultura sem soro suplementado com as diferentes substâncias a serem testadas (PZQ solubilizado em etanol, etanol puro, PA1 e PA1-PZQ15), nas concentrações de 30, 60 e 120 µg mL⁻¹ ou por meio de cultura sem soro (controle).

3.2.7.3. Ensaio de citotoxicidade utilizando Alamar Blue[®]

Para avaliar a proliferação e a viabilidade celular, utilizou-se o indicador Alamar Blue[®]. É um teste simples e rápido, em que 10 % da solução disponível comercialmente deste corante é adicionada ao meio de cultura e as medidas são realizadas tanto por colorimetria ou fluorimetria. O Alamar Blue[®] oxidado, azul, não-fluorescente é reduzido, no meio, a um corante rosa fluorescente por atividade celular. O Alamar Blue[®] é captado pelas células ativas e é reduzido por uma das oxiredutases da cadeia respiratória, daí que seja um indicador direto da atividade mitocondrial da célula. Há uma correlação direta entre a redução do Alamar Blue[®] no meio de crescimento e a quantidade/proliferação de organismos vivos, desde as bactérias às células de mamíferos (O'BRIEN *et al.*, 2000).

Após 24 h de incubação da placa com as substâncias, adicionou-se 10 µL/poço de uma solução de Alamar Blue[®] seguida por um período de incubação de 1 h (37 °C, 5 % de CO₂, 95 % de umidade) antes da primeira medida de absorvância aos comprimentos de onda de 570 nm (forma reduzida) e 620 nm (forma oxidada). A placa foi incubada, no total, por 7 dias. Devido à sobreposição no espectro de absorção da forma oxidada e reduzida do Alamar Blue[®], a porcentagem de redução do AlamarBlue[®] foi medida empregando a equação 4 derivada por Willard, Merritt e Dean (1965), e fornecida pelo fabricante (LARSON *et al.*, 1997):

$$\% \text{ de Redução do AlamarBlue}^{\circledR} = \frac{\epsilon_{oxid620nm} (A_{570nm}) - \epsilon_{oxid570nm} (A_{620nm})}{\epsilon_{red570nm} (A'_{620nm}) - \epsilon_{red620nm} (A'_{570nm})} \times 100 \quad (4)$$

em que: $\epsilon_{oxid620nm}$ = Coeficiente de extinção molar do AlamarBlue[®] na forma oxidada a 620 nm; $\epsilon_{oxid570nm}$ = Coeficiente de extinção molar do AlamarBlue[®] na forma oxidada a 570 nm; $\epsilon_{red570nm}$ = Coeficiente de extinção molar do AlamarBlue[®] na forma reduzida a 570 nm; $\epsilon_{red620nm}$ = Coeficiente de extinção molar do AlamarBlue[®] na forma reduzida a 620 nm; A_{570nm} = Absorvância dos poços testados a 570 nm; A_{620nm} = Absorvância dos poços testados a 620 nm; A'_{620nm} = Absorvância dos poços de controle negativo a 620 nm; A'_{570nm} = Absorvância dos poços de controle negativo a 570 nm.

RESULTADOS

4.1. Estudo de solubilidade do praziquantel em diferentes lipídeos

O estudo de solubilidade do praziquantel nos diferentes lipídeos foi realizado para selecionar os lipídeos adequados para desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas com alta capacidade de encapsulação do praziquantel e tamanho de partícula menor que 1000 nm.

A Tabela 4 apresenta os resultados de solubilidade de 1 % de PZQ em oito diferentes lipídeos. Após 60 min, observou-se que o PZQ se solubilizou totalmente em cinco diferentes lipídeos, sendo eles ácido esteárico, monoestearato de glicerila 40 – 55 %, monoestearato de glicerila > 90 %, palmitoestearato de glicerila e glicerídeos de coco hidrogenados, sendo este último descartado devido à demora na solubilização do fármaco.

Tabela 4 - Estudo de solubilidade utilizando 1 % de praziquantel.

Lipídeos utilizados	15min	30min	45min	60min
Ácido esteárico	+	+	+	+
Behenato de glicerila	-	-	-	-
Glicerídeos de coco hidrogenados	-	-	-	+
Monoestearato de glicerila 40 – 55 %	-	+	+	+
Monoestearato de glicerila > 90 %	+	+	+	+
Palmitato de cetila	-	-	-	-
Palmitoestearato de glicerila	-	+	+	+
Triestearato de glicerila	-	-	-	-

(+): Solúvel; (-): Presença de cristais de PZQ

A Tabela 5 apresenta a solubilidade de 5 % de PZQ nos quatro lipídeos escolhidos anteriormente. Observa-se que o ácido esteárico foi o lipídeo que

solubilizou o PZQ mais rapidamente (logo após 15 min), enquanto que os outros três lipídeos só solubilizaram o PZQ após 45 min.

Tabela 5 - Estudo de solubilidade utilizando 5 % de praziquantel.

Lipídeos utilizados	15min	30min	45min	60min
Ácido esteárico	+	+	+	+
Monoestearato de glicerila 40 – 55 %	-	-	+	+
Monoestearato de glicerila > 90 %	-	-	+	+
Palmitoestearato de glicerila	-	-	+	+

(+): Solúvel; (-): Presença de cristais de PZQ

Assim, a concentração de PZQ foi aumentada para 10 % e verificou-se o mesmo comportamento observado para a concentração de 5 % de fármaco (Tabela 6).

Tabela 6 - Estudo de solubilidade utilizando 10 % de praziquantel.

Lipídeos utilizados	15min	30min	45min	60min
Ácido esteárico	+	+	+	+
Monoestearato de glicerila 40 – 55 %	-	-	+	+
Monoestearato de glicerila > 90 %	-	-	+	+
Palmitoestearato de glicerila	-	-	+	+

(+): Solúvel; (-): Presença de cristais de PZQ

Com o aumento da concentração de PZQ para 15 % (Tabela 7), observou-se que o ácido esteárico, o monoestearato de glicerila 40 – 55 % e o monoestearato de glicerila > 90 % solubilizaram o fármaco em tempos crescentes, após 30, 45 e 60 min, respectivamente, além de ter sido observada a presença de cristais de PZQ na presença de palmitoestearato de glicerila.

Tabela 7 - Estudo de solubilidade utilizando 15 % de praziquantel.

Lipídeos utilizados	15min	30min	45min	60min
Ácido esteárico	-	+	+	+
Monoestearato de glicerila 40 – 55 %	-	-	+	+
Monoestearato de glicerila > 90 %	-	-	-	+
Palmitoestearato de glicerila	-	-	-	-

(+): Solúvel; (-): Presença de cristais de PZQ

Deste modo, devido à solubilização mais rápida do PZQ no ácido esteárico (SA) e monoestearato de glicerila 40 – 55 % (GMS), estes lipídeos foram os selecionados para o desenvolvimento das nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel.

4.2. Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas sólidas

4.2.1. Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas lipídicas sólidas

A Tabela 8 apresenta os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta das SLN desenvolvidas.

Tabela 8 - Diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das SLN desenvolvidas.

(continua)

Formulações	Diâmetro Médio (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
TA1	367,9 ± 10,2	0,350 ± 0,017	-46,4 ± 0,7
TA2	316,0 ± 6,3	0,265 ± 0,005	-54,7 ± 0,2
TA3	374,0 ± 6,3	0,419 ± 0,021	-50,5 ± 1,5
TI1	167,5 ± 0,4	0,203 ± 0,008	-42,0 ± 2,3
TI2	204,4 ± 2,1	0,263 ± 0,013	-45,9 ± 1,4

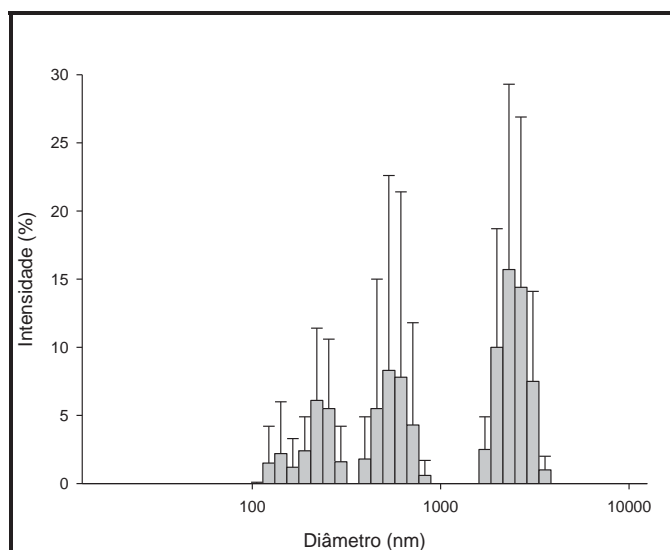
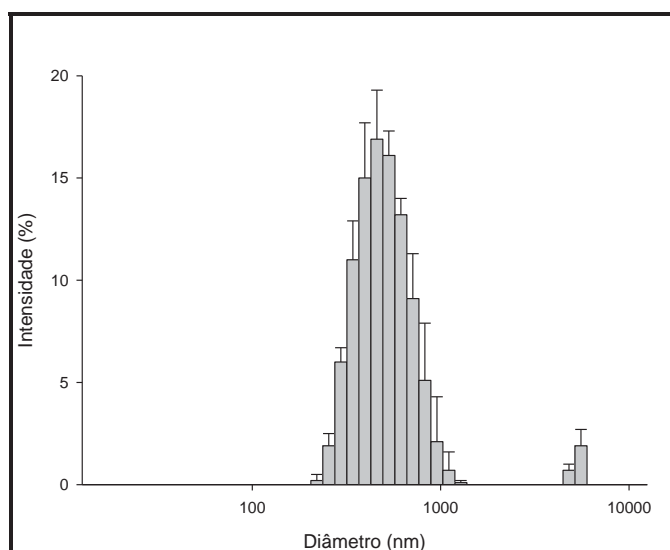
Tabela 8 - Diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das SLN desenvolvidas.

(conclusão)

Formulações	Diâmetro Médio (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
TI3	224,6 ± 2,9	0,380 ± 0,010	-43,8 ± 1,1
PI1	318,4 ± 13,4	0,486 ± 0,060	-28,6 ± 1,6
PI1-PZQ15	1735,7 ± 387,1	1,00 ± 0,0	-31,1 ± 1,1
PA1	396,8 ± 2,8	0,156 ± 0,036	-33,5 ± 0,4
PA1-PZQ15	505,6 ± 27,2	0,264 ± 0,044	-34,0 ± 1,1

A incorporação do PZQ nas SLN só foi possível nas nanopartículas preparadas com Poloxamer 188 como tensoativo, na concentração de 1 %. O TegoCare[®] 450 não foi capaz de estabilizar o sistema contendo PZQ, levando a formação de creme (quando se utiliza SA como fase oleosa) ou separação de fase (quando a fase oleosa utilizada foi o GMS).

O diâmetro médio obtido para as formulações PI1-PZQ15 e PA1-PZQ15 estão apresentadas nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Observa-se que a incorporação de PZQ na formulação PI1 levou a um aumento no diâmetro médio das partículas, além de apresentar um comportamento multimodal com alto índice de polidispersidade. Já as PA1-PZQ15 apresentaram um comportamento praticamente unimodal, com baixo índice de polidispersidade, o que indica uma homogeneidade da dispersão.

Figura 4 - Diâmetro da formulação PI1-PZQ15.**Figura 5** - Diâmetro da formulação PA1-PZQ15.

A maioria das partículas em contato com um líquido adquire uma carga elétrica na sua superfície. Este potencial elétrico é chamado de potencial zeta e é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (HEURTAULT *et al.*, 2003; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A medida de potencial zeta pode ser utilizada para prever a estabilidade físico-química de suspensões e emulsões coloidais. As Figuras 6 e 7 apresentam os gráficos de potencial zeta obtidos para as formulações PI1-PZQ15 e PA1-PZQ15, respectivamente.

Figura 6 - Potencial zeta da formulação PI1-PZQ15.

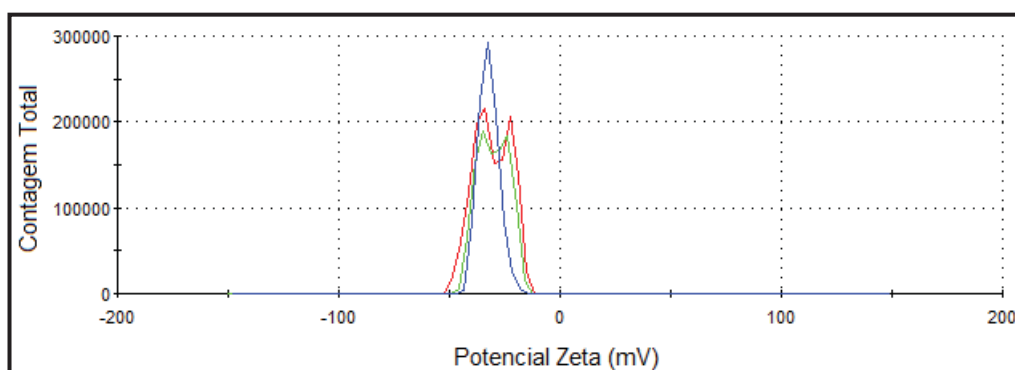
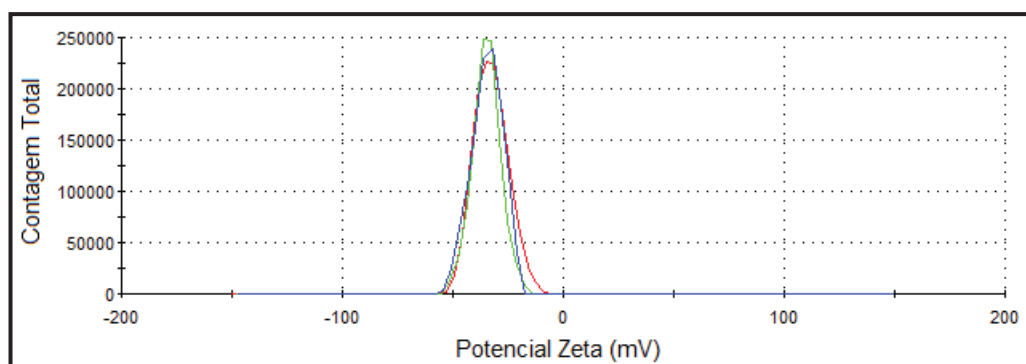


Figura 7 - Potencial zeta da formulação PA1-PZQ15.



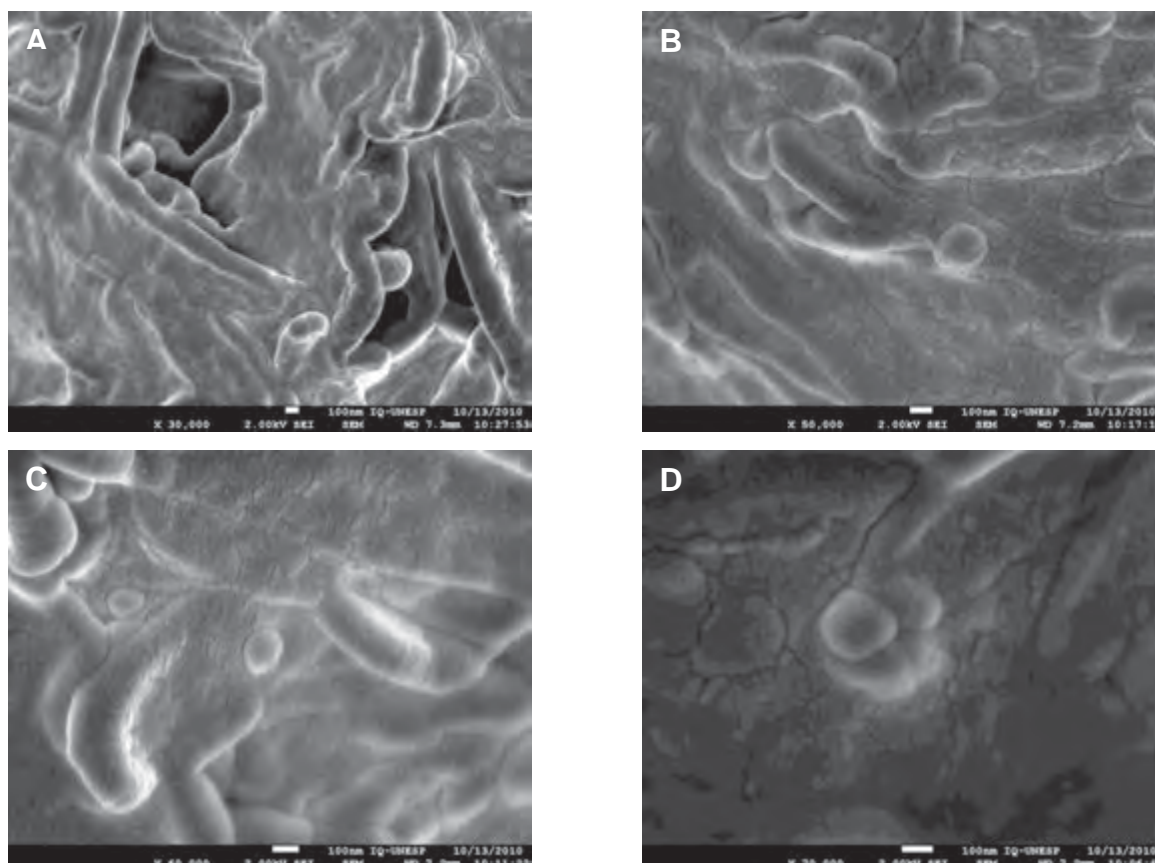
A partir destes resultados, a formulação PA1-PZQ15 foi a selecionada para ser utilizada nos testes seguintes por ser uma dispersão homogênea, apresentando diâmetro médio na escala nanométrica e um alto valor de potencial zeta.

4.2.2. Avaliação morfológica das SLN por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada a fim de verificar a morfologia das SLN preparadas. Observa-se na Figura 8 que as nanopartículas

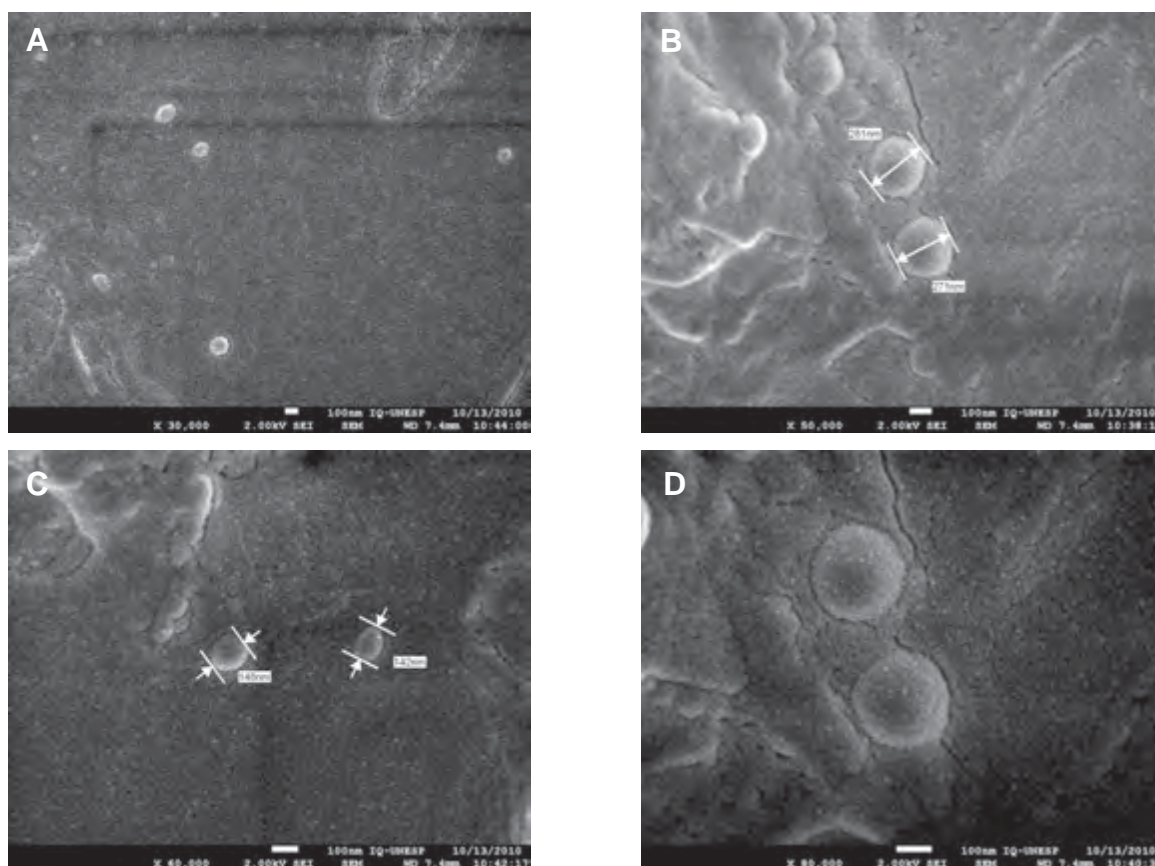
lipídicas sólidas sem fármaco (PA1) são heterogêneas, apresentando tanto formas alongadas (bastonetes) quanto a forma esférica.

Figura 8 - Fotomicrografias da formulação PA1. (A) Aumento de 30000 x; (B) Aumento de 50000 x; (C) Aumento de 60000 x; (D) Aumento de 70000 x.



Ao contrário da formulação PA1, quando o PZQ é incorporado às nanopartículas lipídicas sólidas (PA1-PZQ15), observa-se uma maior homogeneidade de partículas esféricas, sugerindo que o PZQ age como um nucleador das SLN (Figura 9).

Figura 9 - Fotomicrografias da formulação PA1-PZQ15. (A) Aumento de 30000 x; (B) Aumento de 50000 x; (C) Aumento de 60000 x; (D) Aumento de 80000 x.



4.2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

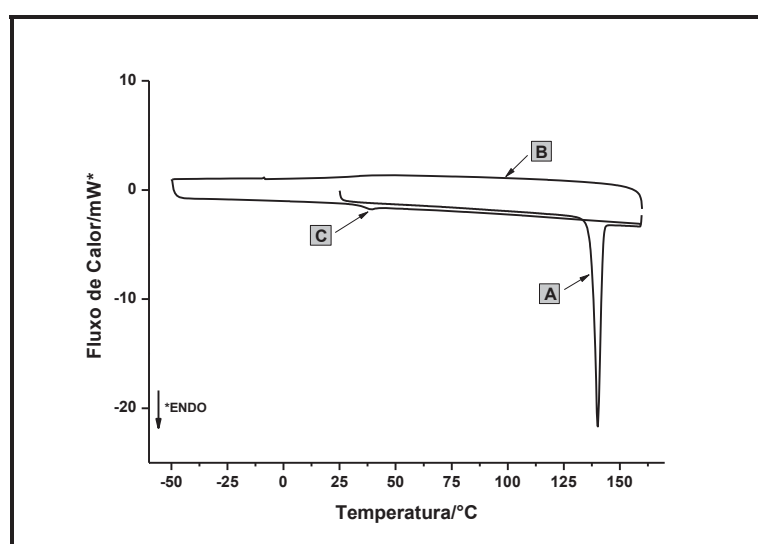
DSC é uma técnica muito importante na caracterização de SLN, pois fornece informação sobre o estado físico e o grau de cristalinidade da amostra através do comportamento térmico. Esta ferramenta também é importante para avaliar os principais parâmetros de processo utilizados na obtenção de SLN, uma vez que o lipídeo e o fármaco são aquecidos e depois desta mistura ser dispersa em uma solução quente contendo tensoativo sob agitação, ser resfriada a 0 °C para recristalização do lipídeo e formação das SLN.

Baseado no processo de produção das nanopartículas, as amostras foram aquecidas, resfriadas e reaquecidas uma segunda vez para avaliar modificações durante o processo de produção das SLN.

As Figuras 10 – 18 apresentam as curvas DSC obtidas para as matérias-primas SA, PZQ e P-188, misturas físicas binárias e formulações PA1 e PA1-PZQ15.

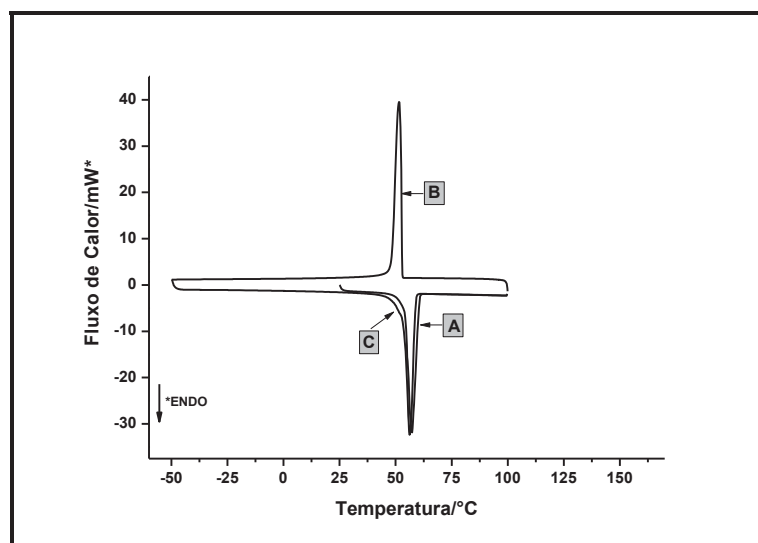
Na Figura 10 pode-se observar que a 1ª curva de aquecimento para a matéria-prima de PZQ apresenta um pico endotérmico agudo e bem pronunciado em 141,17 °C ($T_{\text{início}}$ igual a 137,69 °C), correspondente ao ponto de fusão da mistura racêmica do fármaco (CHAUD *et al.*, 2010), e indica sua natureza cristalina. O enantiômero levógiro (única forma com atividade esquistossomicida) apresenta ponto de fusão em torno de 110 °C (LIU *et al.*, 2004). A entalpia de fusão (ΔH) obtida para o 1º aquecimento foi de 90,80 J g⁻¹. No 2º aquecimento, não se observa nenhum pico de fusão, apenas uma transição vítrea (T_g) em 34,75 °C (transição de 2ª ordem) referente ao PZQ polimerizado em um estado amorfo.

Figura 10 - Curva DSC da matéria-prima PZQ. (A) 1º Aquecimento; (B) Resfriamento; (C) 2º Aquecimento.



A curva DSC da matéria-prima SA está apresentada na Figura 11. Observa-se que o lipídeo funde em 58,33 °C ($T_{\text{início}}$ igual a 54,33 °C) e apresenta um ΔH igual a 181,04 J g⁻¹. No reaquecimento, não há alterações significativas na temperatura de fusão (57,17 °C) e ambas temperaturas coincidem com o ponto de fusão do lipídeo (≥ 54 °C) (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006). Entretanto, a entalpia de fusão do 2º aquecimento foi reduzida (ΔH igual a 174,50 J g⁻¹) provavelmente devido a presença de impurezas na matéria-prima.

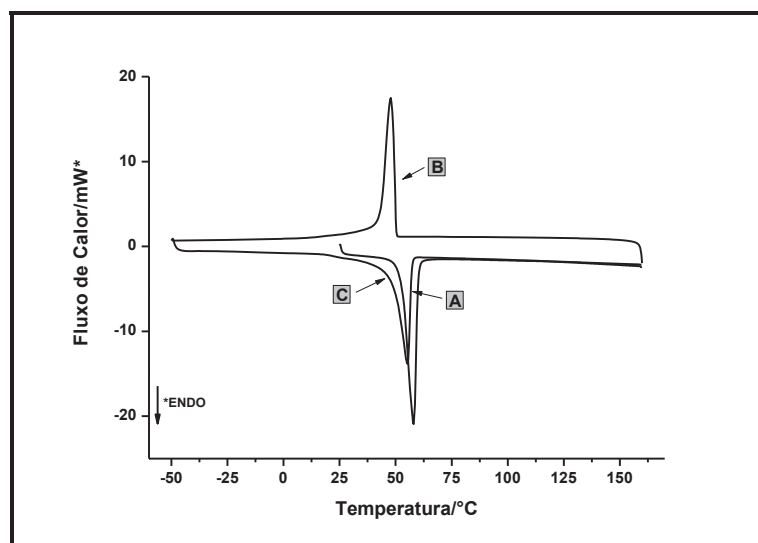
Figura 11 - Curva DSC da matéria-prima SA. (A) 1º Aquecimento; (B) Resfriamento; (C) 2º Aquecimento.



Na preparação das SLN-PZQ, o fármaco foi dissolvido no lipídeo fundido a 90 °C. Sendo assim, a análise por DSC da mistura binária de praziquantel e SA é de extrema importância a fim de avaliar uma possível diminuição do ponto de fusão do lipídeo e o caráter cristalino do fármaco incorporado. A razão de PZQ/SA foram similares àquelas da formulação final de SLN-PZQ.

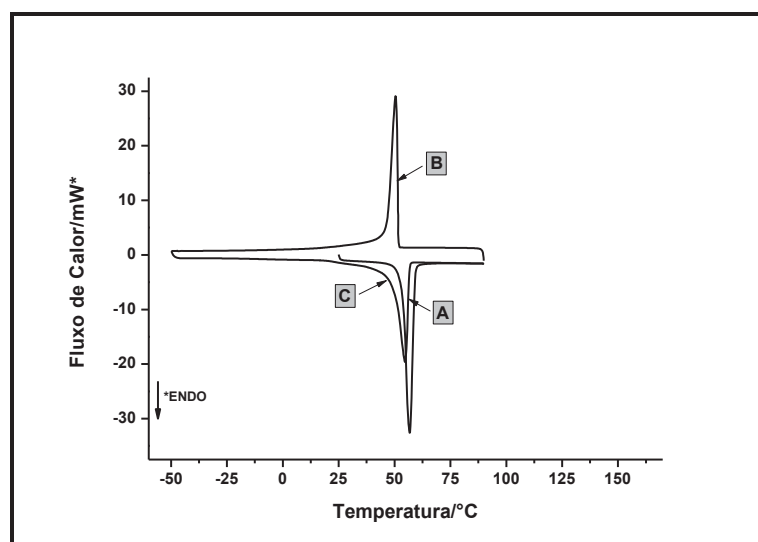
Observa-se apenas um pico endotérmico, tanto no 1º como no 2º aquecimento em 58,67 °C e 55,67 °C, respectivamente, referente a fusão do SA. Houve uma diminuição do ΔH obtido tanto no 1º aquecimento (140,31 J g⁻¹) como no 2º aquecimento (112,54 °C) em relação ao ΔH esperado (153,88 J g⁻¹). Esta redução na entalpia pode indicar um desarranjo na estrutura do lipídeo provocado pela presença do fármaco na forma amorfa. Na curva de resfriamento, observa-se um pico exotérmico em 47,14 °C referente a recristalização do lipídeo (Figura 12).

Figura 12 - Curva DSC para a mistura física binária SA/PZQ. (A) 1º Aquecimento; (B) Resfriamento; (C) 2º Aquecimento.



Como no desenvolvimento das nanopartículas lipídicas sólidas a temperatura máxima utilizada foi de 90 °C, analisou-se a interação entre SA e PZQ repetindo o DSC até esta temperatura (Figura 13).

Figura 13 - Curva DSC para a mistura física binária SA/PZQ aquecida até 90 °C. (A) 1º Aquecimento; (B) Resfriamento; (C) 2º Aquecimento.



Observa-se que não há diferenças significativas nos pontos de fusão e recristalização do SA. Entretanto, há um aumento da entalpia de fusão obtida em

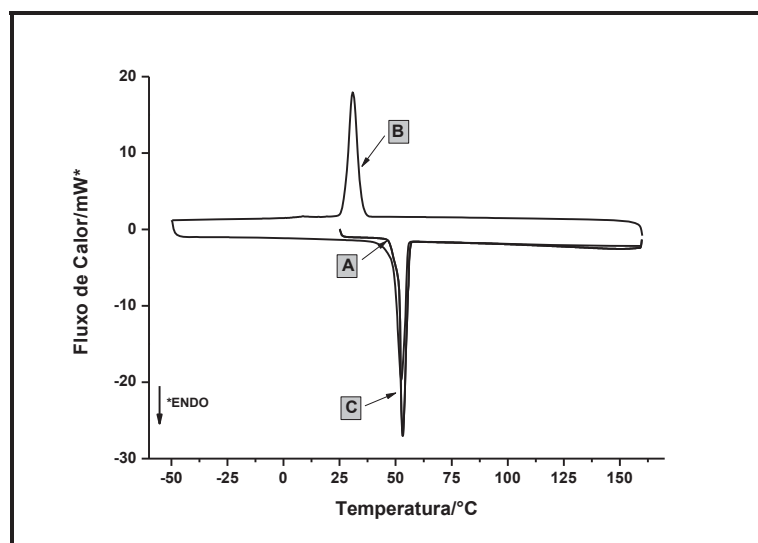
relação à esperada (Tabela 9), indicando uma forte interação entre o PZQ cristalino e o lipídeo, devido a necessidade de uma maior energia para se quebrar a rede cristalina formada.

Tabela 9 - Dados de DSC para a mistura binária SA/PZQ aquecida até 90 °C.

Parâmetros	1º Aquecimento	Resfriamento	2º Aquecimento
T _{início} (°C)	53,59	51,73	49,65
T _{pico} (°C)	57,67	49,67	55,17
ΔH obtido (J g ⁻¹)	173,01	136,74	135,60
ΔH esperado (J g ⁻¹)	153,88	148,03	148,32

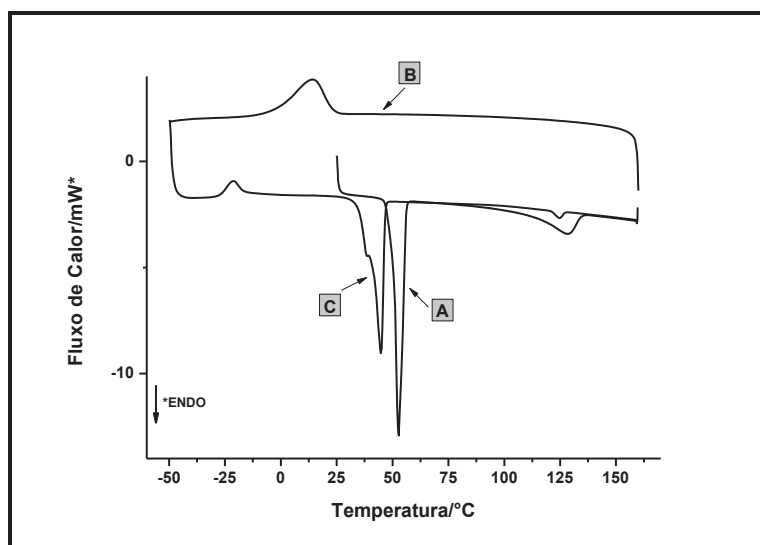
Outro componente utilizado no desenvolvimento das SLN é o tensoativo. A Figura 14 apresenta a curva DSC para a matéria-prima P-188. Pequenas diferenças foram vistas nas duas curvas de aquecimento, em que o pico endotérmico de fusão no 1º aquecimento foi na temperatura de 54 °C e no 2º foi em 53,17 °C, temperaturas que coincidem com o ponto de fusão do tensoativo (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006). Durante o resfriamento, a curva DSC apresentou um pico exotérmico em 31 °C, referente a recristalização do P-188. A redução na entalpia de fusão (ΔH no 1º aquecimento igual a 125,01 J g⁻¹ e ΔH no 2º aquecimento igual a 116,32 J g⁻¹) indica a presença de impurezas na matéria-prima.

Figura 14 - Curva DSC da matéria-prima P-188. (A) 1º Aquecimento; (B) Resfriamento; (C) 2º Aquecimento.



A análise por DSC da mistura física P-188/PZQ foi realizada para determinar a interação entre o fármaco e o tensoativo utilizado (Figura 15). Observa-se no 1º aquecimento a presença de dois picos endotérmicos, um em 53,17 °C e outro em 128,50 °C, correspondentes aos picos de fusão do P-188 e do PZQ, respectivamente. Durante o resfriamento, há o aparecimento de um pico exotérmico em 14 °C, referente à recristalização do P-188. No 2º aquecimento, aparece um pico exotérmico em -21,17 °C, que pode ser referente à cristalização de outra parte do P-188, além do aparecimento do pico endotérmico alargado em 38,33 °C referente a fusão do tensoativo e a presença do pico de fusão do PZQ em 124,67 °C. Houve uma redução na entalpia esperada e obtida (ΔH obtido no 1º aquecimento igual a 66,60 e 16,5 J g⁻¹ e ΔH esperado igual a 71,38 e 38,95 J g⁻¹). Estes resultados sugerem que há fraca interação entre o PZQ e o P-188 devido ao fármaco ser lipofílico e o tensoativo apresentar maior porção polar e, conseqüentemente, maior afinidade por água.

Figura 15 - Curva DSC para a mistura física binária PZQ/P-188. (A) 1º Aquecimento; (B) Resfriamento; (C) 2º Aquecimento.



Quando se repete a análise utilizando a temperatura máxima de 90 °C, temperatura anterior à fusão e polimerização do PZQ, não ocorre alteração dos pontos de fusão e recristalização do P-188 em relação à matéria-prima P-188 (Figura 16). Entretanto, há um aumento na entalpia de fusão obtida em relação a esperada (Tabela 10), sugerindo que o PZQ age como um nucleador das SLN quando está presente no estado cristalino.

Figura 16 - Curva DSC para a mistura física binária PZQ/P-188 aquecida até 90 °C. (A) 1º Aquecimento; (B) Resfriamento; (C) 2º Aquecimento.

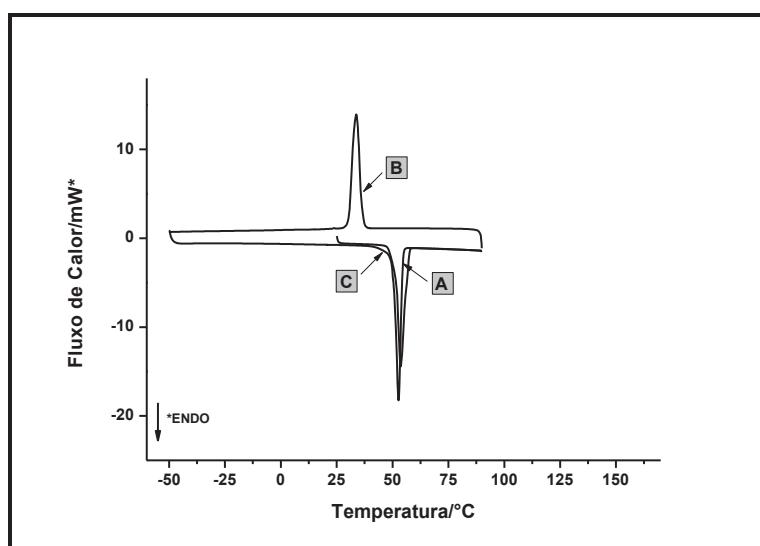


Tabela 10 - Dados de DSC para a mistura binária PZQ/P-188 aquecida até 90 °C.

Parâmetros	1º Aquecimento	Resfriamento	2º Aquecimento
T _{início} (°C)	51,17	36,47	50,33
T _{pico} (°C)	54,00	33,50	53,17
ΔH obtido (J g ⁻¹)	76,51	73,42	72,28
ΔH esperado (J g ⁻¹)	71,38	65,96	66,42

Embora a análise da mistura binária PZQ/P-188 seja importante para avaliar as possíveis interações entre o fármaco e tensoativo, esta condição não está relacionada com os parâmetros de processo utilizado na obtenção das SLN.

A Figura 17 apresenta a curva DSC para a formulação PA1. Observa-se a presença de dois picos endotérmicos no 1º e no 2º aquecimento, referentes à fusão do tensoativo e do lipídeo, respectivamente. A presença do pico de fusão do P-188 indica que não há interação entre o SA e o P-188.

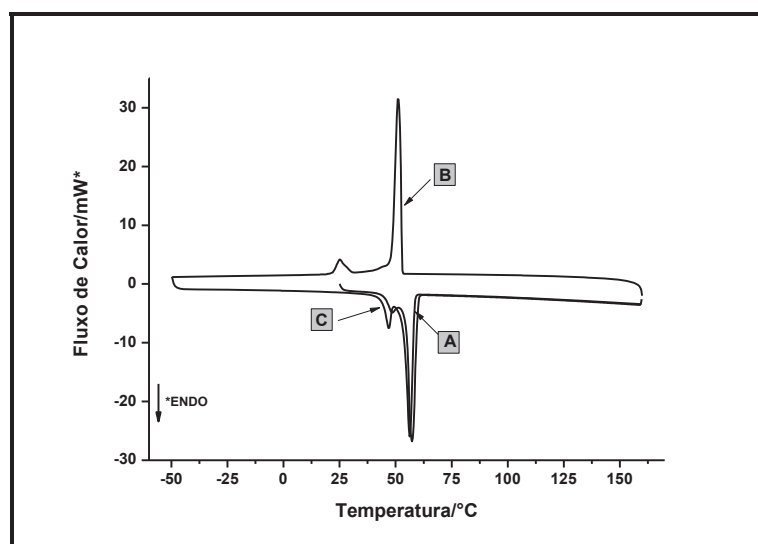
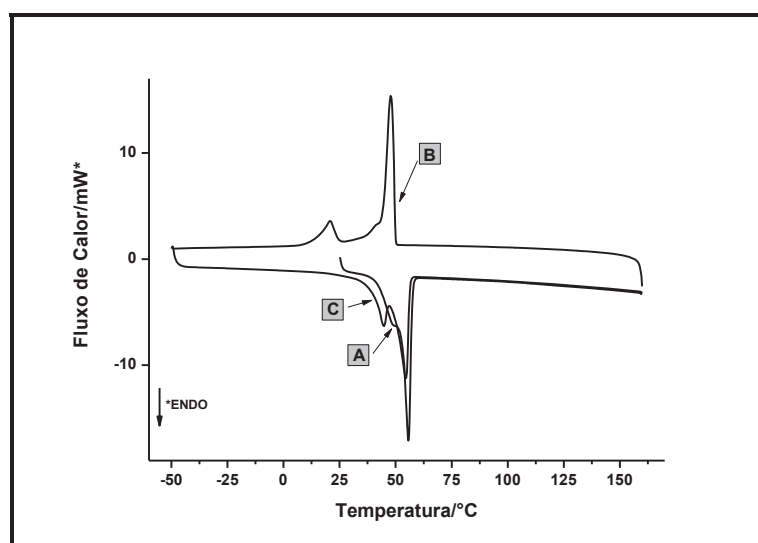
Figura 17 - Curva DSC para a formulação PA1. (A) 1º Aquecimento; (B) Resfriamento; (C) 2º Aquecimento.

Tabela 11 - Dados de DSC para a formulação PA1.

Parâmetros	1º Aquecimento	Resfriamento	2º Aquecimento
T _{início} (°C)	45,91 e 55,01	29,09 e 52,90	44,42 e 53,74
T _{pico} (°C)	48,33 e 58,17	25,00 e 50,17	47,00 e 57,17
ΔH obtido (J g ⁻¹)	125,64	14,48 e 127,88	17,38 e 104,07

A curva DSC para a formulação PA1-PZQ15 está representada na Figura 18. A ausência do pico de fusão do PZQ sugere que os cristais do fármaco solubilizaram no SA fundido, isto é, o fármaco está molecularmente disperso na matriz lipídica. Durante o resfriamento, ocorre a separação de fases, representado pela presença de dois picos exotérmicos de recristalização.

Figura 18 - Curva DSC para a formulação PA1-PZQ15. (A) 1º Aquecimento; (B) Resfriamento; (C) 2º Aquecimento.**Tabela 12** - Dados de DSC para a formulação PA1-PZQ15.

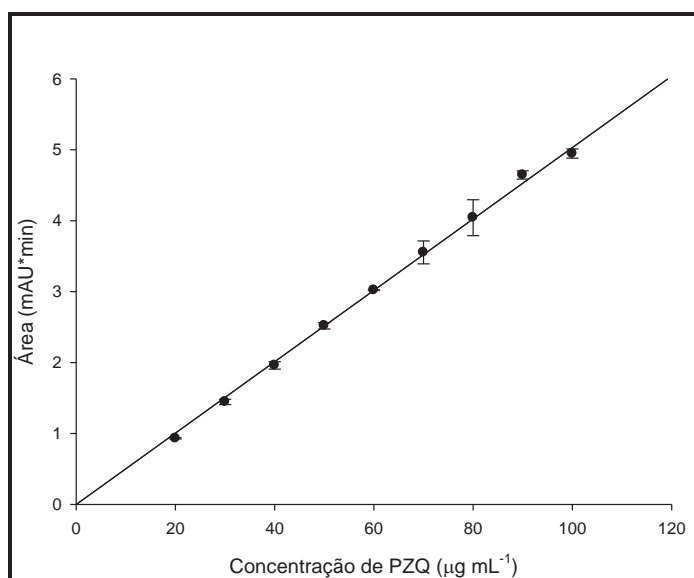
Parâmetros	1º Aquecimento	Resfriamento	2º Aquecimento
T _{início} (°C)	-	24,53 e 49,94	41,24 e 49,93
T _{pico} (°C)	48,70 e 56,17	20,67 e 47,00	44,83 e 55,00
ΔH obtido (J g ⁻¹)	123,94	21,14 e 88,03	11,23 e 48,02

4.2.4. Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (LC)

4.2.4.1. Metodologia analítica para determinação do PZQ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A linearidade do método de quantificação do PZQ por CLAE foi determinada através da construção da curva analítica do PZQ em água. As áreas médias dos picos do PZQ versus os dados de concentração foram tratados por regressão linear. O desvio padrão para a inclinação e o intercepto da curva analítica foi calculado. Nos estudos de linearidade, o critério de aceitação é um coeficiente de correlação de pelo menos 0,998, ou então a curva analítica é rejeitada (Figura 19).

Figura 19 - Curva analítica do PZQ em água, obtida por CLAE.



$$y = 0,0514x - 0,0787, \text{ coeficiente de correlação } (r) = 0,9992.$$

4.2.4.2. Eficiência de Encapsulação (EE) e Capacidade de Carga (LC)

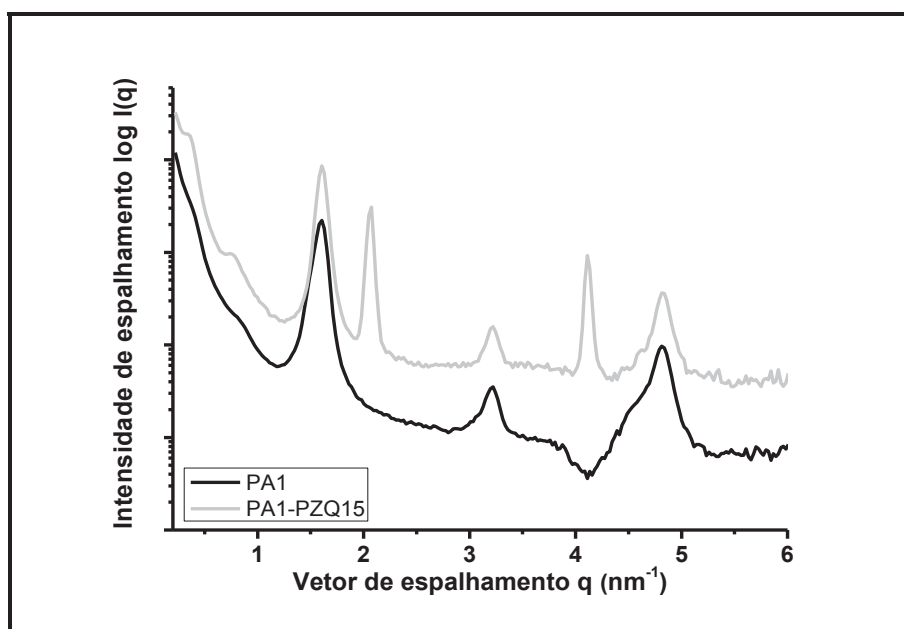
Após separação do fármaco livre do fármaco encapsulado empregando ultracentrifugação, o sobrenadante contendo o fármaco livre foi analisado e quantificado por CLAE. A área obtida foi aplicada na equação da reta da curva analítica, determinando-se a quantidade de fármaco livre e, através da equação 1 e 2, obteve-

se uma eficiência de encapsulação e capacidade de carga para as PA1-PZQ15 igual a $99,06 \% \pm 0,30 \%$ e $17,48 \% \pm 0,05 \%$, respectivamente.

4.2.5. Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS)

A Figura 20 apresenta as curvas de SAXS (logaritmo da intensidade de espalhamento ($\log I(q)$) em função do vetor de espalhamento (q)) obtidas para as amostras PA1 e PA1-PZQ15. Para a amostra PA1, a curva de SAXS apresenta três picos intensos localizados em $q = 1,61 \text{ nm}^{-1}$, $3,21 \text{ nm}^{-1}$ e $4,82 \text{ nm}^{-1}$. Os picos localizados em posições periódicas e com mesmo intervalo ($1,61 \text{ nm}^{-1}$) significam que as SLN preparadas com ácido esteárico tem uma estrutura lipídica lamelar. Resultados semelhantes foram obtidos por Lukowski e colaboradores (2000) e Maruyama e colaboradores (2001), que demonstraram por SAXS que lipídeos como palmitato de cetila e o ácido esteárico estão arranjados em uma estrutura lamelar.

Figura 20 - Curva de SAXS das amostras PA1 e PA1-PZQ15. O perfil de espalhamento é dominado por picos intensos igualmente espaçados de forma integral indicando a presença de lamelas unidimensionais com periodicidade d .



O mesmo perfil da curva de SAXS foi observado para a amostra PA1-PZQ15, entretanto, pode-se observar a presença de mais dois picos intensos localizados em $q = 2,1 \text{ nm}^{-1}$ e $4,2 \text{ nm}^{-1}$. Estes picos adicionais sugerem que o PZQ ao ser

adicionado às SLN se incorporou no interior da estrutura lamelar do ácido esteárico o que levou a formação de estruturas lamelares com dois tipos de espaçamento.

4.3. Avaliação da estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel

4.3.1. Estabilidade das SLN-PZQ frente ao armazenamento a 4 °C e em temperatura ambiente

A formulação PA1-PZQ15 foi armazenada a 4 °C (PA1-PZQ15G) ou em temperatura ambiente (PA1-PZQ15A) e analisadas após 60 dias quanto ao diâmetro médio, Pdl, potencial zeta e eficiência de encapsulação. Observa-se que, apesar do aumento significativo do diâmetro médio e do alto índice de polidispersidade para a formulação armazenada em temperatura ambiente, a eficiência de encapsulação do praziquantel foi a mesma, não ocorrendo, portanto, expulsão do fármaco da matriz lipídica durante o armazenamento. As amostras permaneceram estáveis durante 60 dias quando armazenadas em geladeira a 4 °C.

Tabela 13 - Diâmetro médio, índice de polidispersidade, potencial zeta e eficiência de encapsulação da formulação PA1-PZQ15 armazenada a 4 °C ou em temperatura ambiente durante 60 dias.

Formulações	Diâmetro Médio (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)	EE (%)
PA1-PZQ15	505,6 ± 27,2	0,264 ± 0,044	-34,0 ± 1,1	99,06 ± 0,30
PA1-PZQ15G	616,0 ± 26,5	0,335 ± 0,037	-28,9 ± 1,5	99,22 ± 0,11
PA1-PZQ15A	1421,3 ± 208,8	0,903 ± 0,110	-28,2 ± 0,9	98,82 ± 0,30

4.3.2. Estabilidade das SLN-PZQ frente ao processo de liofilização com e sem crioprotetor

A liofilização é uma das técnicas mais utilizadas para produção de pós secos a partir de suspensões nanoparticuladas a fim de aumentar a estabilidade química da amostra. Entretanto, o processo de liofilização submete os sistemas lipídicos a

dois estresses importantes que podem afetar sua estabilidade física, o congelamento e a secagem, se crioprotetores adequados não forem empregados (MENDOZA *et al.*, 2009).

A formulação PA1-PZQ15 foi congelada sem crioprotetor (PA1-PZQ15L) e com glicerol (PA1-PZQ15GLI). Posteriormente, as amostras foram liofilizadas, ressuspensas e analisadas quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersidade, potencial zeta e eficiência de encapsulação. Observa-se que ocorreu um aumento no diâmetro médio das SLN, mesmo na presença do crioprotetor, mas não houve alteração da EE. Entretanto, o glicerol levou a uma redução, em módulo, do potencial zeta, o que pode indicar uma estabilidade reduzida da formulação.

Tabela 14 - Diâmetro médio, índice de polidispersidade, potencial zeta e eficiência de encapsulação da formulação PA1-PZQ15 congelada com e sem crioprotetor e liofilizada.

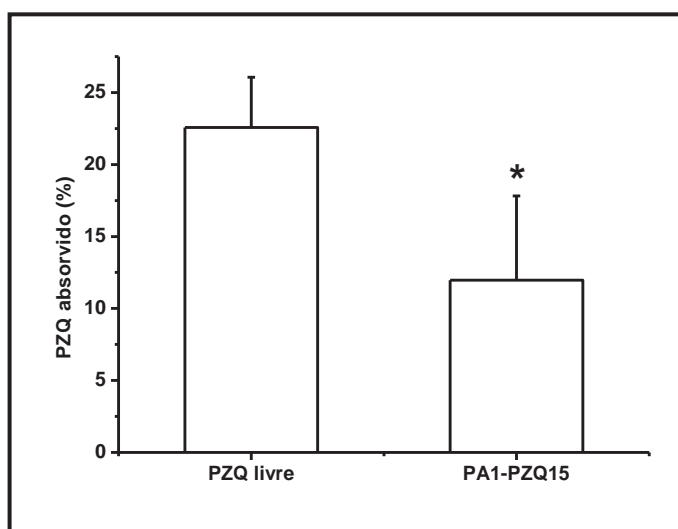
Formulações	Diâmetro Médio (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)	EE (%)
PA1-PZQ15	505,6 ± 27,2	0,264 ± 0,044	-34,0 ± 1,1	99,06 ± 0,30
PA1-PZQ15L	828,4 ± 24,2	0,6 ± 0,1	-36,2 ± 0,4	99,23 ± 0,38
PA1-PZQ15GLI	788,8 ± 23,9	0,4 ± 0,0	4,1 ± 0,8	99,58 ± 0,20

4.4. Avaliação, *in vitro*, da absorção intestinal do praziquantel pelo método do saco intestinal invertido

Com o objetivo de avaliar o efeito da formulação na eficiência do transporte de PZQ através da membrana intestinal, foi empregado o modelo de saco intestinal invertido. As amostras testadas foram o PZQ disperso em TC 199 e encapsulado nas SLN (PA1-PZQ15).

Os resultados apresentados na Figura 21 mostram que o PZQ encapsulado nas SLN foi absorvido em menor quantidade do que o PZQ disperso em TC 199, sugerindo um efeito reservatório das nanopartículas lipídicas sólidas.

Figura 21 - Porcentagem de PZQ absorvido através do segmento intestinal invertido, após incubação por 60 min com o fármaco livre e encapsulado nas SLN.



4.5. Estudo do efeito das SLN em *S. mansoni in vitro*

Os parâmetros analisados para verificar o efeito das formulações em cultura de *S. mansoni* foram os aspectos gerais da cultura observando a separação dos casais, a quantidade de parasitas mortos, a oviposição e as alterações no tegumento (Tabela 15).

Tabela 15 - Teste *in vitro* com as formulações PA1 e PA1-PZQ15 em cultura de *Schistosoma mansoni*.

Amostras Doses	Nº de casais	Nº de parasitas separados	Nº de parasitas mortos/h	Nº de parasitas com alterações no tegumento	Presença de ovos
RPMI 1640	04 ♂♀	03 ♂♀	0 ♂♀ - 72 h	01 ♂	+
PA1 (eq. 50 µg mL ⁻¹)	05 ♂♀	02 ♂♀	05 ♂♀ - 2 h	05 ♂♀	-
PA1-PZQ15 (50 µg mL ⁻¹)	05 ♂♀	03 ♂♀	05 ♂♀ - 2 h	05 ♂♀	-
RPMI 1640	04 ♂♀	04 ♂♀	0 ♂♀ - 72 h	02 ♂ - L	+
PA1 (eq. 25 µg mL ⁻¹)	05 ♂♀	03 ♂♀	05 ♂♀ - 6 h	05 ♂♀	-
PA1-PZQ15 (25 µg mL ⁻¹)	05 ♂♀	02 ♂♀	05 ♂♀ - 6 h	05 ♂♀	-
PZQ 130 µg mL ⁻¹	05 ♂♀	05 ♂♀	0 ♂♀ - 6 h	03 ♂♀	-

♂♀ - Casal de vermes; L – alteração de tegumento leve

Observa-se que as SLN sem PZQ (PA1), quando comparadas ao grupo controle, apresentaram efeito em culturas de *S. Mansoni* BH, em relação à quantidade de parasitas mortos, oviposição e quantidade de parasitas com alterações tegumentares. Além disso, a formulação com maior concentração lipídica levou os parasitas à morte em menor tempo (2 h versus 6h). As SLN contendo PZQ (PA1-PZQ15) apresentaram efeitos similares aos observados com as SLN vazias, e ambas foram mais efetivas do que o PZQ livre.

A Figura 22 apresenta um parasita incubado em meio RPMI (grupo controle). Observa-se a presença do casal de vermes, além de não haver alteração evidente no tegumento do parasita.

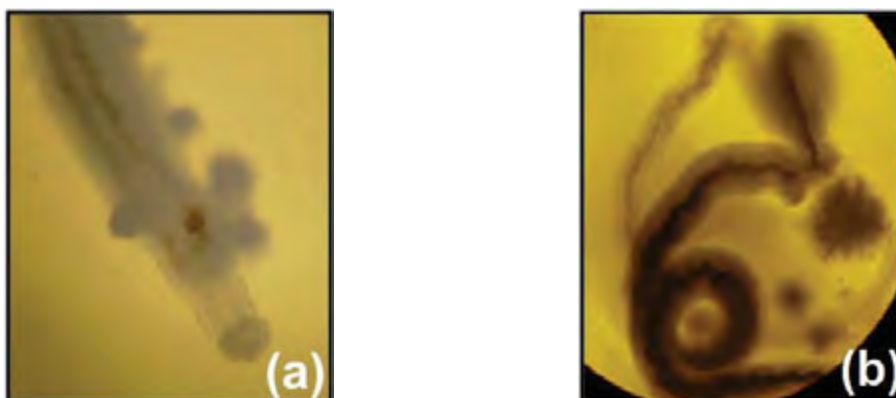
Figura 22 - *S. mansoni* incubado em RPMI 1640 (grupo controle).



Foto: Oliveira, R. N.

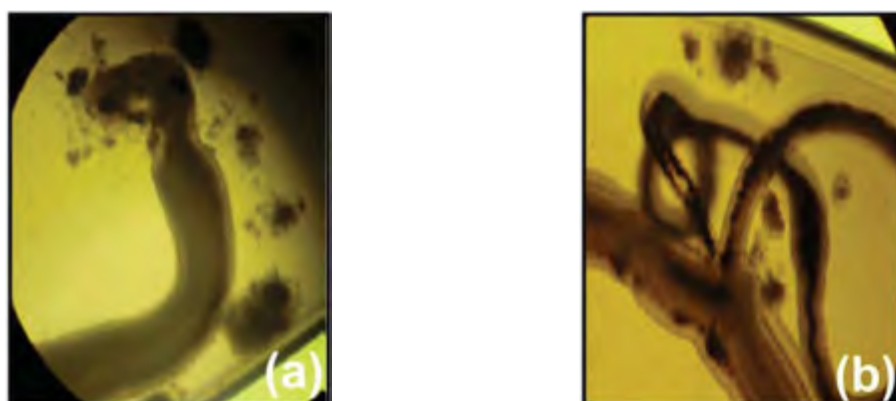
No caso da incubação com a PA1 (Figura 23), observa-se contração do parasita, além da separação do casal e alteração tegumentar e também dos órgãos internos. Modificações similares foram observadas quando os parasitas foram incubados com PA1-PZQ15 (Figura 24).

Figura 23 - *S. mansoni* incubado em PA1 (a) Eq. 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (2 h após o experimento); (b) Eq. 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (6 h após o experimento).



Fotos: Oliveira, R.N.

Figura 24 - *S. mansoni* incubado em PA1-PZQ15 (a) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PZQ (2 h após o experimento); (b) 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PZQ (6 h após o experimento).



Fotos: Oliveira, R.N.

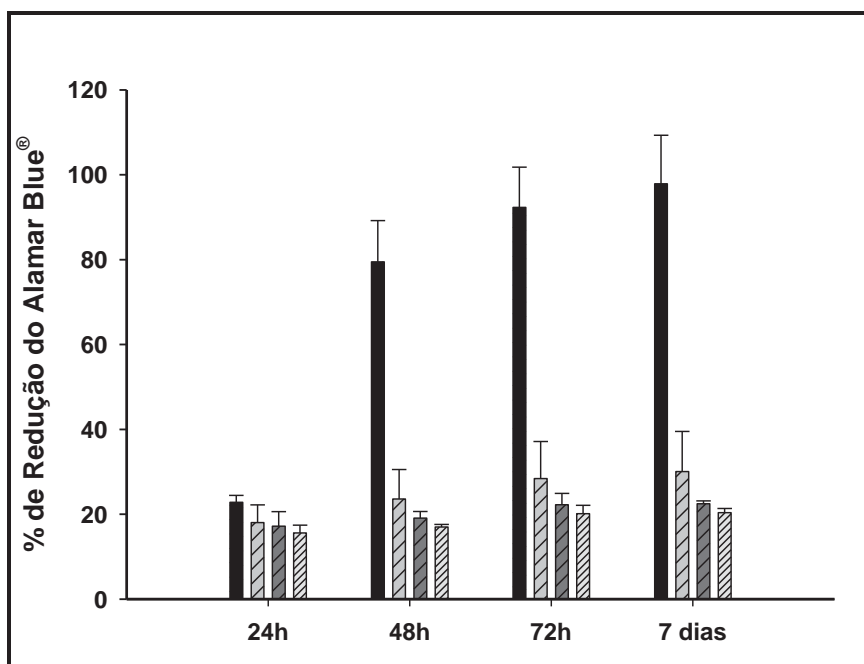
4.6. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel em células HepG2

A toxicidade das SLN-PZQ foi avaliada pela adição da mesma à cultura celular HepG2 e comparada com o PZQ livre. Foram adicionadas três concentrações diferentes de PZQ, encapsulado ou não nas SLN.

Os resultados apresentados na Figura 25 mostram que o PZQ solubilizado em etanol exerce de alguma forma um efeito tóxico a nível celular, visto a porcentagem de redução do Alamar Blue[®] ser muito inferior ao controle, diminuindo

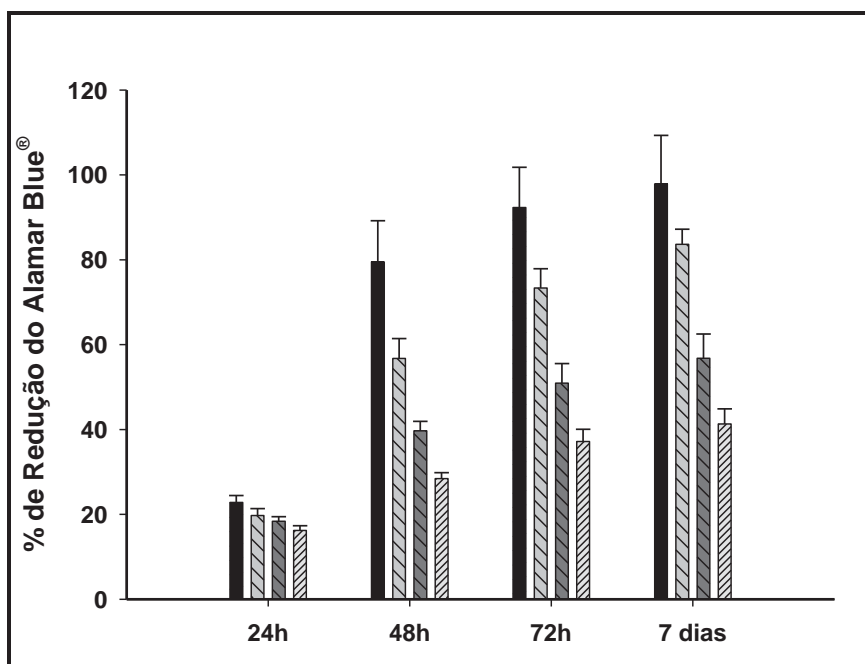
significativamente a proliferação e viabilidade celular. No entanto, apenas se distinguem diferenças a partir de 48 h, em que há de fato uma distanciação entre os tratamentos em relação ao controle.

Figura 25 - Porcentagem de redução do Alamar Blue® de células HepG2 tratadas com PZQ em diferentes concentrações: ■ Controle; ▨ PZQ 30 µg mL⁻¹; ▩ PZQ 60 µg mL⁻¹; ▪ PZQ 120 µg mL⁻¹.



Em relação ao tratamento com PA1-PZQ15, observa-se na Figura 26 que o encapsulamento de PZQ em SLN diminuiu a proliferação e viabilidade celular em relação ao controle de um modo dose-dependente.

Figura 26 - Porcentagem de redução do Alamar Blue® de células HepG2 tratadas com PA1-PZQ15 em diferentes concentrações: ■ Controle; ▨ PZQ 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$; ▩ PZQ 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$; ▪ PZQ 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



DISCUSSÃO

O primeiro passo no desenvolvimento das SLN é a avaliação da solubilidade do fármaco na fase lipídica. O ensaio foi realizado adicionando concentrações crescentes de PZQ em vários lipídeos sólidos, previamente selecionados com base na literatura. Para avaliar a solubilidade do PZQ nestes lipídeos sólidos, as misturas foram fundidas a 90 °C e analisadas visualmente a cada 15 min durante 1 h. Os lipídeos selecionados foram o ácido esteárico (SA) e o monoestearato de glicerila 40 – 55 % (GMS) devido às suas propriedades de solubilização, além de baixo custo e fácil acesso.

As formulações foram preparadas utilizando 5 % de fase lipídica e tensoativos (Poloxamer 188 ou TegoCare[®] 450) e analisadas quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta. Após esta análise, o PZQ foi incorporado na fase lipídica das SLN na concentração de 15 % em relação ao lipídeo sólido, concentração de fármaco determinada através do ensaio de solubilidade. Entretanto, após a adição do PZQ nesta concentração, todas as formulações, exceto a PA1 (contendo 5 % de SA e 1 % de Poloxamer 188) e PI1 (contendo 5 % de GMS e 1 % de Poloxamer 188), separaram fase ou houve a formação de creme. A formulação PI1-PZQ15, apesar de não separar fase, apresentou um diâmetro de partícula acima de 1000 nm com ampla faixa de distribuição, sendo, portanto, descartada. Assim, reduziu-se a quantidade de PZQ nas formulações, exceto na PA1, mas não houve sucesso no desenvolvimento das mesmas. Após ser testada a redução na quantidade de PZQ, foi testado o aumento da quantidade de tensoativo. Entretanto, também não houve a formação das SLN. Sendo assim, o PZQ foi incorporado na formulação PA1 e esta foi caracterizada através espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta, MEV, DSC, eficiência de encapsulação e capacidade de carga, SAXS, além de ensaios de estabilidade frente ao armazenamento a 4 °C ou em temperatura ambiente e ao processo de liofilização com e sem crioprotetor.

A formulação PA1 apresentou um diâmetro de 396,8 nm \pm 2,8 nm e Pdl igual a 0,156 \pm 0,036. Já as SLN contendo PZQ, a PA1-PZQ15, apresentaram diâmetro de 505,6 nm \pm 27,2 nm e Pdl igual a 0,264 \pm 0,044. O baixo valor de Pdl (< 0,35)

observado para as nanopartículas indicam uma homogeneidade aceitável na distribuição de tamanho e comportamento unimodal, sugerindo que as nanopartículas estão monodispersas.

Em relação ao potencial zeta, as SLN apresentaram uma carga de superfície negativa ($-33,5 \text{ mV} \pm 0,4 \text{ mV}$) e a incorporação do PZQ não alterou significativamente o potencial zeta das partículas ($-34,0 \text{ mV} \pm 1,1 \text{ mV}$). Estes resultados sugerem que as nanopartículas apresentam estabilidade, pois a agregação de partículas e, conseqüentemente, a gelificação, é menos comum de ocorrer em partículas carregadas (com valor de potencial zeta relativamente alto, $> |30| \text{ mV}$) devido à repulsão elétrica entre elas (HEURTAULT *et al.*, 2003; LEVY *et al.*, 1994; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; SEETAPAN *et al.*, 2010). Além disso, o uso de estabilizante estérico também produz formulações estáveis (HEURTAULT *et al.*, 2003). O Poloxamer 188, um tensoativo não-iônico, é utilizado para diminuir a repulsão eletrostática entre as partículas, pois estabiliza estericamente as nanopartículas pela formação de um revestimento hidrofílico em torno da sua superfície (SCHWARZ *et al.*, 1994).

Quando analisou-se a morfologia das SLN por MEV, observou-se que a formulação sem fármaco era composta de partículas alongadas e, em menor quantidade, partículas esféricas. Já a formulação contendo PZQ apresentou a predominância de partículas esféricas, sugerindo que o PZQ interfere na organização dos componentes lipídicos das nanopartículas.

O diâmetro das SLN determinado por MEV foi consideravelmente menor do que o obtido por PCS, devido a diferenças empregadas na preparação das amostras para análise. Para a análise das amostras por MEV, a água presente nas SLN é removida e tal secagem aparentemente modificou o diâmetro da partícula. O mesmo comportamento foi descrito por Liu e colaboradores (2008) para SLN contendo insulina.

Como as vantagens das SLN são essencialmente baseadas no estado sólido da matriz lipídica, a cristalização lipídica é um fator importante para o desempenho *in vitro* e *in vivo* das nanopartículas lipídicas sólidas e deve ser assegurada (GONZALES-MIRA *et al.*, 2010; MEHNERT; MÄDER, 2001). Entretanto, o tamanho

das nanoestruturas pode alterar o fenômeno de solidificação das partículas lipídicas, levando a uma redução na temperatura de recristalização dos lipídeos e consequentemente, as partículas permanecem no estado líquido “super resfriado” em temperatura ambiente, um problema encontrado quando o processo de preparação envolve aquecimento, tais como a preparação das SLN por fusão e emulsificação ou pelo método de microemulsão O/A a quente (ALI *et al.*, 2010; BUNJES; SIEKMANN; WESTESEN, 1998).

Analisando as curvas DSC para as formulações PA1 e PA1-PZQ15 (Figuras 17 e 18, respectivamente), observou-se um alargamento do pico de fusão e uma redução na entalpia de fusão em relação à matéria-prima SA. Este resultado pode ser atribuído ao tamanho nanométrico das partículas que apresentam uma enorme área de superfície além de um certo efeito das moléculas de tensoativo (DOKTOROVOVA *et al.*, 2010; JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000; WESTESEN; BUNJES, 1995).

A entalpia de fusão obtida para PA1 e PA1-PZQ15 não teve diferenças significativas, apesar de uma maior quantidade de SA estar presente na PA1. Este fato pode ser devido a interação do PZQ com o P-188, que mesmo sendo fraca, leva a formação de uma partícula mais estruturada na presença do fármaco, confirmada por MEV (Figura 9). O RI das SLN foi determinado para eliminar a possibilidade de formação de estado líquido “super resfriado” (BUNJES; WESTESEN; KOCH, 1996; FREITAS; MÜLLER, 1999; KUNTSCHE *et al.*, 2004). A PA1 apresentou um valor de RI de 86,4 % enquanto que a PA1-PZQ15 apresentou um RI de 85,2 %. Além disso, um pequeno pico endotérmico foi observado em 48,33 °C e 48,7 °C, respectivamente, e este pico poderia indicar a presença de P-188 na forma de revestimento em torno das nanopartículas. Resultados semelhantes foram observados por Aji Alex e colaboradores (2011).

O início da temperatura de fusão das SLN foi acima de 40 °C, tanto no 1º aquecimento como no 2º aquecimento, além da recristalização lipídica ter ocorrido acima de 0 °C, sendo um pré-requisito para as SLN permanecerem no estado sólido em temperatura corporal e de armazenamento.

A eficiência de encapsulação média e a capacidade de carga determinadas para este sistema contendo PZQ foi de 99,06 % e 17,48 %, respectivamente. O alto valor de eficiência de encapsulação pode ser devido à natureza lipofílica do fármaco e à sua solubilidade no ácido esteárico. Esta alta eficiência de encapsulação do PZQ nas SLN pode sugerir um arranjo menos ordenado e maiores imperfeições na estrutura lipídica que permitem a incorporação das moléculas de fármaco no interior da matriz lipídica.

Analisando a curva de SAXS, a partir da equação de Bragg, foi possível determinar a distância entre as lamelas, d . Para as SLN sem PZQ incorporado (PA1), o espaçamento entre lamelas foi de 3,90 nm, enquanto que para as SLN contendo PZQ (PA1-PZQ15) observou-se dois tipos de espaçamento, sendo um de 3,90 nm (idêntica a PA1) e outro com 2,99 nm. Esta diminuição da distância entre lamelas sugere que o PZQ interagiu com a matriz lipídica promovendo a aproximação entre elas, o que pode explicar o efeito do fármaco sobre a morfologia favorecendo a formação de nanopartículas esféricas como observado nas imagens de MEV (Figura 9) e a ausência do pico de fusão do PZQ em 141 °C observado por DSC (Figura 18). Este efeito pode ser atribuído à efetiva incorporação do PZQ e à consequente alta eficiência de encapsulação.

Uma das características mais importantes para a avaliação da estabilidade de sistemas coloidais é a distribuição de tamanho de partícula. A estabilidade durante o armazenamento envolve aspectos físicos e químicos e inclui a prevenção de reações de degradação (por exemplo, hidrólise) e a preservação do tamanho de partícula inicial. Formulações otimizadas de SLN devem apresentar uma estreita distribuição do tamanho de partícula na escala nanométrica para evitar o crescimento do cristal por maturação de Ostwald (MEHNERT; MÄDER, 2001). Além disso, partículas maiores que 1 μm e o aumento do seu número com o tempo pode ser um indicador de instabilidade física (HASKELL; SHIFFLETT; ELZINGA, 1998). Assim, o parâmetro de tamanho de partícula foi avaliado após 60 dias de armazenamento a 4 °C ou em temperatura ambiente. PA1-PZQ15 armazenada por 60 dias a 4 °C mostrou um pequeno mas significativo aumento do tamanho de partícula ($P < 0,05$), quando comparada a formulação inicial, permanecendo na faixa

de tamanho coloidal. Quando armazenada a 25 °C por 60 dias, o tamanho de partícula mostrou um aumento significativo, de 2,3 - 2,8 vezes. Os valores de Pdl seguiram a mesma variação do tamanho de partícula. A temperatura de armazenamento não alterou significativamente os valores de potencial zeta, que foram menores do que os determinados no dia da produção.

Estes resultados sugerem que o processo de desestabilização foi induzido pelo aumento na temperatura de armazenamento, o que aumenta a energia cinética do sistema favorecendo as colisões entre as nanopartículas lipídicas (MEHNERT; MÄDER, 2001). Além disso, o aumento do tamanho da partícula geralmente precede o fenômeno de gelificação (FREITAS; MÜLLER, 1998), o qual é, na maioria dos casos, um processo irreversível que envolve a perda da estrutura da partícula coloidal (HEURTAULT *et al.*, 2003).

Durante o armazenamento, o rearranjo da estrutura cristalina pode ocorrer em favor das configurações termodinamicamente estáveis e está muitas vezes relacionada com a expulsão das moléculas de fármaco (MEHNERT; MÄDER, 2001). As análises por CLAE para determinação da eficiência de encapsulação do PZQ em 0 e 60 dias após a preparação das PA1-PZQ15 não mostrou diferença significativa nos resultados ($P > 0,05$), tanto para a amostra armazenada a 4 °C como para a amostra armazenada em temperatura ambiente, o que apoia a hipótese de que estruturas cristalinas menos ordenadas resultam em estabilidade física e pequena efusão das moléculas de fármaco das partículas durante o armazenamento. Kheradmandnia e colaboradores (2010), quando desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas contendo cera de abelha e cera de carnaúba como matriz lipídica para incorporação de cetoprofeno, observaram resultados semelhantes.

Um meio para prevenir a maturação de Ostwald, diminuir o fenômeno de hidrólise e, conseqüentemente, aumentar a estabilidade química e física das SLN é a eliminação de água da amostra por liofilização. A liofilização também oferece a possibilidade de incorporação das SLN em *pellets*, comprimidos ou cápsulas. Entretanto, o congelamento da amostra para posterior evaporação da água sob vácuo, pode causar problemas de estabilidade. Sendo assim, a adição de

crioprotetores é necessária para impedir a agregação das SLN e obter uma melhor re-dispersão do produto seco (MEHNERT; MÄDER, 2001). Neste trabalho, o glicerol foi empregado como crioprotetor, porém este não foi eficiente em manter a estabilidade física das dispersões de SLN, sendo observado aumento na distribuição do tamanho de partícula, além da redução da carga de superfície.

Após a caracterização das SLN desenvolvidas, o efeito da formulação no transporte de PZQ através da membrana intestinal foi avaliado. Os resultados mostraram que o PZQ encapsulado nas SLN foi absorvido em menor quantidade do que o PZQ disperso em tampão neste tempo de estudo (60 min), sugerindo que as SLN agem como sistema reservatório, levando a uma menor difusão do fármaco, e, assim, o PZQ poderá atuar mais efetivamente contra os parasitas localizados nas veias mesentéricas do intestino. Além disso, o transporte linfático não pode ser descartado.

No estudo *in vitro* empregando cultura de *S. mansoni*, observa-se que as SLN com e sem PZQ apresentaram atividade na separação dos casais e morte dos parasitas, além de causarem danos tegumentares, sugerindo um efeito sinérgico entre as SLN e o fármaco. Resultados semelhantes foram observados por Mourão e colaboradores (2005) quando *S. mansoni* foram incubados com lipossomas de fosfatidilcolina.

Outro importante parâmetro a ser avaliado no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos é a toxicidade, já que há um crescente debate sobre os benefícios potenciais e efeitos indesejáveis em células vivas resultantes do uso de nanopartículas. Sendo assim, é necessário entender o risco associado com a exposição às nanopartículas e os mecanismos moleculares de qualquer citotoxicidade devido a estas partículas serem capazes de chegar ao sangue através da pele, pulmão e trato gastrointestinal, depositando-se em vários órgãos e podendo causar reações adversas biológicas pela modificação das propriedades físico-químicas da matéria viva em escala nanométrica (SOUTO *et al.*, 2009).

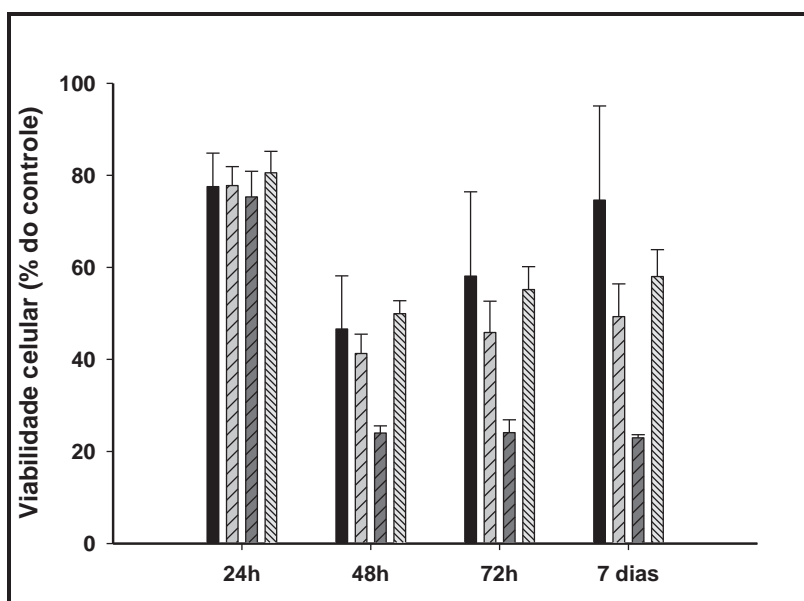
A linha celular de hepatoma humano HepG2, consagrada desde 1979, é a linha celular melhor caracterizada e mais frequentemente utilizada com relação aos parâmetros hepatotóxicos e tem sido utilizada para examinar vários mecanismos de

hepatotoxicidade (NIKLAS; NOOR; HEINZLE, 2009). A avaliação de múltiplos parâmetros sobre células HepG2 permite a previsão da hepatotoxicidade humana com mais de 80 % de sensibilidade e 90 % de especificidade (O'BRIEN *et al.*, 2006).

Apesar do PZQ ser geralmente descrito como não-tóxico, alguns efeitos colaterais são conhecidos, incluindo náusea, vômito, dor de cabeça e hepatomegalia (MONTERO; OSTROSKY, 1997). Além disso, Omar, Elmesallamy e Eassa (2005) relataram que o PZQ (1500 mg kg⁻¹, semanalmente por 6 semanas) induziu hepatotoxicidade, genotoxicidade e efeitos carcinogênicos em ratos albinos.

Neste estudo, a hepatotoxicidade do PZQ livre ou encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas em linha celular HepG2 foi avaliada pela detecção da viabilidade celular. De acordo com os resultados apresentados anteriormente e comparando as amostras testadas na concentração de 60 µg mL⁻¹, que é a dose de PZQ preconizada para o tratamento de cepas não resistentes da esquistossomose, observou-se que o PZQ encapsulado nas SLN permitiu uma maior viabilidade celular quando comparadas ao PZQ livre (Figura 27).

Figura 27 - Efeito das formulações na viabilidade celular de células HepG2 tratadas com PZQ livre e encapsulado em SLN (PA1-PZQ15) na concentração de PZQ igual a 60 µg mL⁻¹. As PA1 foram utilizadas como controle para as SLN e o etanol como controle para o PZQ. ■ Etanol 6%; ▨ PA1; ▩ PZQ; ▤ PA1-PZQ15.



Portanto, as nanopartículas lipídicas sólidas são um sistema promissor para veiculação do praziquantel, pois a encapsulação do fármaco nestes sistemas pode alterar a sua farmacocinética, reduzir a variabilidade sistêmica e a distribuição inespecífica, minimizando, assim, os efeitos tóxicos e aumentando a eficácia terapêutica.

CONCLUSÕES

- O tipo de lipídeo influencia na solubilidade do PZQ e na obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas contendo PZQ, sendo que o ácido esteárico foi o lipídeo mais adequado para o seu desenvolvimento;
- A formulação PA1-PZQ15 (contendo ácido esteárico, Poloxamer e PZQ) apresentou diâmetro de partícula em escala nanométrica e alto valor de potencial zeta, indicando que o sistema pode apresentar uma boa estabilidade física, além de alta eficiência de encapsulação do PZQ (99 %);
- Medidas de DSC sugeriram que o PZQ estava molecularmente disperso na matriz lipídica e os cristais de SLN estavam em arranjos menos ordenados. Além disso, as SLN permanecem no estado sólido;
- Medidas de SAXS mostraram que as SLN são constituídas de estruturas lipídicas lamelares e sugerem uma efetiva incorporação do PZQ nas SLN;
- A formulação PA1-PZQ15 foi estável durante 60 dias quando armazenada a 4 °C;
- A absorção intestinal do PZQ encapsulado nas SLN foi menor do que o PZQ livre, o que pode ser causado pelo efeito reservatório deste sistema, levando a uma menor difusão do fármaco encapsulado e conseqüentemente liberação prolongada. Além disso, um efeito esquistossomicida mais localizado na membrana intestinal pode ser ocasionado;
- Nos estudos *in vitro* em *S. mansoni*, observamos que as SLN (com e sem PZQ) causaram alterações tegumentares e morte dos parasitas, sendo mais efetivas do que o PZQ livre;
- Incorporação do praziquantel em nanopartículas lipídicas sólidas (PA1-PZQ15) foi capaz de diminuir a hepatotoxicidade do fármaco em comparação à solução convencional de PZQ de concentração similar em células HepG2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITYA, N. P.; PATANKAR, S.; MADHUSUDHAN, B.; MURTHY, R. S. R.; SOUTO, E. B. Artemeter-loaded lipid nanoparticles produced by modified thin-film hydration: Pharmacokinetics, toxicological and in vivo anti-malarial activity. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 40, p. 448-455, 2010.

ALI, B. H. A short review of some pharmacological, therapeutic and toxicological properties of praziquantel in man and animals. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 19, n. 2, p. 170-175, 2006.

ALI, H.; EL-SAYED, K.; SYLVESTER, P. W.; NAZZAL, S. Molecular interaction and localization of tocotrienol-rich fraction (TRF) within the matrices of lipid nanoparticles: Evidence studies by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (^1H NMR). **Colloid. Surface. B**, v. 77, p. 286–297, 2010.

AJI ALEX, M. R.; CHACKO, A. J.; JOSE, S.; SOUTO, E. B. Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 42, p. 11-18, 2011.

BUNJES, H.; SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. Emulsions of super-cooled melts - a novel drug delivery system. In: Benita S, editor. **Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 175-204, 1998.

BUNJES, H.; WESTESEN, K.; KOCH, M. H. J. Crystallization tendency and polymorphic transitions triglyceride nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 129, p. 159-173, 1996.

CASTRO, N.; MEDINA, R.; SOTELO, J.; JUNG, H. Bioavailability of praziquantel increases with concomitant administration of food. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 2903-2904, 2000.

CAVALLI, R.; GASCO, M. R.; CHETONI, P.; BURGALASSI, S.; SAETTONE, M. F. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. **Int. J. Pharm.**, v. 238, p. 241–245, 2002.

CHATTOPADHYAY, N.; ZASTRE, J.; WONG, H-L.; WU, X. Y.; BENDAYAN, R. Solid lipid nanoparticles enhance the delivery of the HIV protease inhibitor, atazanavir, by a human brain endothelial cell line. **Pharm. Res.**, v. 25, n. 10, p. 2262-2271, 2008.

CHAUD, M. V.; TAMASCIA, P.; LIMA, A. C.; PAGANELLI, M. O.; GREMIÃO, M. P. D.; FREITAS, O. Solid dispersions with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 46, n. 3, p. 473-481, 2010.

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.; 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.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present... and future? **Pharmacol. Ther.**, v. 68, n. 1, p. 35-85, 1995.

DOKTOROVOVA, S.; ARAUJO, J.; GARCIA, M. L.; RAKOVSKY, E.; SOUTO E. B. Formulating fluticasone propionate in novel PEG-containing nanostructured lipid carriers (PEG-NLC). **Colloid. Surface. B**, v. 75, p. 538-542, 2010.

EL-ARINI, S. K.; LEUENBERGER, H. Dissolution properties of praziquantel-PVP systems. **Pharm. Acta Helvetiae**, v. 73, n. 1, p. 89-94, 1998.

ELDEM, T.; SPEISER, P.; HINCAL, A. Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. **Pharm. Res.**, v. 8, p. 47–54, 1991.

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.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. **Int. J. Pharm.**, v. 168, p. 221–229, 1998.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN™) and crystallinity of the lipid phase. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 47, p. 125-132, 1999.

FRICKER, G.; KROMP, T.; WENDEL, A.; BLUME, A.; ZIRKEL, J.; REBMANN, H.; SETZER, C.; QUINKERT, R.-O.; MARTIN, F.; MÜLLER-GOYMANN, C. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. **Pharm. Res.**, v. 27, p. 1469–1486, 2010.

GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow distribution. **US Patent N° 5250236**, 1993.

GIORGI, M.; MEUCCI, V.; VACCARO, E.; MENGOZZI, G.; GIUSIANI, M.; SOLDANI, G. Effects of liquid and freeze-dried grapefruit juice on the pharmacokinetics of praziquantel and its metabolite 4'-hydroxy praziquantel in beagle dogs. **Pharmacol. Res.**, v. 47, p. 87-92, 2003.

GONZALES-MIRA, E.; EGEEA, M. A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. **Colloid. Surface. B**, v. 81, n. 2, p. 412-421, 2010.

GREENBERG, R. M. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1-9, 2005.

HASKELL, R. J.; SHIFFLETT, J. R.; ELZINGA, P. A. Particle-sizing technologies for submicron emulsions. In: Benita S, editor. **Submicron emulsions in drug targeting and delivery**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 21–98, 1998.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.-E.; BENOIT, J.-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283–4300, 2003.

HOU, D.; XIE, C.; HUANG, K.; ZHU, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials**, v. 24, n. 10, p. 1781–1785, 2003.

HU, F.-Q.; JIANG, S.-P.; DU, Y.-Z. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloid. Surface. B**, v. 45, n. 3-4, p. 167–173, 2005.

HU, F.-Q.; JIANG, S.-P.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; YE, Y.-Q.; ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 314, n. 1, p. 83–89, 2006.

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.

JENNING, V.; THÜNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. Characterization of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. **Int. J. Pharm.**, v. 199, p. 167-177, 2000.

JENSEN, L. B.; MAGNUSSON, E.; GUNNARSSON, L.; VERMEHREN, C.; NIELSEN, H. M.; PETERSSON, K. Corticosteroid solubility and lipid polarity control release from solid lipid nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 390, p. 53–60, 2010.

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.

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

KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine**, v. 6, n. 6, p. 753-759, 2010.

- 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.
- KÜCHLER, S.; HERRMANN, W.; PANEK-MINKIN, G.; BLASCHKE, T.; ZOSCHKE, C.; KRAMER, K. D.; BITTL, R.; SCHÄFER-KORTING, M. SLN for topical application in skin diseases - Characterization of drug-carrier and carrier-target interactions. **Int. J. Pharm.**, v. 390, n. 2, p. 225-233, 2010.
- 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.
- KUNTSCHKE, J.; WESTESEN, K.; DRECHSLER, M.; KOCH, M. H.; BUNJES, H. Supercooled smectic nanoparticles - a potential novel carrier system for poorly water soluble drugs. **Pharm. Res.**, v. 21, p. 1836-1845, 2004.
- LARSON E. M.; DOUGHMAN, D. J.; GREGERSON, D. S.; OBRITSCH, W. F. A new, simple, nonradioactive, nontoxic in vitro assay to monitor corneal endothelial cell viability. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 38, n. 10, p. 1929-1933, 1997.
- LEVY, M. Y.; SCHUTZE, W.; FUHRER, C.; BENITA, S. Characterization of diazepam submicron emulsion interface: role of oleic acid. **J. Microencapsulation**, v. 11, p. 79–92, 1994.
- LI, H.; ZHAO, X.; MA, Y.; ZHAI, G.; LI, L.; LOU, H. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. **J. Control. Release**, v. 133, p. 238–244, 2009.
- LIN, X.; LI, X.; ZHENG, L.; YU, L.; ZHANG, Q.; LIU, W. Preparation and characterization of monocaprato nanostructured lipid carriers. **Colloid. Surface. A**, v. 311, p. 106-111, 2007.
- LIU, J.; GONG, T.; FU, H.; WANG, C.; WANG, X.; CHEN, Q.; ZHANG, Q.; HE, Q.; ZHANG, Z. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. **Int. J. Pharm.**, v. 356, p. 333–344, 2008.
- LIU, Y.; WANG, X.; WANG, J.-K.; CHING, C. B. Structural characterization and enantioseparation of the chiral compound praziquantel. **J. Pharm. Sci.**, v. 93, n. 12, p. 3039-3046, 2004.
- LUKOWSKI, G.; KASBOHM, J.; PFLEGEL, P.; ILLING, A.; WULFF, H.; Crystallographic investigation of cetylpalmitate solid lipid nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 196, n. 2, p. 201-205, 2000.

- 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.; CHAUD, M. V.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Development of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles and evaluation of intestinal permeation by the everted gut sac model. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 6, p. 3057-3061, 2006.
- MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 1-37, 2009.
- MARTINS, S.; SILVA, A. C.; FERREIRA, D. C.; SOUTO, E. B. Improving oral absorption of salmon calcitonin by mucoadhesive solid lipid nanoparticles (SLN). **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 5, p. 76-83, 2009.
- MARUYAMA, T.; NAKAJIMA, M.; ICHIKAWA, S.; SANO, Y.; NABETANI, H.; FURUSAKI, S.; SEKI, M. Small angle X-Ray scattering analysis of stearic acid modified lipase. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 65, p. 1003-1006, 2001.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 47, p. 165-196, 2001.
- MENDOZA, A. E.-H.; CAMPANERO, M. A.; MOLLINEDO, F.; BLANCO-PRIETO, M. J. Lipid nanomedicines for anticancer drug therapy. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 5, p. 323-343, 2009.
- METWALLY, A.; BENNETT, J. L.; BOTROS, S.; EBEID, F. Effect of cimetidine, bicarbonate and glucose on the bioavailability of different formulations of praziquantel. **Arzneim/Drug Res.**, v. 45, n. 4, p. 516-518, 1995.
- MONTERO, R.; OSTROSKY, P. Genotoxic activity of praziquantel. **Mutation Res.**, v. 387, p. 123-139, 1997.
- MOURÃO, S. C.; COSTA, P. I.; SALGADO, H. R. N.; 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.; LUCKS, J. S. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN). **Eur. Patent Nº 0605497**. Germany, 1996.
- MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 50, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R. H.; RUNGE, S. A.; RAVELLI, V.; THÜNEMANN, A. 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.**, v. 68, n. 3, p. 535-544, 2008.

NIKLAS, J.; NOOR, F.; HEINZLE, E. Effects of drugs in subtoxic concentrations on the metabolic fluxes in human hepatoma cell line HepG2. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 240, p. 327–336, 2009.

O'BRIEN, P. J.; IRWIN, W.; DIAZ, D.; HOWARD-COFIELD, E.; KREJSA, C. M.; SLAUGHTER, M. R.; GAO, B.; KALUDERCIC, N.; ANGELINE, A.; BERNARDI, P.; BRAIN, P.; HOUGHAM, C. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. **Arch. Toxicol.**, v. 80, p. 580–604, 2006.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OMAR, A.; ELMESALLAMY, G.-S.; EASSA, S. Comparative study of the hepatotoxic, genotoxic and carcinogenic effects of praziquantel distocide & the natural myrrh extract Mirazid on adult male albino rats. **J. Egypt Soc. Parasitol.**, v. 35, p. 313-329, 2005.

PALIWAL, R.; RAI, S.; VAIDYA, B.; KHATRI, K.; GOYAL, A. K.; MISHRA, N.; MEHTA, A.; VYAS, S. P. Effect of lipid core material on characteristics of solid lipid nanoparticles designed for oral lymphatic delivery. **Nanomedicine**, v. 5, p. 184–191, 2009.

PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Oral solid lipis nanoparticles-based antitubercular chemotherapy. **Tuberculosis**, v. 85, p. 415-420, 2005.

PEDERSEN, N.; HANSEN, S.; HEYDENREICH, A. V.; KRISTENSEN, H. G.; POULSEN, H. S. Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 62, n. 2, p. 155–162, 2006.

PHELAN, M. C. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. In **Current Protocols in Cell Biology**, 2007.

PORTER, C. J. H.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Rev.**, v. 6, p. 231-248, 2007.

RADOMSKA-SOUKHAREV, A. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 59, p. 411–418, 2007.

REICH, M. R.; GOVINDARAJ, R. J.; DUMBAUGH, K.; YANG, B.; BRINKMANN, A.; EL-SAHARTY, S.; MAST, C.; NORRIS, J. International strategies for tropical disease treatments: experiences with praziquantel. **Takemi Program in International Health**. Harvard School, p. 1-104, 1995.

ROGER, E.; LAGARCE, F.; GARCION, E.; BENOIT, J.-P. Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. **Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 287-306, 2010.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 5th ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain and The American Pharmaceutical Association, p. 536 e 739, 2006.

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.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **J. Control. Release**, v. 30, p. 83-96, 1994.

SEETAPAN, N.; BEJRAPHA, P.; SRINUANCHAI, W.; RUKTANONCHAI, U. R. Rheological and morphological characterizations on physical stability of gamma-oryzanol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs). **Micron**, v. 41, p. 51-58, 2010.

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.

SHUHUA, X. Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to praziquantel and the artemisinins. **Acta Trop.**, v. 96, p. 153-167, 2005.

SOUTO, E. B.; ANSELMINI, 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.; MARTINS-LOPES, P.; LOPES, C. M.; GAIVÃO, I.; SILVA, A. M.; GUEDES-PINTO, H. A note on regulatory concerns and toxicity assessment in lipid-

based delivery systems (LDS). **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 5, n. 4, p. 317- 322, 2009.

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

SPEISER, P. Lipidnanopellets als tragersystem fur arzneimittel zur peroralen anwendung. **Eur. Patent Appl.** EP 0167825, 1986.

TESKAČ, K.; KRISTL, J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. **Int. J. Pharm.**, v. 390, p. 61–69, 2010.

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.

VIGHI, E.; RUOZI, B.; MONTANARI, M.; BATTINI, R.; LEO, E. pDNA condensation capacity and in vitro gene delivery properties of cationic solid lipid nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 389, p. 254–261, 2010.

WESTESEN, K.; BUNJES, H. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? **Int. J. Pharm.**, v. 115, p. 129-131, 1995.

WILLARD, H. H.; MERRITT, L. L.; DEAN, J. A. Ultraviolet and visible absorption methods. In: **Instrumental Methods of Analysis**. Princeton, NJ: D Van Norstrand; p. 94-95, 1965.

WISSING, S. A.; KAYSERB, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 56, n. 9, p. 1257– 1272, 2004.

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.

YANG, S.; ZHU, J.; LU, Y.; LIANG, B.; YANG, C. Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. **Pharm. Res.**, v. 16, p. 751-757, 1999.

YE, J.; WANG, Q.; ZHOU, X.; ZHANG, N. Injectable actarit-loaded solid lipid nanoparticles as passive targeting therapeutic agents for rheumatoid arthritis. **Int. J. Pharm.**, v. 352, p. 273-279, 2008.

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, Z.; BU, H.; GAO, Z.; HUANG, Y.; GAO, F.; LI, Y. The characteristics and mechanism of simvastatin loaded lipid nanoparticles to increase oral bioavailability in rats. **Int. J. Pharm.**, v. 394, p. 147-153, 2010.