



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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRAZIQUANTEL VEICULADO  
EM DISPERSÕES LIPÍDICAS NO TRATAMENTO DE  
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *SCHISTOSOMA  
MANSONI***

**ANA LUIZA RIBEIRO DE SOUZA**

**ARARAQUARA - SP  
2008**

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRAZIQUANTEL VEICULADO EM  
DISPERSÕES LIPÍDICAS NO TRATAMENTO DE  
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *SCHISTOSOMA MANSONI***

ANA LUIZA RIBEIRO DE SOUZA

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

ORIENTADOR: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA - SP

2008

### **Ficha Catalográfica**

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

**S729a**

Souza, Ana Luiza Ribeiro de

Avaliação do efeito do praziquantel veiculado em dispersões lipídicas no tratamento de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* / Ana Luiza Ribeiro de Souza. – Araraquara, 2008.

79 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Maria Palmira Daflon Gremião.

1. Esquistossomose. 2. Praziquantel . 3. Lipossomas. 4. Dispersões lipídicas  
I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Título.

**CDD: 615.01**

**CAPES: 40300005**

# ANA LUIZA RIBEIRO DE SOUZA

## “AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRAZQUANTEL VEICULADO EM DISPERSÕES LIPÍDICAS NO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *SCHISTOSOMA MANSONI*”

---

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 11/01/2008, consideraram a candidata **Ana Luiza Ribeiro de Souza**:

( ) REPROVADA

( X ) APROVADA

1) Examinadora (*Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti*) \_\_\_\_\_

2) Examinador (*Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento*) \_\_\_\_\_

3) Presidente (*Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião*) \_\_\_\_\_

*"Uma mente aberta a uma  
nova idéia, jamais voltará  
ao seu tamanho original."*

*(Albert Einstein)*

*Aos meus pais, Gilberto (in memoriam) e Marisa, por toda uma vida de amor e cumplicidade. Obrigada por orientarem o meu caminho, feito de lutas e incertezas, mas também de muitas esperanças e sonhos!*

*Aos meus irmãos que sempre acreditaram em mim!*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À minha mãe pela paciência e pelas palavras de estímulo.

*“Nunca encontrei alguém que te igualasse no tesouro de afeto e carinho. Em ti encontro o próprio coração de Deus no mundo!!!”*

Aos meus familiares que sempre me incentivaram na realização dos meus sonhos.

À Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião pela valiosa orientação, amizade, confiança e, principalmente, paciência durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação.

*“Ser mestre não é apenas ensinar. Ensinar não é apenas transmitir o conhecimento. Ser mestre é ser instrutor e amigo, guia e companheiro. Ser mestre é ser exemplo. Exemplo de*

*dedicação, de doação, de dignidade pessoal e, sobretudo, de amor.”*

À Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci pelas frutíferas discussões no exame geral de qualificação e pela colaboração nos estudos de SAXS.

Ao Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud pelo imprescindível auxílio no estudo de absorção e pelas discussões no exame geral de qualificação.

À Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti pela colaboração nos estudos *in vivo* e pela paciência.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento pela colaboração na realização das análises físico-químicas, pela amizade e paciência.

À Profa. Dra. Ana Dóris de Castro e à Profa. Dra. Adélia Emília de Almeida pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista e ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira pelas agradáveis conversas.



## *Agradecimentos*

---

Aos amigos do laboratório Andréa, Arnóbio, Cristina Bruno, Cristina Franzini, Daniele, Fabrício, Flávia Chiva, Flávio, Gustavo, Joceana, Juliane Farinelli, Juliane Piovani, Karen, Kelly, Priscileila, Renan, Thalita e Traudi, pela grande amizade, agradável convivência, longas conversas, intermináveis risadas, sugestões e grandes aprendizados.

*“Amigo não é aquele que nos faz algum bem, mas aquele que está sempre e em toda parte junto conosco.”*

Aos meus amigos Nega, Sandra, Caê, Bruna, Luana e Marília pela amizade, companheirismo, compreensão e incentivo.

*“As pessoas não se tornam especiais pela maneira de ser ou agir, mas pela profundidade em que atingem nossos sentimentos.”*

À Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado e à Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara pela utilização do Laboratório de Controle de Qualidade.

## *Agradecimentos*

---

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara pela utilização do Microscópio de Luz Polarizada, em especial à Zenaide pela imensa ajuda.

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, Fátima e Eduardo.

Às funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pelo apoio e dedicação.

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

Ao Prof. Dr. Celso Santilli do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP – Araraquara pela utilização do Reômetro.

À Profa. Dra. Maria Vitória Benkley do Laboratório Multiusuário de Caracterização de Sistemas de Liberação Micro e Nanodispersos de Fármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto pela utilização do *Light Scattering*, em especial ao Orestes pela colaboração.

## *Agradecimentos*

---

Ao Departamento de Parasitologia da UNICAMP pela disponibilização do Laboratório para realização dos estudos *in vivo*, em especial às alunas Tamy e Tarsila pela amizade e colaboração.

À Faculdade de Ciências da Saúde da UNIMEP pela disponibilização do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa para realização do estudo de absorção *in vitro*, em especial às alunas Carol e Paula pelo auxílio no experimento.

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

À CAPES pelo suporte financeiro.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar... As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

*(Chico Xavier)*

# SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>i</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>ii</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>v</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>viii</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1. MATERIAIS.....	26
3.1.1. Substâncias e Reagentes.....	26
3.1.2. Equipamentos e Acessórios.....	26
3.1.3. Animais.....	27

3.2. MÉTODOS.....	28
3.2.1. Preparo das Dispersões Lipídicas.....	28
3.2.2. Caracterização das Dispersões Lipídicas.....	29
3.2.2.1. Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	29
3.2.2.2. Determinação do comportamento viscoelástico das formulações....	30
3.2.2.3. Determinação do diâmetro médio das formulações.....	31
3.2.2.4. Microscopia de Luz Polarizada.....	32
3.2.3. Estudo <i>in vivo</i> com camundongos <i>Swiss-SPF</i> infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> .....	32
3.2.4. Metodologia analítica utilizada para determinação do PRZ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	34
3.2.5. Efeito da fosfatidilcolina de soja na absorção intestinal do praziquantel pelo método do saco intestinal invertido.....	35
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1. Caracterização das Formulações.....	38
4.1.1. Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	38
4.1.2. Estudo do comportamento viscoelástico das formulações.....	40
4.1.3. Determinação do diâmetro médio das dispersões lipídicas.....	46
4.1.4. Microscopia de Luz Polarizada.....	48
4.2. Estudos <i>in vivo</i> com camundongos <i>Swiss-SPF</i> infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> .....	51

4.2.1. Quantidade de ovos por grama de fezes.....	51
4.2.2. Oograma.....	52
4.3. Avaliação da absorção intestinal do praziquantel.....	54
4.3.1. Metodologia analítica empregada para determinação do PRZ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	54
4.3.2. Efeito da fosfatidilcolina de soja na absorção intestinal do praziquantel pelo método do saco intestinal invertido.....	57
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>VI. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACN: acetonitrila

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

L-PC: dispersão lipídica de fosfatidilcolina de soja

L-PRZ: dispersão lipídica de fosfatidilcolina de soja contendo praziquantel

MLV: lipossomas multilamelares

PC: fosfatidilcolina de soja

PRZ: praziquantel

SUV: lipossomas unilamelares pequenos

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Schistosoma</i> .....	7
Figura 2: Granuloma íntegro e degenerado do fígado ao redor dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> no fígado de um camundongo.....	8
Figura 3: Estrutura química do PRZ.....	13
Figura 4: Esquema de um lipossoma.....	17
Figura 5: Esquema de incorporação de fármacos em um lipossoma. Corte transversal de um lipossoma multilamelar.....	20
Figura 6: Representação esquemática dos lipossomas com relação à forma, tamanho e número de bicamadas.....	21
Figura 7: Esquema representativo da transição de estrutura com aumento da concentração.....	22
Figura 8: Esquema de preparação de dispersões lipídicas.....	29
Figura 9: Curvas de SAXS para as dispersões lipídicas de PC sem PRZ (L-PC).....	39
Figura 10: Curvas de SAXS para as dispersões lipídicas de PC contendo PRZ (L-PRZ).....	39
Figura 11: Variação da tensão de cisalhamento em função do gradiente de cisalhamento das formulações sem PRZ (L-PC) e com PRZ.....	42



Figura 12: Variação da viscosidade em função do gradiente de cisalhamento para as formulações sem PRZ (L-PC) e com PRZ (L-PRZ).....	44
Figura 13: Evolução dos módulos de armazenagem (G') e de perda (G'') da L-PRZ 384 e da L-PC 571.....	46
Figura 14: Diâmetro médio das dispersões lipídicas sem PRZ (L-PC) e com PRZ (L-PRZ).....	47
Figura 15: Fotomicrografia da formulação de L-PC 128.....	48
Figura 16: Fotomicrografia da formulação de L-PRZ 128/21.....	48
Figura 17: Fotomicrografia da formulação de L-PC 256.....	49
Figura 18: Fotomicrografia da formulação de L-PRZ 256/42.....	49
Figura 19: Fotomicrografia da formulação de L-PC 320.....	49
Figura 20: Fotomicrografia da formulação de L-PRZ 320/53.....	49
Figura 21: Fotomicrografia da formulação de L-PC 384.....	50
Figura 22: Fotomicrografia da formulação de L-PRZ 384/64.....	50
Figura 23: Fotomicrografia da formulação de L-PC 571.....	50
Figura 24: Quantidade de ovos por grama de fezes após tratamento.....	52
Figura 25: Cromatograma, em 215nm, referente à solução de TC 199 contendo 50µg/mL de PRZ.....	55
Figura 26: Cromatograma, em 215nm, referente à amostra contida no interior do saco intestinal invertido incubado com L-PRZ (1:3).....	55
Figura 27: Cromatograma, em 215nm, referente à amostra presente no	

---

meio de incubação (PRZ disperso em TC 199).....	56
Figura 28: Curva analítica do PRZ em tampão TC 199 pH 7,4, obtida por CLAE.....	57
Figura 29: Porcentagem de PRZ absorvido através do segmento intestinal invertido, após incubação por 60 min com o fármaco.....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos com propriedades esquistossomicidas.....	11
Tabela 2: Exemplos de lipídios formadores de bicamada utilizados para formação de lipossomas.....	18
Tabela 3: Parâmetros de empacotamento e estruturas polimórficas.....	19
Tabela 4: Condições cromatográficas utilizadas na análise do PRZ.....	35
Tabela 5: Composição das dispersões lipídicas preparadas para caracterização físico-química.....	38
Tabela 6: Diâmetro médio e polidispersidade das dispersões lipídicas...	47
Tabela 7: Efeito das doses de PRZ e L-PRZ sobre os ovos de <i>S. mansoni</i> . Tratamento aos 30 dias após a infecção.....	53
Tabela 8: Efeito das doses de PRZ e L-PRZ sobre os ovos de <i>S. mansoni</i> . Tratamento aos 45 dias após a infecção.....	54

## RESUMO

A esquistossomose é uma infecção parasitária causada pelo trematódeo do gênero *Schistosoma*. Afeta aproximadamente 200 milhões de pessoas, matando cerca de 280.000 pessoas por ano, com uma grande porcentagem dos indivíduos infectados residindo na África. Praziquantel (PRZ) é ativo contra todas as espécies de *Schistosoma* e é considerado o fármaco de escolha para o tratamento de tal doença. No entanto, sua baixa solubilidade em água e o risco de resistência ou tolerância do parasita ao PRZ justificam a importância de desenvolver uma alternativa tecnológica para obtenção de um produto farmacêutico que pode aumentar a eficácia terapêutica e melhorar a biodisponibilidade deste fármaco. Lipossomas têm sido utilizados com sucesso na área farmacêutica e vários estudos clínicos têm demonstrado sua versatilidade para compartimentalizar e modificar o comportamento de fármacos. Os lipossomas são capazes de modificar várias propriedades de fármacos, tais como sua farmacocinética e, no caso de fármacos lipofílicos, sua solubilidade e biodisponibilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das dispersões lipídicas contendo PRZ e sua eficácia *in vivo* contra a cepa tolerante BH. O transporte do fármaco através da membrana intestinal foi avaliado empregando o modelo do saco intestinal invertido. A fim de avaliar o efeito do aumento das concentrações de PC e PRZ na estruturação destes sistemas, eles foram caracterizados por SAXS, reologia, espalhamento

dinâmico de luz e microscopia de luz polarizada. Observou-se que a quantidade de PC desempenha um importante papel na estruturação dos sistemas. Os estudos *in vivo* empregando camundongos infectados com a cepa BH de *Schistosoma mansoni* demonstraram que os lipossomas melhoraram a atividade esquistosomicida do PRZ, apesar do transporte do fármaco através da membrana intestinal diminuir com o aumento da quantidade de PC. É provável que esta redução no transporte do PRZ incorporado na vesícula lipídica é devido à interação da vesícula de PC com a membrana intestinal, originando uma barreira lipídica e fazendo com que o fármaco fique retido na membrana intestinal e atue mais efetivamente contra os parasitas localizados nas veias mesentéricas do intestino. Neste estudo, foi demonstrado que os lipossomas melhoraram a atividade do PRZ contra a linhagem de *S. mansoni* tolerante, a BH, e representa um ponto inicial na investigação das estratégias mais adequadas para melhorar a eficácia deste fármaco.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasitic infection caused by trematode of the genus *Schistosoma*. It affects approximately 200 million people, killing as many as 280.000 people per year, with a large percentage of infected individuals residing in Africa. Praziquantel (PRZ) is active against all species of *Schistosoma* and it is considered the drug of choice for the treatment of such disease. However, its low water solubility and the risk of parasite resistance or tolerance to PRZ justify the importance to develop an alternative technology to obtain a pharmaceutical product that can increase the therapeutic efficacy and improve the bioavailability of this drug. Liposomes have been successfully used in the pharmaceutical area and some clinical studies have demonstrated its versatility to compartmentalize and to modify the drug behavior. Liposomes are able to modify several properties of a drug, such as its pharmacokinetics and, in the case of lipophilic drugs, their solubility and bioavailability. The aim of this work was to evaluate the effect of lipid dispersions containing PRZ and its *in vivo* efficacy against a BH tolerant strain. The transport of the drug through the intestinal membrane was evaluated by means of the everted gut sac model. In order to assess the effect of increasing both PC and PRZ concentrations during the structuration of these systems, they were characterized by means of SAXS, rheology, dynamic light scattering and polarized light microscopy. It was observed that the amount of PC plays an important role in the structuration of

the systems. The *in vivo* study using mice infected with BH strain of *Schistosoma mansoni* demonstrated that liposomes improve the antischistosomal activity of PRZ, despite of the decreasing of drug transport through the intestinal membrane with increased amount of PC. It is probable that this reduction in the transport of PRZ incorporated into the lipid vesicle is due to the interaction of PC vesicle with intestinal membrane, originating a lipid barrier and making the drug to stay retained in the intestinal membrane and to act more effectively against the parasites located in the mesenteric veins of the intestine. In this study, it was demonstrated that liposomes improved the PRZ activity against tolerant BH *S. mansoni* strain and it represents a start point in the investigation of the most adequate strategies to improve the efficacy of this drug.

A esquistossomose é uma infecção parasitária causada pelo trematóide do gênero *Schistosoma*. Afeta aproximadamente 200 milhões de pessoas, matando cerca de 280.000, com uma grande porcentagem dos indivíduos infectados residindo na África (JEZIORSKI; GREENBERG, 2006; VAN DER WERF et al., 2003). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), nas áreas tropicais e subtropicais a esquistossomose só é superada pela malária em termos de importância sócio-econômica e de saúde pública (DISCH et al., 2002; JABOR; ROCHA; BONATO, 1997; LI et al., 2000).

Atualmente, no Brasil, apenas dois fármacos esquistossomicidas são utilizados, a oxamniquina e o praziquantel (PRZ). A oxamniquina apresenta efeitos colaterais no sistema nervoso central, efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Além disso, a decisão da empresa farmacêutica detentora do registro de produtos contendo oxamniquina de limitar a produção de medicamentos com este fármaco, torna o praziquantel a única forma de tratar esta parasitose (MOURÃO, 2001).

O praziquantel, ativo contra todas as espécies de *Schistosoma*, é o fármaco de escolha para o tratamento desta parasitose (CIOLI, 1998; ISMAIL et al., 1999; SULEIMAN et al., 2004). Os efeitos colaterais são considerados leves, entretanto, falhas no tratamento com este fármaco, relatos de isolamento de *S. mansoni* resistentes ao praziquantel no Egito e no Senegal, juntamente com a capacidade de selecionar algumas linhagens tolerantes em laboratório, como a linhagem BH, aumentam o interesse na pesquisa com estes parasitas



(GRYSEELS et al., 2006; HAGAN et al., 2004; PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004; SHUHUA et al., 2000). Associado a isto e considerando que a vacina ainda está distante da aplicação clínica, o desenvolvimento de alternativas tecnológicas que possam melhorar o tratamento destes casos são necessárias (ISMAIL et al., 1999; JIRAUNGKOORSKUL et al., 2006; SHAOHONG et al., 2006; SHUHUA, 2005).

Muitas destas alternativas têm sido focadas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos micro e nanoestruturados. Na Indústria Farmacêutica, novos medicamentos empregando a nanotecnologia têm sido propostos com o objetivo de diminuir efeitos colaterais, direcionar fármacos para sítios específicos, melhorar as características biofarmacêuticas e liberar o fármaco de maneira controlada (MAINARDES et al., 2005). Essas estruturas apresentam a capacidade de compartimentalizar diversos grupos de agentes terapêuticos e de modificar as propriedades e o comportamento de substâncias ativas em meio biológico (MAINARDES et al., 2005, MOURÃO et al., 2005; SILER-MARINKOVIC et al., 1997).

Sistemas coloidais, como lipossomas, nanopartículas, microemulsão e cristal líquido, têm sido empregados com sucesso na área farmacêutica. Os lipossomas têm sido investigados e vários estudos clínicos têm demonstrado sua versatilidade para veicular uma larga variedade de fármacos utilizados na terapia. Por serem sistemas nanoestruturados, os lipossomas compartimentalizam e modificam o comportamento dos fármacos, podendo

alterar sua farmacocinética, aumentar a solubilidade de fármacos lipofílicos, reduzir a distribuição inespecífica, diminuindo a toxicidade e melhorando a distribuição para tecidos alvos e, conseqüentemente, aumentando a eficácia (EL-SAMALIGY; AFIFI; MAHMOUD, 2006; MAINARDES et al., 2005; MOURÃO et al., 2005).

Neste capítulo, destacaremos a importância da esquistossomose dentro do cenário de saúde pública, as propriedades químicas, físicas e farmacológicas do praziquantel utilizado como fármaco de escolha no tratamento desta patologia e, por fim, o papel dos lipossomas como alternativa para melhorar a eficácia de fármacos.

## ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomíase também denominada esquistossomose, bilharziose ou, popularmente, barriga d'água é uma infecção parasitária causada pelo *Schistosoma sp.* (Classe: *Trematoda*, Família: *Schistosomatidae*). As principais espécies que infectam o homem são: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi* (JEZIORSKI; GREENBERG, 2006; JIRAUNGKOORSKUL et al., 2006; MOURÃO, 2001).

A doença foi endêmica na China, Egito, Mesopotâmia e Palestina nos tempos antigos como evidenciado pelos antígenos e ovos calcificados em rins ou fígado de corpos exumados de múmias. No entanto, estudos epidemiológicos só tiveram início há 150 anos atrás (UTZINGER et al., 2001).

A importância da esquistossomíase no quadro das epidemias parasitárias que acometem a população mundial está na sua vasta distribuição geográfica, pois é encontrada em todo mundo, tendo, porém, maior incidência nos países em desenvolvimento. A distribuição geográfica das espécies parece estar ligada a fatores como a existência de hospedeiros adaptáveis e condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento. Na Europa e Ásia ocorre a predominância da espécie *S. haematobium*. As espécies *S. haematobium* e *S. mansoni* apresentam grande incidência na África. Somente a ausência de hospedeiros intermediários adaptáveis ao desenvolvimento do *S. haematobium* pode explicar a prevalência da espécie *S. mansoni* no continente Americano.

No Brasil a área endêmica da esquistossomose abrange 19 estados, com aproximadamente 30 milhões de habitantes expostos ao risco de contrair a doença. Ocorre de forma endêmica ou focal desde o estado do Maranhão até Minas Gerais, com certa penetração no estado do Espírito Santo. Além disso, focos isolados nos estados do Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Distrito Federal e Rio Grande do Sul são relatados (FERRARI et al., 2003; FUNASA, 2002).

Esquistossomas adultos são vermes brancos ou acinzentados medindo de 7-20mm de comprimento com corpo cilíndrico. O macho possui uma cavidade ou canal ginecóforo, onde a fêmea, que é mais longa e fina, se aloja. Como casais, os esquistossomas vivem nas veias mesentéricas.

Alimentam-se de sangue e globulinas através de glicólise anaeróbica (GRYSEELS et al., 2006; MATTOS et al., 2007).

O ciclo de vida dos esquistossomas é complexo, envolvendo uma fase de reprodução sexuada no hospedeiro definitivo, o homem, e uma fase assexuada no hospedeiro intermediário, o caramujo. Os humanos se infectam durante atividades ocupacionais ou recreativas em ambientes aquáticos infectados. As fêmeas produzem centenas de ovos por dia e cada ovo contém um miracídio, larva ciliada, que secreta enzimas proteolíticas, as quais ajudam os ovos a migrarem para dentro do intestino dos humanos. Parte dos ovos é excretada nas fezes e podem permanecer viáveis por 7 dias. Em contato com a água, o ovo libera o miracídio que infecta um caramujo e multiplica-se assexuadamente dentro dele, originando as cercárias, capazes de aderir e penetrar através da pele humana intacta. A cercária começa a deixar o caramujo 4-6 semanas após a infecção e permanece na água por 72h procurando a pele de um hospedeiro definitivo. O *S. mansoni* é transmitido pelo caramujo *Biomphalaria* (GRYSEELS et al., 2006; UTZINGER et al., 2001).

Após a entrada percutânea no hospedeiro, a cercária se transforma em esquistossômulos e altera a bioquímica de sua superfície permitindo que eles escapem do sistema imune do hospedeiro. Um dia após a penetração das cercárias, os esquistossômulos são encontrados nos pulmões e, em nove dias, eles migram para o fígado, onde se alimentam e se desenvolvem, alcançando a vida adulta. Os vermes adultos finalmente atingem as veias mesentéricas,

principalmente a inferior no caso do *S. mansoni*, onde iniciam a produção de ovos (Figura 1) (FRÉZARD et al., 2005; GRYSEELS et al., 2006).

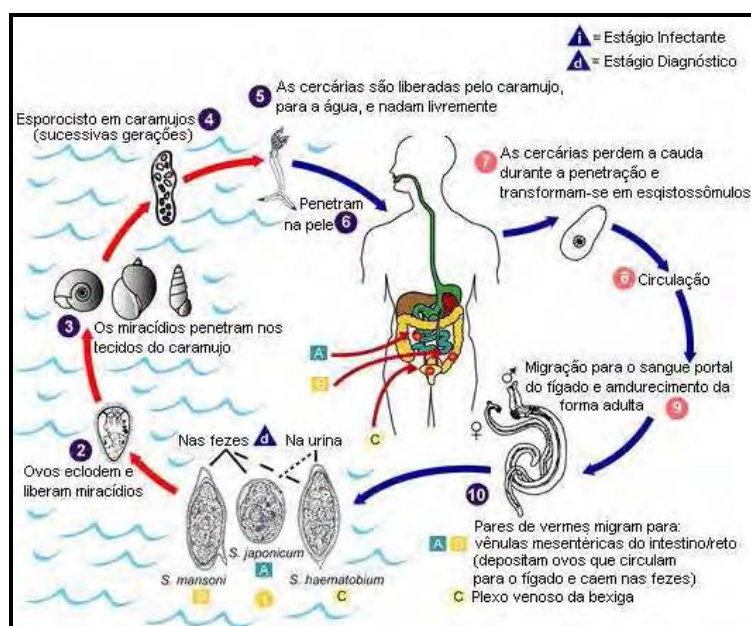


Figura 1: Ciclo de vida do *Schistosoma*. Disponível em: [http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/Schistosomiasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/Schistosomiasis_il.htm).

Muitos pacientes curam-se espontaneamente após 2-10 semanas, mas alguns desenvolvem doença crônica com perda de peso, dispnéia, diarreia, dores abdominais difusas, lesões intestinais com pólipos colônicos, fibroses focais, hipertensão portal, ascite e hepatoesplenomegalia. As principais lesões apresentadas nas infecções crônicas são devido à formação de granulomas ao redor dos ovos do parasita no fígado e também em outros órgãos do hospedeiro. Os ovos secretam enzimas proteolíticas que provocam eosinofilia típica e reações granulomatosas, que são progressivamente substituídas por

depósito fibrótico (Figura 2) (GRYSEELS et al., 2006; MODHA et al., 1998; UTZINGER et al., 2001; VAN DER WERF et al., 2003; WAHL et al., 1997).



Figura 2: (A) Granuloma íntegro do fígado ao redor dos ovos de *Schistosoma mansoni* no fígado de um camundongo infectado experimentalmente contendo muitas células, principalmente eosinófilos e linfócitos, e alguns macrófagos; células vermelhas grandes são os hepatócitos intactos. (B) Granuloma degenerado do fígado ao redor dos restos de ovos de *Schistosoma* no fígado de camundongo, com tecido fibrótico dominante (cor azul) (GRYSEELS et al., 2006).

Crianças são especialmente vulneráveis à esquistossomose e quando infectadas na idade escolar são freqüentemente comprometidas psicológica e intelectualmente (WHO, 2002).

Devido ao complexo ciclo de vida dos esquistossomas, as primeiras técnicas racionais para o controle da doença só foram desenvolvidas em 1910. No início o controle da transmissão se deu através de medidas ambientais e pelo uso de produtos químicos com propriedades moluscocidas para reduzir a quantidade dos caramujos. Entretanto, o alto custo, os efeitos adversos para o

ambiente e a necessidade de aplicações repetidas por pessoas habilitadas inviabilizou esta medida (UTZINGER et al., 2001).

O tratamento medicamentoso da esquistossomose sempre foi limitado, pela dificuldade de serem encontrados quimioterápicos que exibissem alta eficácia e grande tolerabilidade. Os primeiros fármacos utilizados foram os compostos antimoniais - tartarato de potássio, tártaro emético - introduzidos em 1918, seguidos pelo dimercaptossuccinato de sódio e o di-(pirocatecol-2,4-dissulfonato) de sódio, conhecido como estibofeno. Apesar de serem eficazes contra as três principais espécies do gênero *Schistosoma*, o *S. mansoni*, o *S. haematobium* e o *S. japonicum*, deixaram de ser usados no tratamento desta helmintose por ocasionarem inúmeros efeitos colaterais, como a trombocitopenia e outras discrasias sanguíneas. Um período de intenso progresso na terapia da esquistossomose teve início em 1960 com o surgimento do niridazol, hicantona, oxamniquina e metrifonato. A hicantona, eficaz especificamente contra o *S. mansoni* e o *S. haematobium* e o niridazol, eficaz contra o *S. haematobium* e o *S. japonicum*, não são mais utilizados na terapia medicamentosa da esquistossomose, por apresentarem reações adversas graves, tais como lesões hepáticas e renais, convulsões, psicoses, alucinações visuais e auditivas, estados confusionais e outros efeitos indesejáveis sobre o sistema nervoso central. Em 1970, foram descobertos o amoscanato, o oltipraz e o praziquantel (MOURÃO, 2001; NOVAES; SOUZA, ARAÚJO, 1999).

Atualmente, no Brasil, apenas dois fármacos esquistossomicidas são utilizados, a oxamniquina e o praziquantel. A oxamniquina é ativa somente contra *S. mansoni* e apresenta efeitos colaterais no sistema nervoso central, efeitos mutagênicos e carcinogênicos (FERRARI et al., 2003; MOURÃO, 2001; SHAOHONG et al., 2006). Sua distribuição não é adequada, uma vez que a única indústria farmacêutica que o produz e comercializa mantém sua produção reduzida (KUSSEL; HAGAN, 1999).

Assim, o praziquantel é atualmente o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose. É altamente efetivo contra as cinco espécies de *Schistosoma* que infectam o homem, tem pouco ou nenhum efeito adverso e nos últimos anos, seu preço tem sido reduzido substancialmente (JEZIORSKI, GREENBERG, 2006; SHAOHONG et al., 2006; SHUHUA, 2005; UTZINGER et al., 2001). Na Tabela 1 estão indicados os fármacos esquistossomicidas conhecidos.



Tabela 1: Compostos com propriedades esquistossomicidas (AGTMAEL; EGGELTE; BOXTEL, 1999; CIOLI, 1998; FENWICK et al., 2003; UTZINGER et al., 2001).

Data	Compostos	Observações
1918	Antimoniais	Altamente tóxico
1920	Emetina	Moderadamente efetivo: tóxico
1960	Metrifonato	Ainda em uso para o <i>S. haematobium</i>
1962	Nitrofuranos	Moderadamente efetivo
1962	Lucantona	Substituído pela hicantona
1964	Niridazol	Oral; moderadamente efetivo
1965	Hicantona	Descontinuado pela mutagenicidade
1969	Oxamniquina	Efetivo somente contra <i>S. mansoni</i>
1971	Tubercidina	Testado somente em animais
1976	Amoscanato	Amplamente testado na China; tóxico
1977	Praziquantel	Fármaco de escolha para todas as esquistossomoses
1978	Ro 11-3128	Benzodiazepínico: efetivo em vermes imaturos
1978	Oltipraz	Retirado por causar problemas na unha
1981	Ciclosporina A	Somente testes laboratoriais; profilático
1984	9-Acridanona-hidrazona	Ativo em animais; nenhum teste em humanos
1980	Artemisinina	Apresenta atividade esquistossomicida, entretanto sua aplicação clínica é limitada pela baixa solubilidade em água e óleo
1996	Arteméter e artesunato	Demonstram atividade contra as formas jovens das espécies de <i>Schistosoma</i>

## PRAZIQUANTEL

O praziquantel (PRZ) foi descoberto em 1972 na Alemanha como resultado da pesquisa realizada pelas indústrias E. Merck e Bayer A. G e em 1978, o PRZ foi sintetizado na China (NOVAES; SOUZA; ARAÚJO, 1999; SHUHUA, 2005). É um anti-helmíntico pertencente à classe das pirazinoisoquinolonas que foi introduzido no tratamento da esquistossomose (FERRARI et al., 2003; GREENBERG, 2005).

Tem sido estudado experimentalmente em animais desde 1975, mostrando-se altamente eficaz contra todas as espécies do gênero *Schistosoma* que parasita os humanos além de ser efetivo contra outras infecções por trematódeos e cestódeos (GREENBERG, 2005; NOVAES; SOUZA; ARAÚJO, 1999). Tornou-se o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose na maioria das áreas endêmicas devido à sua eficácia, facilidade de administração, efeitos colaterais bem tolerados e baixo custo (CIOLI, 1998).

Este fármaco é comumente encontrado como uma mistura racêmica (1:1 na mistura de enantiômeros), em que o R-(-)-enantiômero, ou *levo*, é ativo, enquanto que o S-(+)-enantiômero, ou *dextro*, é inativo (CIOLI, 1998; FENWICK et al., 2003; GREENBERG, 2005).

Quimicamente, o PRZ (Figura 3) é a 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1a] isoquinolina-4-ona (SHUHUA, 2005).

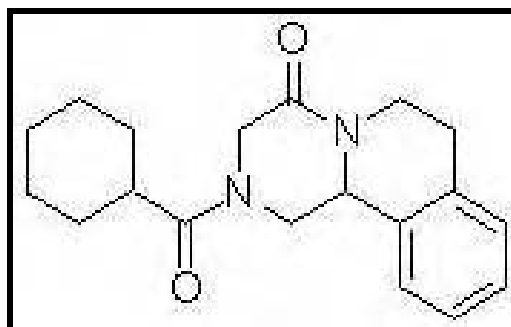


Figura 3: Estrutura química do PRZ (PM=312,41).

Segundo a literatura, o PRZ é ativo contra esquistossômulos nos dois primeiros dias após a penetração da cercária através da pele e contra os vermes adultos, afetando principalmente a fêmea do parasita. Após este tempo, e por um período de aproximadamente quatro semanas, o PRZ não é mais efetivo e então os parasitas podem continuar seu desenvolvimento, progredindo a vermes adultos, podendo haver a eliminação de ovos de vermes que se desenvolveram após a administração do PRZ. Quando o tratamento é repetido, a eficácia do fármaco aumenta, indicando que os vermes imaturos são capazes de sobreviver à exposição ao PRZ (FERRARI et al., 2003; GRYSEELS et al., 2006; HAGAN et al., 2004; PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004; SHUHUA et al., 2002; UTZINGER et al., 2001).

Apesar do mecanismo de ação não estar totalmente esclarecido, sabe-se que o PRZ interrompe a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ , agindo diretamente sobre a atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  e  $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ , causando espasmos e paralisia muscular nos vermes adultos. Além disso, há danos do tegumento revelados pela formação de vacúolos e depois vesículas. Microscopia de

transmissão eletrônica indica que mudanças estruturais dos tegumentos induzidos por PRZ ocorrem na seguinte seqüência: despolimerização de rede microtrabecular, seguida pela vacuolização e então erosão da superfície. Estes efeitos danificam a função do músculo e a estrutura tegumentar que resultam na morte do parasita (CIOLI, 1998; GREENBERG, 2005; ISMAIL et al., 1999; JIRAUNGKOORSKUL et al., 2006; NOVAES; SOUZA; ARAÚJO, 1999; TALLIMA; RIDI, 2007).

O PRZ é um fármaco com baixa solubilidade em água, o que representa um problema na biodisponibilidade da forma farmacêutica convencional, os comprimidos (MOURÃO et al., 2005). Estes problemas estão relacionados com a alta lipofilia deste fármaco e por isso várias alternativas para aumentar sua biodisponibilidade foram testadas.

Uma alternativa envolve o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos, oferecendo um ganho de tempo na fase de desenvolvimento do produto porque utilizam um fármaco já caracterizado do ponto de vista farmacológico (FRÉZARD et al., 2005). Entre os sistemas carreadores de fármacos atualmente disponíveis estão os lipossomas, as microemulsões, as nanopartículas, as dispersões sólidas e o cristal líquido.

As microemulsões apresentam grande potencial como sistemas de liberação de fármacos, pois podem aumentar a estabilidade termodinâmica e a solubilidade de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, além de aumentar a biodisponibilidade sem aumentar os efeitos colaterais sistêmicos (ÇILEK et al.,

2005; FORMARIZ et al., 2004; KIM et al., 2005; KOGAN; GARTI, 2006; LAWRENCE; REES, 2000; SARCIAUX; ACAR; SADO, 1995).

Os cristais líquidos também têm merecido destaque na liberação de fármacos. Podem ser considerados micelas ordenadas com arranjo molecular caracterizada por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas. Os fármacos, quando incorporados nesses sistemas, poderão residir nessas duas regiões e também na bicamada de tensoativo da mesofase, dependendo da solubilidade do fármaco (URBAN, 2004).

As dispersões sólidas são definidas como misturas moleculares de fármacos pobremente solúveis em água dispersos em uma matriz biologicamente inerte, com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade oral destes fármacos (CRAIG, 2002; LIMA, 2006; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

As nanopartículas poliméricas são esferas matriciais sólidas (nanoesferas) ou pequenas cápsulas, em que um núcleo central é delimitado por uma membrana polimérica (nanocápsulas). Os fármacos podem estar encapsulados, dissolvidos/dispersos ou adsorvidos na partícula (LOPES, 2000; MAINARDES et al., 2006).

Os lipossomas ocupam uma posição de destaque entre os sistemas de liberação de fármacos atualmente disponíveis. Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que a incorporação do PRZ em lipossomas melhorou sua solubilidade em sistemas aquosos sem, contudo, alterar sua

eficácia *in vitro* contra *S. mansoni* da linhagem LE (CINTO, 2005; MOURÃO, 2001). Em estudos *in vivo*, lipossomas de fosfatidilcolina contendo PRZ foram mais efetivos que o fármaco disperso em meio aquoso, obtendo-se redução significativa do número de ovos e vermes de *S. mansoni* LE em camundongos (MOURÃO et al., 2005).

## **LIPOSSOMAS**

Os lipossomas foram primeiramente descritos por Banghan na Inglaterra em 1961 e, desde então, têm contribuído para elucidar os mecanismos biológicos envolvidos na interação de lipídio com membranas biológicas, pois podem reproduzir de forma simplificada alguns fenômenos que ocorrem no meio biológico (GIANNANTONI et al., 2006; GREMIÃO; CELLI; CHAIMOVICH, 1996; XIAOMEI; ZHENSHENG, 2006). Além disso, os lipossomas têm sido extensivamente estudados pelo seu uso em potencial como carreador de fármacos, proteínas, nucleotídeos e até plasmídeos (CARAFA et al, 2006; GIANNANTONI et al., 2006).

Lipossomas são estruturas esféricas constituídas por moléculas anfifílicas que contêm duas cadeias hidrofóbicas e uma cabeça hidrofílica. Apresentam uma cavidade aquosa interna, envolvida por uma bicamada lipídica (Figura 4) (EDWARDS; BAEUMNER, 2006; GIANNANTONI et al., 2006; SEGOTA; TEZAK, 2006; SILER-MARINKOVIC et al., 1997; SULKOWSKI et al., 2005).

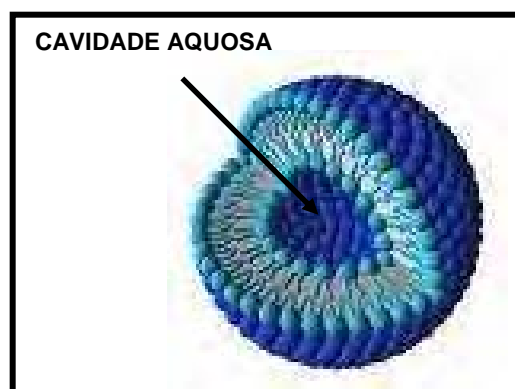
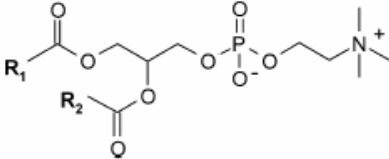
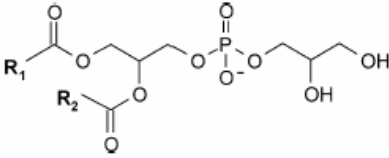


Figura 4: Esquema de um lipossoma.

Uma grande vantagem dos lipossomas é a sua elevada biocompatibilidade por serem constituídos de fosfolípidios idênticos aos fosfolípidios que constituem a membrana celular (FRÉZARD et al., 2005; SEGOTA; TEZAK, 2006). O principal fosfolípido utilizado é a fosfatidilcolina (PC), fosfolípido mais comum nas membranas naturais, mas os lipossomas podem ser obtidos a partir de qualquer substância anfílica formadora de bicamada. Muitos dos fosfolípidios são zwitteriônicos (Tabela 2).

Tabela 2: Exemplos de lipídios formadores de bicamada utilizados para formação de lipossomas (BILEK et al., 2006; FRÉZARD et al., 2005).

Família de Lipídios Fórmula Estrutural	R (cadeia hidrofóbica) Nome	Abreviação
<p data-bbox="300 633 584 667">Fosfatidilcolina (PC)</p> 	<p data-bbox="676 528 1150 613">CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-C(O)- (oleil)</p> <p data-bbox="783 645 1043 730">CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-C(O)- (miristoil)</p> <p data-bbox="783 761 1043 846">CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-C(O)- (palmitoil)</p> <p data-bbox="783 878 1043 963">CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-C(O)- (estaroil)</p>	<p data-bbox="1225 555 1310 589">DOPC</p> <p data-bbox="1225 674 1310 707">DMPC</p> <p data-bbox="1225 786 1310 819">DPPC</p> <p data-bbox="1225 898 1310 931">DSPC</p>
<p data-bbox="288 992 595 1025">Fosfatidilglicerol (PG)</p> 	<p data-bbox="783 992 1043 1077">CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-C(O)- (miristoil)</p> <p data-bbox="783 1108 1043 1193">CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-C(O)- (palmitoil)</p>	<p data-bbox="1225 1014 1310 1048">DMPG</p> <p data-bbox="1225 1137 1310 1171">DPPG</p>






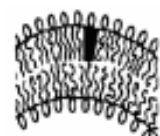


A organização dos tensoativos em solução é devido às suas propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas e a forma como as moléculas anfifílicas se associam é dependente da sua estrutura molecular e influenciada pelo parâmetro de empacotamento (Tabela 3). O parâmetro de empacotamento,  $\rho$ , depende da superfície da cabeça polar ( $a_h$ ), volume da cauda ( $v_t$ ) e comprimento da cadeia do tensoativo ( $l_{c,t}$ ) (SEGOTA; TEZAK, 2006):

$$\rho = v_t / a_h \cdot l_{c,t}$$

Equação 1



Tabela 3: Parâmetros de empacotamento e estruturas polimórficas (SEGOTA; TEZAK, 2006).

Parâmetro de empacotamento	Forma	Estrutura esperada dos associados
$< 1/3$	Cone 	Micela esférica 
$1/3 - 1/2$	Cone truncado 	Micela cilíndrica 
$1/2 - 1$	Cone truncado 	Bicamada flexível, vesícula 
$\approx 1$	Cilindro 	Bicamada planar 

Segundo o conceito da geometria molecular, a formação de uma bicamada pode ser esperada no caso de  $p > 1/2$ . A formação de vesículas ocorre nos sistemas com parâmetros de empacotamento entre  $1/2$  e  $1$ , enquanto que a fase lamelar é formada quando  $p \approx 1$  (SEGOTA; TEZAK, 2006).

Devido às propriedades anfifílicas e característica estrutural dos lipossomas, substâncias podem ser incorporadas no compartimento interno aquoso, particionado dentro da bicamada lipídica ou entre estes dois

compartimentos e interagir covalentemente e eletrostaticamente com a cabeça polar dos lipídios (Figura 5) (EDWARDS; BAEUMNER, 2006; SILER-MARINKOVIC et al., 1997). Estas propriedades e a biodegradabilidade e não-toxicidade dos principais constituintes dos lipossomas fazem deles candidatos atrativos para serem usados como sistema carreador de fármaco (CARAFA et al, 2006; GIANNANTONI et al., 2006; MÜLLER; MACKEBEN; MÜLLER-GOYMANN, 2004; XIAOMEI; ZHENSHENG, 2006). Os lipossomas têm sido investigados e vários estudos clínicos têm demonstrado sua versatilidade para veicular uma larga variedade de fármacos utilizados na terapia.

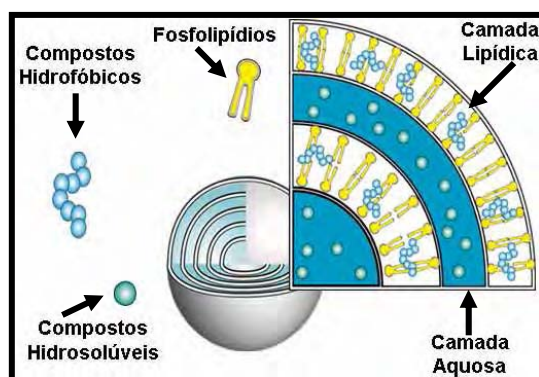


Figura 5: Esquema de incorporação de fármacos em um lipossoma. Corte transversal de um lipossoma multilamelar.

Os lipossomas podem ser caracterizados por seu tamanho, número de lamelas e carga de sua superfície. De acordo com a carga, são classificados em lipossomas aniônicos, catiônicos ou neutros. Com relação à forma, tamanho e número de lamelas, podem ser classificados como lipossomas

oligo-, uni- ou multilamelares, pequenos, grandes e gigantes, como representados esquematicamente na Figura 6.

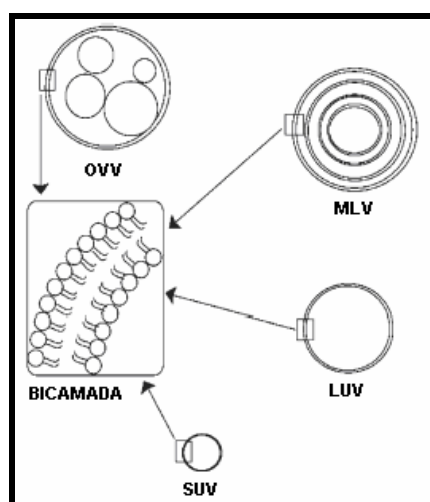


Figura 6: Representação esquemática dos lipossomas com relação à forma, tamanho e número de bicamadas; SUV = lipossoma unilamelar pequeno, LUV = lipossoma unilamelar grande, MLV = lipossoma multilamelar e OVV = lipossoma oligovesicular (SEGOTA; TEZAK, 2006).

Os lipossomas unilamelares consistem de apenas uma bicamada e podem ser de vários tamanhos: lipossomas unilamelares pequenos, SUV, com diâmetro de aproximadamente 25 a 100nm, lipossomas unilamelares grandes, LUV, com diâmetro entre 100nm e 1 $\mu$ m, bem como os lipossomas unilamelares gigantes, GUV, com dimensões superiores a 1 $\mu$ m, podendo chegar a dezenas de  $\mu$ m, tamanho comparável ao de uma célula eucariota (BILEK et al., 2006; SANTOS; CASTANHO, 2002). Os lipossomas multilamelares, MLV, consistem de muitas lamelas concêntricas exibindo uma estrutura similar à de uma

cebola. Os lipossomas unilamelares são frequentemente encontrados em soluções diluídas de tensoativos, enquanto que os lipossomas multilamelares são encontrados em sistemas mais concentrados (SEGOTA; TEZAK, 2006).

A curvatura da bicamada pode ser mudada para alterar as formas dos lipossomas sob intumescimento controlado, faixa de temperatura e pressão e adição de vários co-tensoativos. Transição de estrutura com aumento da concentração está representada esquematicamente na Figura 7.

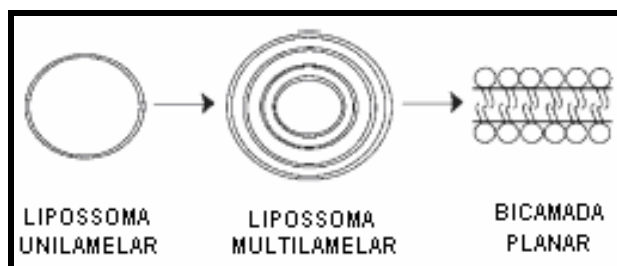


Figura 7: Esquema representativo da transição de estrutura com aumento da concentração – lipossoma unilamelar → lipossoma multilamelar → bicamada planar (SEGOTA; TEZAK, 2006).

Como visto anteriormente, os lipossomas são utilizados como sistemas carreadores de fármacos por possuírem a capacidade de encapsular diversos agentes terapêuticos, independentemente da sua carga ou massa molecular (SANTOS; CASTANHO, 2002). A encapsulação de fármacos em lipossomas pode alterar sua farmacocinética, reduzir a distribuição inespecífica minimizando os efeitos tóxicos e aumentando a eficácia terapêutica (EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

## **2.1. Objetivo Geral**

Desenvolver e caracterizar dispersões lipídicas contendo praziquantel em doses superiores às comumente utilizadas, avaliar sua eficácia *in vivo* contra a cepa tolerante BH e avaliar o efeito da concentração de PC no transporte de PRZ através da membrana intestinal empregando o modelo do saco intestinal invertido.

## **2.2. Objetivos Específicos**

- Desenvolvimento e caracterização das dispersões lipídicas;
- Avaliação do efeito do praziquantel veiculado em dispersões lipídicas no tratamento de camundongos infectados com a linhagem BH nos diferentes estágios de desenvolvimento do *S. mansoni*;
- Avaliação dos efeitos destas formulações na absorção intestinal do praziquantel.

### **3.1. MATERIAIS**

#### **3.1.1. Substâncias e Reagentes**

- Acetonitrila (J. T. Baker<sup>®</sup> grau CLAE);
- Água deionizada Milli-Q;
- Clorofórmio (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda.);
- Etanol absoluto (Merck S. A. grau CLAE);
- Éter (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda.);
- Fosfatidilcolina de Soja, Epikuron200<sup>®</sup> (Lucas Meyer);
- Praziquantel (Reiza-Kern, Lote 01170);
- TC 199 – Cloreto de sódio 145mM, cloreto de potássio 4,56mM, cloreto de cálcio diidratado 1,25mM, fosfato de sódio monobásico 5mM, pH 7,4;
- Tris (hidroximetil)aminometano (Aldrich).

#### **3.1.2. Equipamentos e Acessórios**

- Analisador de partículas *Light Scattering* – Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments;
- Equipamento para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Varian - mod. ProStar, com:
  - Duas bombas de injeção de solvente (Prostar<sup>®</sup>/Dynamax<sup>®</sup> 210/215);

- Detector espectrofotométrico com fotodiodo (Prostar<sup>®</sup> 330 UV-VIS PDA);
- Forno controlador de temperatura da coluna;
- Sistema de integração Star;
- Sistema de injeção (Rheodyne<sup>®</sup> VS 7125) – loop de 100µL;
- Coluna de octadecilsílica para CLAE (25cm x 5µm de tamanho de partícula) – Varian<sup>®</sup>;
- Gerador de raios X de anodo rotatório – Rigaku-Denki;
- Microscópio Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena;
- Reômetro TA Instruments – mod. Carri-Med CSL 100;
- Sonicador Sonicator – Ultrasonic Liquid Processor, Heat Systems - mod. XL 2020 – potência 600W utilizando-se aproximadamente 20% dela.

### **3.1.3. Animais**

- Camundongos *Mus musculus*, linhagem Swiss-SPF, fêmeas com 30 dias, provenientes do CEMIB – Departamento de Parasitologia – Instituto de Biologia – UNICAMP – Campinas, SP. Protocolo do Comitê de Ética: 1117-1;
- Ratos albinos, linhagem Wistar, machos adultos, 210-250g, provenientes do Laboratório Anilab de Paulínia – SP e do Biotério Central – UNESP – Botucatu, SP.

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Preparo das Dispersões Lipídicas**

As dispersões lipídicas contendo apenas fosfatidilcolina de soja (PC) foram preparadas pelo método de sonicação. A partir de uma solução clorofórmica de PC foi obtido um filme lipídico pela evaporação do solvente em rotaevaporador e, posteriormente, mantido em dessecador sob vácuo por 2 horas para eliminação máxima dos resíduos de clorofórmio. Ao filme formado foi adicionada solução tampão Tris/HCl 20mM pH 7,5 para hidratação e mantido em repouso à temperatura ambiente por 40 minutos. Após este tempo, a dispersão foi agitada em vortex até total desprendimento da parede do balão e em seguida, colocada em banho de gelo e submetida à sonicação utilizando pulso de 1 min com intervalo de 1 min entre eles. Ao final do processo, a dispersão obtida foi centrifugada a 352g por 10 min para remoção dos resíduos de titânio liberados da haste do sonicador.

Na preparação de dispersões lipídicas de PC contendo PRZ, o fármaco foi dissolvido na solução clorofórmica de PC. As etapas subseqüentes do processo de obtenção foram as mesmas empregadas na preparação das dispersões lipídicas sem o fármaco. O tempo padronizado para a sonicação das formulações compostas por PC, com ou sem PRZ, foi de 25 min conforme preconizado por CINTO, 2005. A Figura 8 representa um esquema de preparação das dispersões lipídicas.



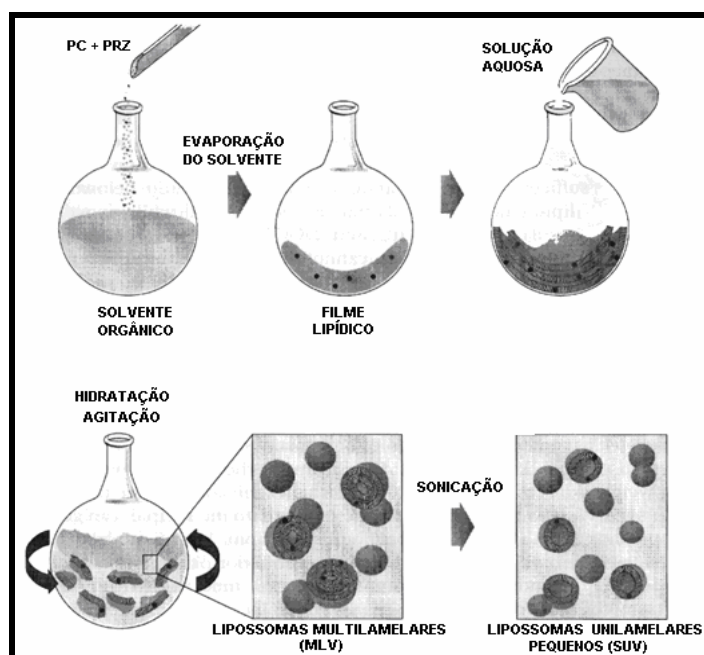


Figura 8: Esquema da preparação de dispersões lipídicas. Adaptado de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com).

A nomenclatura utilizada seguirá o seguinte padrão: dispersões lipídicas contendo apenas PC serão representadas por L-PC x e dispersões lipídicas de PC contendo PRZ, L-PRZ x/y, em que x é a concentração molar de PC e y é a concentração molar de PRZ utilizadas na preparação de cada formulação.

### 3.2.2. Caracterização das Dispersões Lipídicas

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

A evolução estrutural das amostras em função do teor da concentração de PC e PRZ foi analisada por SAXS. Os dados foram coletados na estação de

medidas D11-A SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo - Brasil, que é equipado com um monocromador do tipo Si (111). As amostras foram colocadas em uma cela à temperatura ambiente. O espalhamento parasita, espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra, foi subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades de todas as amostras foram medidas em unidades relativas, mas para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

### **3.2.2.2. Determinação do comportamento viscoelástico das formulações**

O comportamento viscoelástico das amostras foi analisado por medidas reológicas utilizando-se um reômetro de tensão controlada Carri Med CSL 100 (TA Instruments), localizado no Laboratório de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

Para as formulações menos viscosas foi utilizado um dispositivo cone – placa de 60mm de diâmetro, 1 grau de inclinação e distância mínima entre a placa e o cone de 28 $\mu$ m. Já para as formulações mais viscosas utilizou-se um dispositivo de placas paralelas com diâmetro igual a 20mm e espaçamento entre as placas igual a 100 $\mu$ m. A temperatura foi mantida constante a 25,0  $\pm$  0,5°C com o auxílio de um dispositivo “Peltier”. Todas as amostras foram mantidas em repouso por 2 minutos antes de iniciar as medidas. As

propriedades reológicas destes sistemas foram avaliadas por ensaios de escoamento e solicitações oscilatórias.

No ensaio de escoamento foi realizado um estudo de tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento na região de 0 a 400Pa. O intervalo de tempo utilizado foi de 3 minutos.

Nos ensaios reológicos por solicitação oscilatória, as medidas foram realizadas em função da frequência na região de 0,1 a 30Hz, aplicando uma tensão oscilatória constante de 10Pa (região de viscoelasticidade linear).

### **3.2.2.3. Determinação do diâmetro médio das formulações**

O diâmetro médio das formulações foi determinado através de equipamento de espalhamento dinâmico da luz (*Dinamyc Light Scattering*), localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Sistemas de Liberação Micro e Nanodispersos de Fármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto.

Os frascos foram colocados na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A luz espalhada foi captada por um fotomultiplicador posicionado a 90° do feixe do laser, que aumenta o sinal captado e o envia para um sistema correlator onde os cálculos foram processados e enviados ao computador. A temperatura do sistema foi mantida a 20°C.

O diâmetro médio das dispersões lipídicas e o índice de polidispersidade das preparações foram analisados.

#### **3.2.2.4. Microscopia de Luz Polarizada**

As formulações preparadas foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio sob luz polarizada (Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena), localizado no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.

#### **3.2.3. Estudo *in vivo* com camundongos Swiss-SPF infectados por *Schistosoma mansoni***

A linhagem de *S. mansoni* utilizada foi a BH (oriunda de Belo Horizonte, MG), mantida no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Unicamp em moluscos *Biomphalaria glabrata*.

Os planorbídeos com 6 a 10 mm de diâmetro foram infectados com miracídios obtidos das fezes de camundongos infectados e, após 35 a 40 dias de infecção, os moluscos foram expostos à luz e temperatura de 28° C para eliminação de cercárias. Estas cercárias foram utilizadas na infecção de fêmeas de camundongos *Mus musculus* da linhagem Swiss-SPF com 30 dias de idade, através do método da imersão caudal em suspensão cercariana (70 cercárias por camundongo) durante 2h (OLIVIER; STIREWALT, 1952; ZUIM, 2003).

Os camundongos foram divididos em dois grandes grupos, um deles recebeu o tratamento após 30 dias de infecção (verme adulto jovem) e o outro após 45 dias (verme adulto). Em cada grupo, dez animais receberam uma determinada dose de PRZ disperso em Tampão Tris 20mM pH 7,5, outros dez animais receberam as mesmas doses de PRZ incorporado em dispersões lipídicas de fosfatidilcolina (L-PRZ) e os dez restantes receberam solução Tampão Tris/HCl 20mM pH 7,5 (grupo controle positivo). O tratamento foi feito via oral através de tubagem gástrica.

Foram testadas quatro diferentes doses de PRZ, 47, 60, 250 e 300mg/kg, incorporado ou não em dispersões lipídicas, sendo que para cada dose havia um grupo controle positivo.

A contagem de ovos por grama de fezes foi feito com os camundongos ainda vivos após 15 dias do tratamento pelo método de Kato-Katz, que consiste em uma simplificação do método de Kato, introduzida por KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972, em que uma pequena amostra de fezes é colocada sobre papel absorvente e deposita-se uma tela de nylon que comprimida com auxílio de uma espátula fez com que parte das fezes passasse através de suas malhas. Estas foram recolhidas com a espátula, colocadas sobre uma lâmina e pesadas. A lâmina foi sobreposta com uma lamínula de celofane (embebida em verde malaquita) e a preparação foi invertida realizando pressão com o polegar sobre a lâmina até a obtenção de um material uniforme.

Para preparar o oograma, os animais foram sacrificados por meio do deslocamento cervical após 15 dias do tratamento, e fragmentos do intestino delgado de cada camundongo foram retirados e os ovos nos seus diferentes estágios de desenvolvimento foram contados (ovos imaturos - 1º a 4º estágios, ovos maduros – 5º estágio e ovos mortos). Para a classificação dos estágios seguiu o critério proposto por PELLEGRINO et al., 1962. Foram analisados dez campos aleatórios no microscópio óptico com aumento de 100 vezes.

As porcentagens de eficiência foram calculadas conforme proposto por DELGADO et al. (1992), por meio da Equação 2, em que C é o Grupo Controle Positivo e x é o Grupo Tratado:

$$\% \text{ de eficiência} = [(C - x)/C] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa SAS (SAS Inc, 1996) e para tanto, foi utilizada a Análise da Variância e o Teste de Comparação Múltipla de Médias de Duncan, considerando estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de  $p \leq 0,05$  (PIMENTEL-GOMES, 2000).

### **3.2.4. Metodologia analítica utilizada para determinação do PRZ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Foi construída a curva de calibração do PRZ em solução tampão TC 199 pH 7,4. A partir de solução estoque de 1mg/mL de PRZ em etanol, foram preparadas diluições correspondentes às concentrações de 5, 10, 20, 30, 40,

50, 60, 70, 80, 90 e 100µg/mL. Cada concentração foi preparada em triplicata e as soluções resultantes foram filtradas em membrana de teflon (0,22µm) e analisadas por CLAE.

As condições cromatográficas empregadas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições cromatográficas utilizadas na análise do PRZ.

Parâmetro	Condição Cromatográfica
Coluna	Fase Estacionária: octadecilsilica – C <sub>18</sub> (250 x 4,6mm), tamanho de partícula – 5µm (Varian <sup>®</sup> - Chromsep <sup>®</sup> )
Deteção	Detector DAD (arranjo de diodos) UV – 215nm
Fase Móvel	Acetonitrila:Água (45:55, v/v)
Vazão	1mL/min
Volume de Injeção	100µL
Tempo de Corrida	20 min

### 3.2.5. Efeito da fosfatidilcolina de soja na absorção intestinal do praziquantel pelo método do saco intestinal invertido

A técnica do saco intestinal invertido foi utilizada para avaliar o efeito da PC na absorção intestinal do PRZ.

Ratos machos adultos (210-250g), mantidos em jejum por 8h, foram anestesiados com éter e o intestino delgado imediatamente dissecado, lavado com solução TC 199 a 10°C e colocado em meio de cultura para tecido (TC 199) na mesma temperatura e oxigenado (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> – 95:5). O intestino foi então gentilmente invertido com auxílio de uma haste flexível com sua extremidade protegida com um fino tecido de seda (mini brush), 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 do segmento intestinal fosse de 6 cm. Ao meio de incubação foi adicionado PRZ disperso em TC 199 ou incorporado em dispersões lipídicas (L-PRZ) (com razão molar PRZ/PC igual a 1:3 e 1:6). A incubação foi realizada a 37°C, sob agitação suave do sistema previamente oxigenado. Após o período de 60 min de incubação, as amostras presentes no interior do saco intestinal foram filtradas e analisadas por CLAE.



## 4.1. Caracterização das Formulações

As formulações apresentadas na Tabela 5 foram preparadas para caracterização por SAXS, reologia, espalhamento dinâmico de luz (*dinamyc light scattering*) e microscopia de luz polarizada.

Tabela 5: Composição das dispersões lipídicas preparadas para caracterização físico-química.

Formulações	PRZ		PC	
	mM	%	mM	%
L-PC 128	---	---	128,10	8,8
L-PC 256	---	---	256,02	16,1
L-PC 320	---	---	320,16	19,4
L-PC 384	---	---	384,12	22,4
L-PC 571	---	---	571,43	30,0
L-PRZ 128/21	21,35	0,6	128,10	8,7
L-PRZ 256/42	42,67	1,1	256,02	15,9
*L-PRZ 320/53	53,36	1,3	320,16	19,1
**L-PRZ 384/64	64,02	1,5	384,12	22,0

L-PC - Dispersões lipídicas de fosfatidilcolina de soja. L-PRZ - Dispersões lipídicas de fosfatidilcolina de soja contendo PRZ. \*L-PRZ 320/53 – Formulação empregada no estudo *in vivo* - Dose de 250mg/kg. \*\* L-PRZ 384/64 - Formulação empregada no estudo *in vivo* - Dose de 300mg/kg.

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

O SAXS foi utilizado para estudar a estrutura líquido-cristalina das diferentes dispersões lipídicas. As Figuras 9 e 10 apresentam as curvas de SAXS para as formulações sem PRZ (L-PC) e com PRZ (L-PRZ), respectivamente.

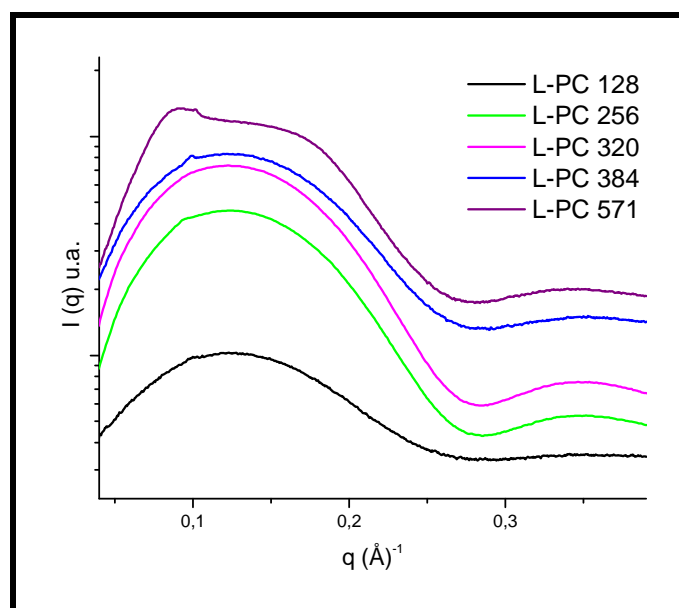


Figura 9: Curvas de SAXS para as dispersões lipídicas de PC sem PRZ (L-PC).

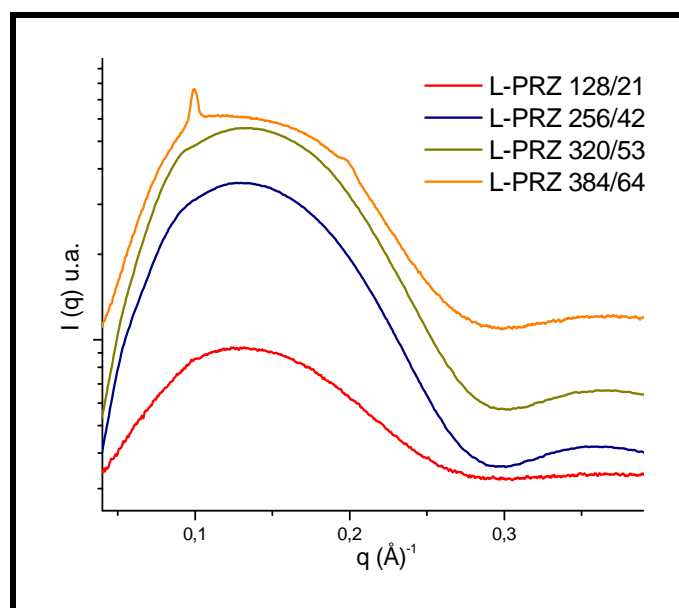


Figura 10: Curvas de SAXS para as dispersões lipídicas de PC contendo PRZ (L-PRZ).

As curvas de SAXS para as formulações L-PC 128, L-PC 256 e L-PC 320 apresentaram um único pico largo de correlação. A ausência de picos finos

e repetitivos indicam que estas estruturas são compostas por apenas uma bicamada (FLATEN et al., 2006; ZHANG et al., 1997). Já as formulações L-PC 384 e L-PC 571 apresentaram um pico mais estreito sobreposto a um pico largo de correlação, o que podem indicar um alto grau de ordem. Estes resultados demonstram que a concentração de PC na formulação influencia na estruturação dos sistemas.

As formulações L-PRZ 128/21, L-PRZ 256/42 e L-PRZ 320/53 apresentaram o mesmo comportamento que as formulações contendo as mesmas concentrações de PC mas sem o fármaco. Entretanto, a formulação L-PRZ 384/64 apresentou dois picos finos com razão entre  $d_2/d_1$  de aproximadamente 2, característico de arranjos lamelares, sobrepostos a um pico largo de correlação, podendo indicar a presença de vesículas unilamelares, vesículas multilamelares e/ou estruturas lamelares planares contidas no sistema.

#### **4.1.2. Estudo do comportamento viscoelástico das formulações**

O comportamento reológico descreve a deformação ou o escoamento de um corpo (sólido, líquido ou gás) sob a influência de uma tensão aplicada. Na área farmacêutica os ensaios reológicos são usados para as mais diversas finalidades, como avaliar a facilidade com que o material pode ser despejado em um frasco ou bombeado do equipamento em um processo industrial,

determinar o grau de “espalhabilidade” de um creme ou loção sobre a pele, entre outras.

O método é aplicável na caracterização de sistemas coloidais, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e o grau de organização dos sistemas.

A Figura 11 mostra a variação da tensão de cisalhamento em função do gradiente de cisalhamento das formulações com PRZ (L-PRZ) e sem PRZ (L-PC).

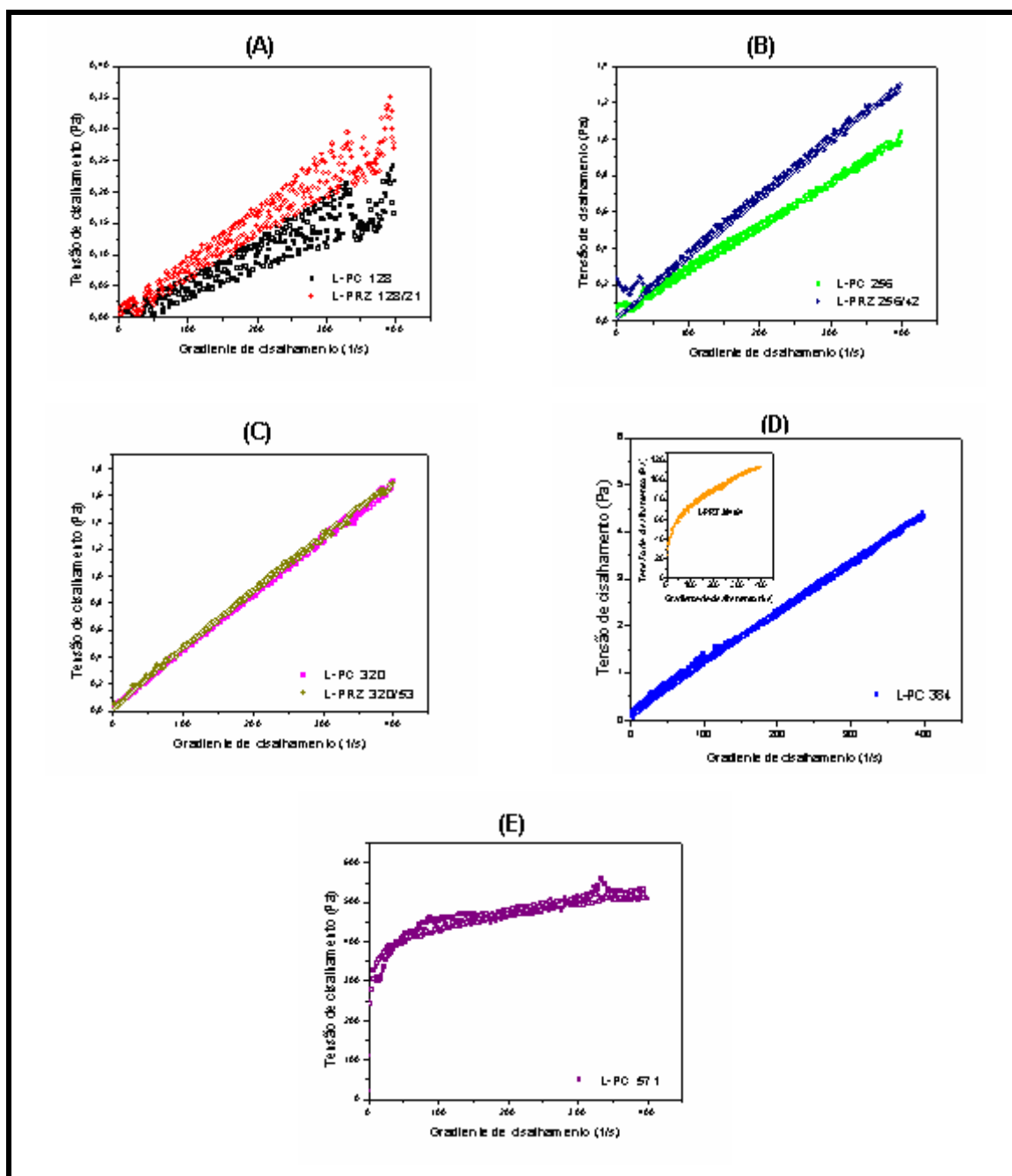


Figura 11: Variação da tensão de cisalhamento em função do gradiente de cisalhamento para as formulações sem PRZ (L-PC) e com PRZ (L-PRZ). (A) L-PC 128 e L-PRZ 128/21. (B) L-PC 256 e L-PRZ 256/42. (C) L-PC 320 e L-PRZ 320/53. (D) L-PC 384 e L-PRZ 384/64 (inserto). (E) L-PC 571.

Observa-se que as formulações contendo 8,8% (L-PC 128), 16,1% (L-PC 256), 19,4% (L-PC 320) e 22,4% (L-PC 384) de PC apresentam um comportamento muito próximo ao newtoniano, o qual pode ser confirmado pela relação linear entre a tensão e o gradiente de cisalhamento. Já com 30% de PC (L-PC 571), a formulação apresenta um comportamento não-newtoniano, pois exibe uma relação não-linear entre a tensão e o gradiente de cisalhamento. Devido à presença de uma tensão de escoamento, que é a tensão de cisalhamento máxima necessária para que o fluxo ocorra, o comportamento desta formulação também é denominado como plástico, indicando que nesta composição o aumento da concentração de PC leva à formação de uma rede estrutural que deve ser “quebrada” para que o fluxo ocorra.

As formulações L-PRZ 128/21, L-PRZ 256/42 e L-PRZ 320/53 também apresentaram comportamento newtoniano, entretanto, com apenas 22% de PC em presença de 1,5% de PRZ (L-PRZ 384/64), o sistema já apresentou um comportamento plástico, semelhante ao observado com a amostra L-PC 571.

Estes resultados sugerem que as variações no comportamento reológico das formulações estão diretamente relacionadas com a concentração de PRZ e PC.

Para confirmar estes resultados, a Figura 12, mostra a variação da viscosidade em função do gradiente de cisalhamento para as formulações sem e com PRZ. Nota-se que a viscosidade aumenta com a quantidade de PC

(Figura 12A). O mesmo comportamento é observado, quando o fármaco é adicionado (Figura 12B).

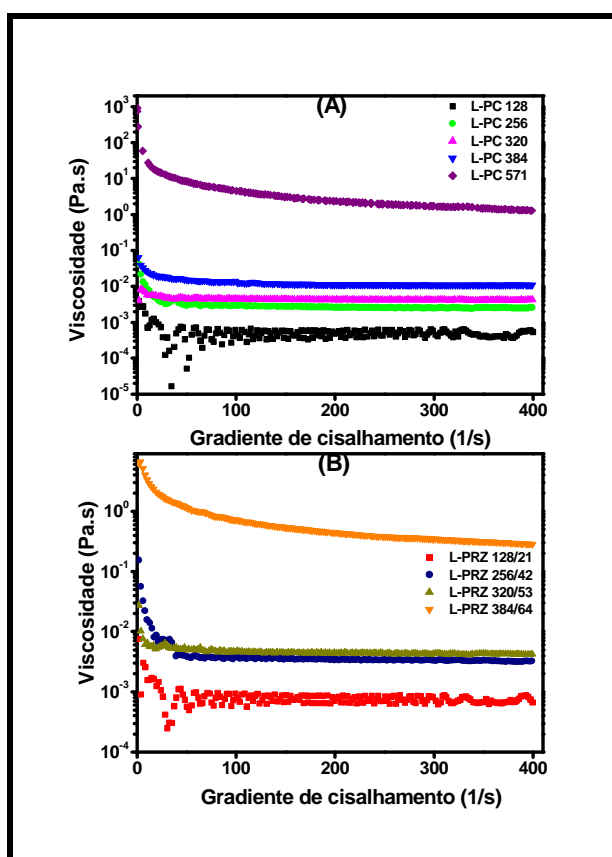


Figura 12: Variação da viscosidade em função do gradiente de cisalhamento para as formulações sem PRZ (A) e com (B) PRZ.

Informações importantes sobre a estrutura dos sistemas que apresentaram comportamento não-newtoniano podem ser obtidas por análises reológicas a partir da aplicação de solicitação oscilatória. Neste tipo de ensaio, a tensão de cisalhamento varia como uma onda senoidal e a relação entre as ondas de tensão aplicada e a deformação resultante fornecem informações

sobre os tipos de resposta (elástica ou viscosa) dos sistemas. A partir da razão destas duas grandezas, obtém-se o módulo elástico complexo  $G^*$ , em que o componente real do módulo elástico,  $G'$ , é denominado de módulo de armazenagem, porque representa a energia armazenada durante a deformação à tensão crescente e liberada quando a tensão é relaxada. A parte imaginária do módulo,  $G''$ , deve-se ao elemento viscoso que não pode armazenar energia, porque a tensão aplicada é dissipada na forma de deformação irreversível. Deste modo,  $G''$  é denominado módulo de perda e leva em conta esta dissipação de energia. Sendo assim, estudou-se a evolução temporal dos módulos de armazenagem ( $G'$ ) e perda ( $G''$ ) em função da frequência aplicada para as formulações que apresentaram comportamento plástico, L-PRZ 384/64 e L-PC 571.

A Figura 13 apresenta a evolução dos módulos de armazenagem,  $G'$ , e de perda,  $G''$ , do L-PRZ 384/64 e L-PC 571, respectivamente. Podemos observar a presença de  $G''$  com valores inferiores a  $G'$  em todo o intervalo de frequência estudado, sugerindo que essas amostras comportam-se como sólido com características predominantemente elásticas, pois  $G' > G''$ .



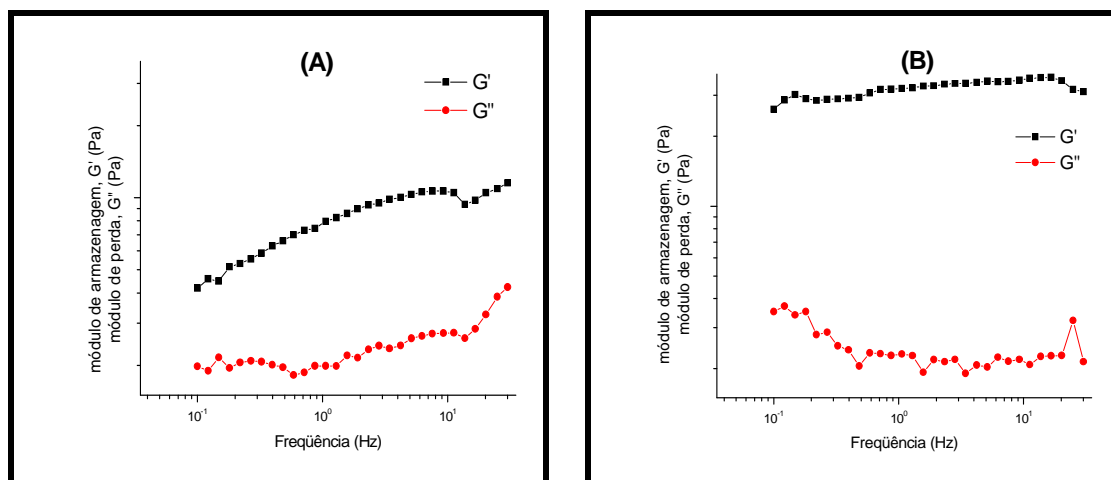


Figura 13: Evolução dos módulos de armazenagem ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) da L-PRZ 384/64 (A) e da L-PC 571(B).

A formulação L-PC 571 apresenta um grau de estruturação bem maior em relação a L-PRZ 384/64, pois além do  $G'$  ter várias ordens de grandeza maior que  $G''$ , ele é praticamente independente em função da frequência. Estes resultados revelam a presença de uma rede tridimensional consolidada na estrutura desta formulação.

#### 4.1.3. Determinação do diâmetro médio das dispersões lipídicas

A distribuição do diâmetro médio das dispersões lipídicas foi determinada por medida de espalhamento dinâmico de luz (*Dinamyc Light Scattering*). As formulações foram diluídas e o diâmetro médio e a polidispersidade foram calculados (Tabela 6).

As formulações L-PRZ 384/64 e L-PC 571 não foram analisadas devido a alta viscosidade.

Observa-se pela Tabela 6 e Figura 14 que as dispersões lipídicas apresentam diâmetro médio menor que 100nm, indicando que as formulações são compostas por lipossomas pequenos.

Tabela 6: Diâmetro médio e polidispersidade das dispersões lipídicas.

Formulações	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade
L-PC 128	64,6	0,214
L-PC 256	41,0	0,136
L-PC 320	45,7	0,204
L-PC 384	38,9	0,175
L-PRZ 128/21	43,8	0,267
L-PRZ 256/42	42,7	0,225
L-PRZ 320/53	55,6	0,360

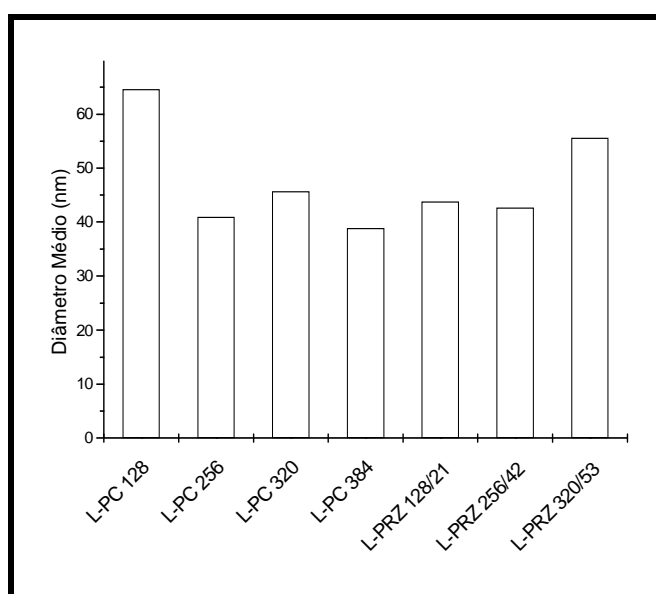


Figura 14: Diâmetro médio das dispersões lipídicas sem PRZ (L-PC) e com PRZ (L-PRZ).

#### 4.1.4. Microscopia de Luz Polarizada

A microscopia de luz polarizada é uma técnica que permite a classificação quanto à isotropia e anisotropia dos sistemas, permitindo diferenciar microscopicamente os diferentes tipos de estruturação. Os sistemas isotrópicos são aqueles que não desviam luz sob o plano de luz polarizada e são caracterizados por um campo escuro. Já os anisotrópicos desviam luz sob o plano de luz polarizada e apresentam diferentes comportamentos, como a presença de “cruzes de malta” que são características de estruturas de fase lamelar e/ou a presença de estrias características de estruturas que apresentam fase hexagonal.

As figuras 15 a 23 mostram as fotomicrografias das formulações sem PRZ (L-PC) e com PRZ (L-PRZ).



Figura 15: Fotomicrografia da formulação de L-PC 128.



Figura 16: Fotomicrografia da formulação de L-PRZ 128/21.

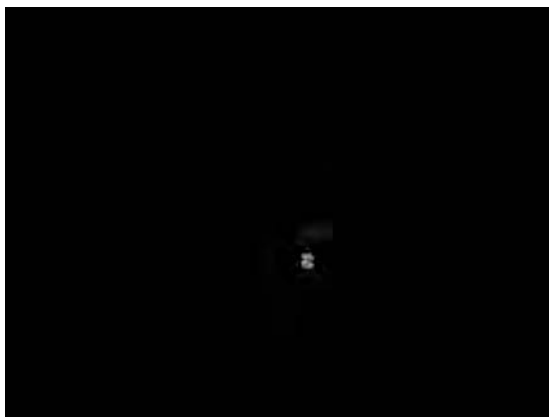


Figura 17: Fotomicrografia da formulação de L-PC 256.

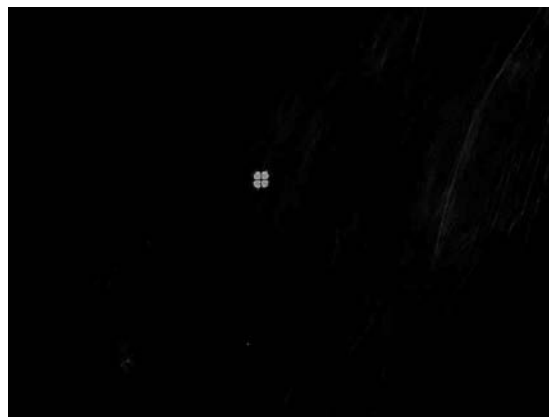


Figura 18: Fotomicrografia da formulação de L-PRZ 256/42.



Figura 19: Fotomicrografia da formulação de L-PC 320.

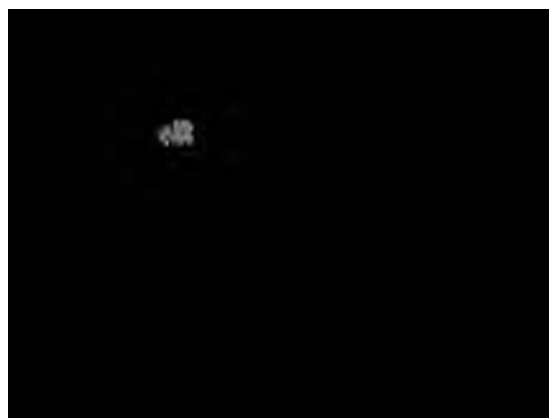


Figura 20: Fotomicrografia da formulação de L-PRZ 320/53.



Figura 21: Fotomicrografia da formulação de L-PC 384.

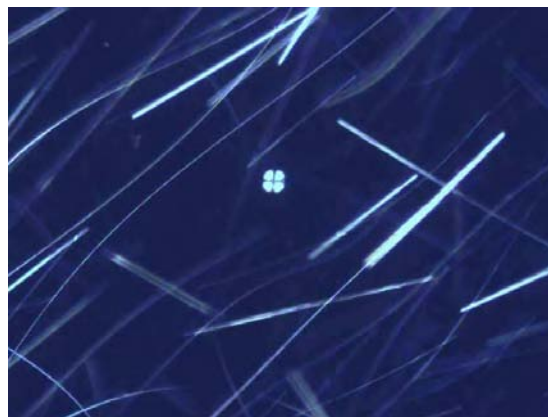


Figura 22: Fotomicrografia da formulação de L-PRZ 384/64.

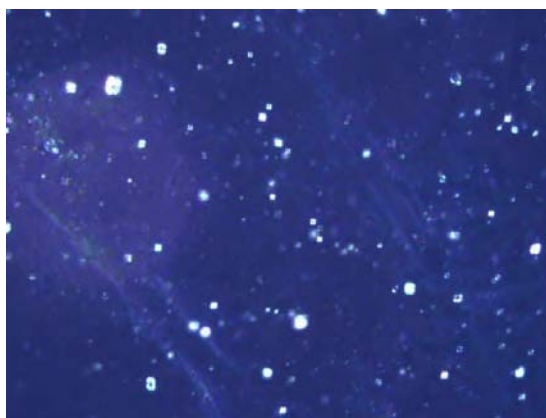


Figura 23: Fotomicrografia da formulação de L-PC 571.

Todas as fotomicrografias apresentadas revelaram a presença de “cruzes de malta”, características de arranjos lamelares. No entanto, a quantidade que estas “cruzes de malta” aparecem é proporcional a quantidade de PC utilizada na formulação, confirmando a influência da PC na estruturação dos sistemas. Estes resultados estão coerentes com os estudos reológicos em

que as formulações contendo maior quantidade de PC apresentaram maior viscosidade.

Na fotomicrografia do L-PRZ 384/64 (Figura 22) observa-se a presença de cristais, possivelmente do PRZ.

## **4.2. Estudos *in vivo* com camundongos *Swiss-SPF* infectados por *Schistosoma mansoni***

### **4.2.1. Quantidade de ovos por grama de fezes**

O tratamento feito após 30 dias da infecção com PRZ e L-PRZ nas doses de 47 e 60mg/kg não apresentaram diferença significativa.

O L-PRZ na dose de 250mg/kg administrado após 30 e 45 dias reduziu 99,17 e 89,27% a quantidade de ovos, enquanto que o tratamento feito com PRZ disperso em Tampão Tris na mesma dose reduziu apenas 78,05 e 14,78%, respectivamente.

Já o L-PRZ na dose de 300mg/kg administrado após 30 e 45 dias reduziu 98,17 e 98,07% a quantidade de ovos, enquanto que a mesma dose de PRZ disperso em Tampão Tris reduziu apenas 66,01 e 22,59%, respectivamente.

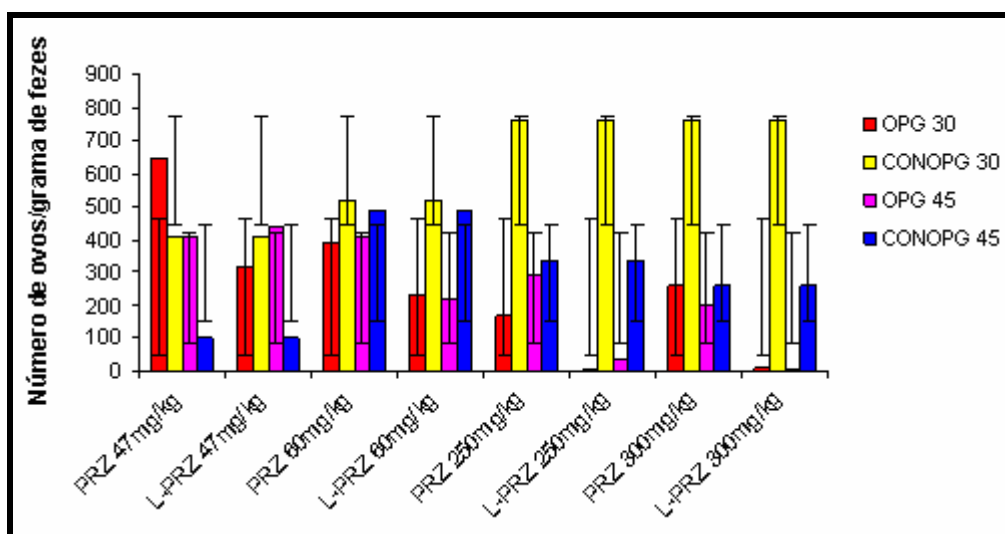


Figura 24: Quantidade de ovos por grama de fezes. OPG 30 ou OPG 45 – Ovos por grama de fezes nos grupos tratados aos 30 ou 45 dias após a infecção. CONOPG 30 ou CONOPG 45 – Ovos por grama de fezes nos Controles Positivos dos grupos tratados aos 30 ou 45 dias após a infecção.

#### 4.2.2. Oograma

Para o tratamento feito no 30º dia após a infecção, os camundongos tratados com PRZ nas doses de 60 e 250mg/kg e L-PRZ na dose de 300mg/kg foram os únicos que apresentaram uma diminuição na quantidade de ovos maduros, comparando com os oogramas das referidas doses. O L-PRZ na dose de 300mg/kg também reduziu a quantidade de ovos nos primeiros estágios de desenvolvimento (Tabela 7).

Tabela 7: Efeito das doses de PRZ e L-PRZ sobre os ovos de *S. mansoni*. Tratamento aos 30 dias após a infecção.

30 dias Dose (mg/kg)	Formulações Testadas	OOG			% de Eficiência
		IMAT n	MAD n	MORTOS n	
47	C	16,6	4,6	2,6	-
	PRZ	12,7	6,7	2,7	-
	L-PRZ	5,8	4	2,9	-
60	C	30,9	15,1	3,1	-
	PRZ	18,1	3,1*	2,9	24
	L-PRZ	17,3	8,5	1,5	55
250	C	25,1	14,1	0,5	-
	PRZ	15,5	3*	1,1	78
	L-PRZ	16,7	5,9	2,5	99
300	C	25,1	14,1	0,5	-
	PRZ	24,7	5	4	66
	L-PRZ	5,8*	0,9*	1,7	98

OOG – Oograma. IMAT – Ovos imaturos. MAD – Ovos maduros. MORTOS – Ovos Mortos. C – Grupo Controle Positivo. n – Média. \* $p \leq 0,05$ .

Já no tratamento feito após 45 dias da infecção, os camundongos tratados com PRZ na dose de 47mg/kg e L-PRZ nas doses de 250 e 300mg/kg foram os que apresentaram uma redução maior na quantidade de ovos imaturos. O L-PRZ na dose de 300mg/kg também diminuiu a quantidade de ovos maduros (Tabela 8).



Tabela 8: Efeito das doses de PRZ e L-PRZ sobre os ovos de *S. mansoni*. Tratamento aos 45 dias após a infecção.

45 dias Dose (mg/kg)	Formulações Testadas	OOG			% de Eficiência
		IMAT n	MAD n	MORTOS n	
47	C	29,1	14	1,8	-
	PRZ	12,9*	7,1	4,7	-
	L-PRZ	31,5	11,6	2,2	-
60	C	20,9	21,1	0,5	-
	PRZ	21,6	20,3	1,3	16,7
	L-PRZ	25	17,7	1,5	55,1
250	C	21,7	15,28	2,9	-
	PRZ	18,8	14,68	3,6	17,7
	L-PRZ	8,58*	4,5	2,2	89,2
300	C	25,8	17,1	2,6	-
	PRZ	10,5	8,8	5,8	22,7
	L-PRZ	3,1*	5*	1,9	98

OOG – Oograma. IMAT – Ovos imaturos. MAD – Ovos maduros. MORTOS – Ovos Mortos. C – Grupo Controle Positivo. n – Média. \*p<0,05.

### 4.3. Avaliação da absorção intestinal do praziquantel

#### 4.3.1. Metodologia analítica empregada para determinação do PRZ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A determinação do PRZ foi feita por CLAE e os cromatogramas referentes à amostra de TC 199 adicionado de PRZ, amostra de PRZ contido no interior do saco intestinal invertido e amostra de PRZ presente no meio de incubação estão apresentados nas Figuras 25 a 27.

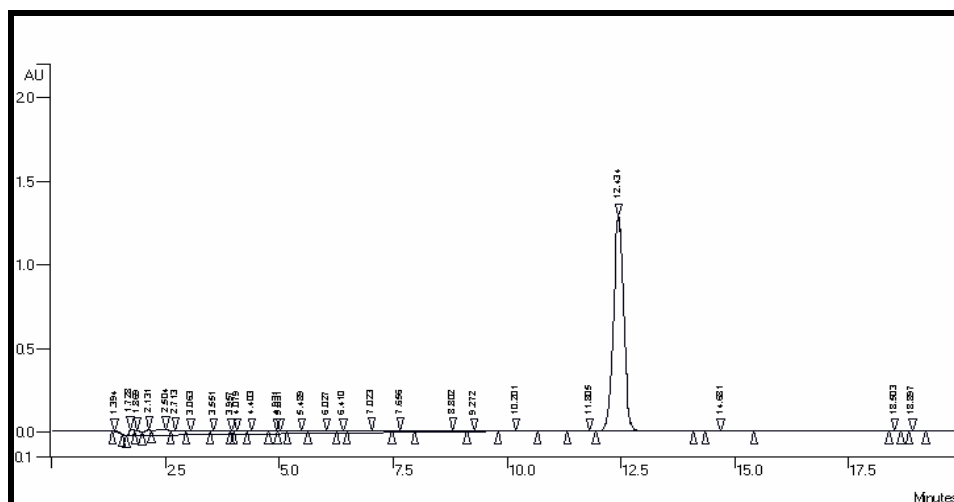


Figura 25: Cromatograma, em 215nm, referente à solução de TC 199 contendo 50µg/mL de PRZ.

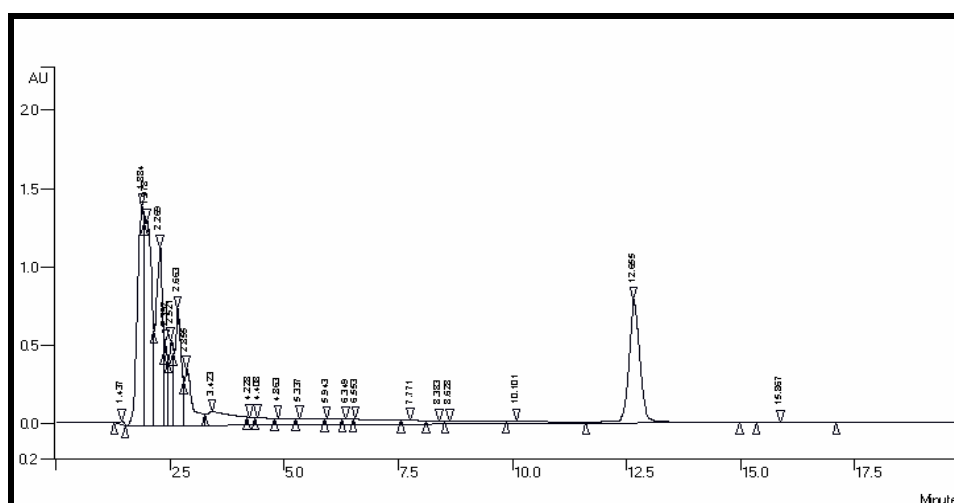


Figura 26: Cromatograma, em 215nm, referente à amostra contida no interior do saco intestinal invertido incubado com L-PRZ (1:3).

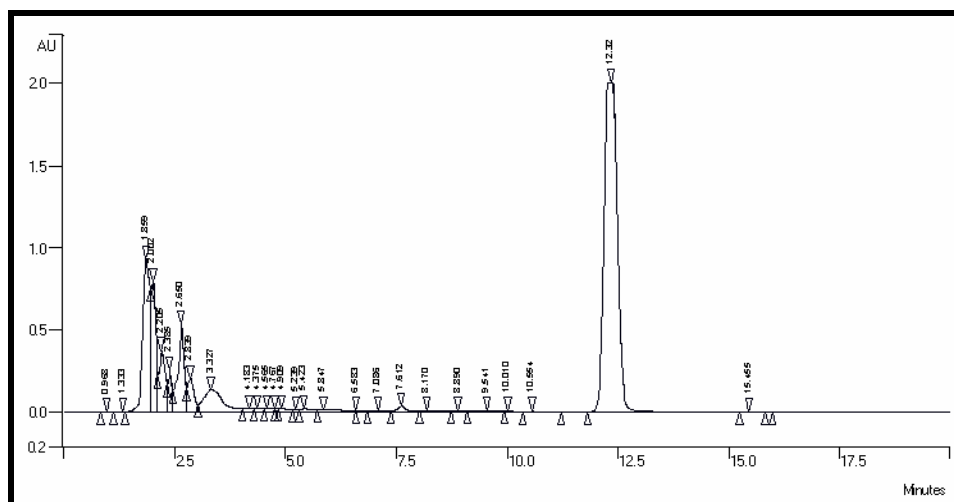


Figura 27: Cromatograma, em 215nm, referente à amostra presente no meio de incubação (PRZ disperso em TC 199).

A linearidade do método de quantificação do PRZ por CLAE foi determinada através da construção da curva analítica do PRZ em tampão TC 199 a partir da área do pico das concentrações crescentes de PRZ (Figura 28).

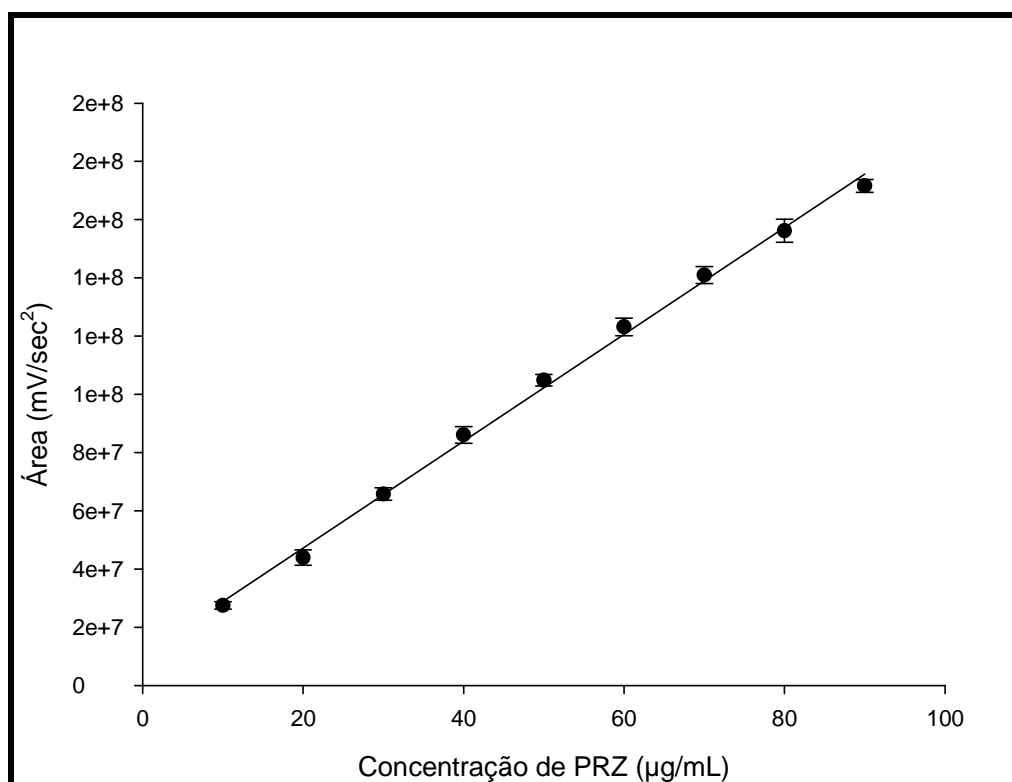


Figura 28: Curva analítica do PRZ em tampão TC 199 pH 7,4, obtida por CLAE.  $y = 1834345,011 x + 10478405,96$ , coeficiente de correlação ( $r$ ) = 0,9987.

#### 4.3.2. Efeito da fosfatidilcolina de soja na absorção intestinal do praziquantel pelo método do saco intestinal invertido

Com o objetivo de avaliar o efeito da PC no mecanismo de transporte através da membrana intestinal do PRZ, foi realizado o teste de absorção intestinal do PRZ disperso em TC 199 e incorporado em dispersões lipídicas (L-PRZ) (com razão molar PRZ/PC igual a 1:3 e 1:6).

Os resultados apresentados na Figura 29 mostram que o PRZ disperso em TC 199 e incorporado em lipossomas preparados com razão molar PRZ/PC igual a 1:3 são absorvidos em quantidades semelhantes. Entretanto, o PRZ

incorporado em lipossomas utilizando razão molar PRZ/PC igual a 1:6 é absorvido em menor quantidade, indicando que a quantidade de PC interfere no processo de absorção intestinal do PRZ.

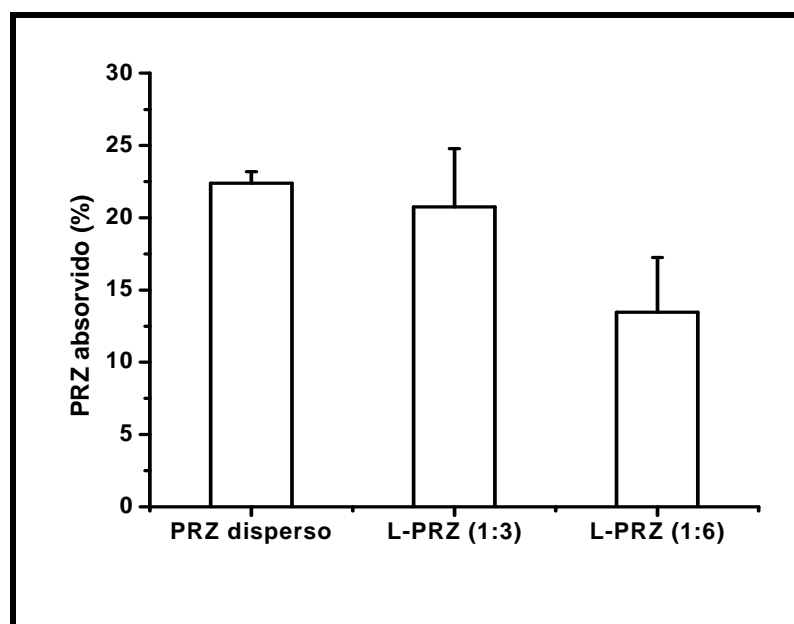


Figura 29: Porcentagem de PRZ absorvido através do segmento intestinal invertido, após incubação por 60 min com o fármaco.

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por um trematódeo pertencente ao gênero *Schistosoma* com uma debilitação crônica característica, ocorrendo em ambientes tropicais e subtropicais. É estimado que mais de 600 milhões de pessoas em 74 países vivam sob o risco de contrair a infecção, com um terço das pessoas nestas áreas atualmente infectadas. A esquistossomose só perde para a malária em termos de extensão das áreas endêmicas, número de pessoas infectadas, importância sócio-econômica e de saúde pública (UTZINGER et al., 2002).

O PRZ é atualmente o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose por ser efetivo contra as cinco espécies de *Schistosoma* e apresentar efeitos colaterais considerados leves. Entretanto, sua baixa solubilidade em água e o aumento de relatos de linhagens de *S. mansoni* tolerantes ao PRZ, como a linhagem BH, levam a busca de alternativas tecnológicas que possam melhorar estes casos.

Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que a incorporação do PRZ em lipossomas melhorou sua solubilidade em sistemas aquosos sem, contudo, alterar sua eficácia *in vitro* (MOURÃO, 2001). Em estudos *in vivo*, PRZ na dose de 40mg/kg incorporado em lipossomas de PC reduziram significativamente o número de ovos e vermes de *S. mansoni* LE em camundongos quando comparados com o PRZ disperso em meio aquoso (MOURÃO et al., 2005).

Esta dose ao ser testada com a linhagem BH não apresentou resultados adequados, sendo necessário aumentar a dose do fármaco. Assim, para avaliar o efeito da encapsulação de PRZ em lipossomas foi necessário aumentar a concentração de PC para que fosse mantida a mesma relação PRZ/PC empregada por MOURÃO, 2001, 1:6.

Para avaliar o efeito do aumento das concentrações de PC e PRZ na estruturação dos sistemas, estes foram caracterizados através de SAXS, reologia, espalhamento dinâmico de luz e microscopia de luz polarizada.

Analisando as curvas de SAXS para as dispersões lipídicas sem PRZ (L-PC), observou-se que as formulações L-PC 128, L-PC 256 e L-PC 320 apresentaram um único pico largo de correlação característico de estruturas unilamelares e indica que a fase líquido-cristalina não é altamente ordenada (YAN et al., 2007). Já as formulações L-PC 384 e L-PC 571 apresentaram um pico mais estreito sobreposto a um pico largo de correlação, indicando a presença de um sistema mais ordenado. Nos estudos de reologia, observou-se que todas as formulações sem PRZ apresentaram comportamento newtoniano, exceto a L-PC 571 que apresentou comportamento plástico e uma alta viscosidade, além de apresentar grande quantidade de “cruzes de malta” na microscopia de luz polarizada, características de estruturas que apresentam arranjos lamelares. Todos estes resultados sugerem que a concentração de PC influencia na estruturação dos sistemas.

Já nas dispersões lipídicas contendo PRZ (L-PRZ), a formação de lipossomas unilamelares foi observada nas formulações L-PRZ 128/21, L-PRZ 256/42 e L-PRZ 320/53. Estas amostras apresentaram os mesmos perfis de lipossomas formados apenas por PC, analisados através das curvas de SAXS e da reologia. Por outro lado, analisando a curva de SAXS para a formulação contendo 1,5% de PRZ e 22,0% de PC (L-PRZ 384/64), observou-se a presença de dois picos mais estreitos sobrepostos a um pico largo de correlação e comportamento plástico com características predominantemente elásticas semelhantes ao observado para a formulação L-PC 571. Estes resultados sugerem que L-PRZ 384/64 é formada por lipossomas unilamelares pequenos, lipossomas multilamelares e/ou estruturas lamelares planares. Com isso, pode-se deduzir que a quantidade de PRZ a ser encapsulado influencia a preparação de lipossomas unilamelares pequenos.

Como discutido anteriormente, os lipossomas podem alterar as características biofarmacêuticas do PRZ. Assim, é importante conhecer como estas formulações influenciam o efeito esquistossomicida. Para tanto foi verificado a ação dos lipossomas contendo PRZ na oviposição e nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos do parasita.

Sabe-se que os ovos de *Schistosoma mansoni* no intestino levam de seis a sete dias para se desenvolver completamente, ou seja, passar do primeiro estágio para o quinto, quando há formação de um miracídio (ovo maduro). Os ovos maduros permanecem viáveis no intestino por cerca de doze



dias (PESSÔA; VIANNA, 1982), portanto, se a oviposição diminuir com a administração do fármaco, o oograma deverá apresentar maior quantidade de ovos maduros - em decorrência de oviposições anteriores ao tratamento - do que de ovos imaturos.

Neste trabalho foi visto que todos os grupos, exceto o tratado com L-PRZ na dose de 300mg/kg aos 45 dias após a infecção, apresentaram, na grande maioria dos oogramas, quantidade maior de ovos imaturos do que de ovos maduros, indicando que a oviposição ocorreu até a época da análise.

Desta maneira, o L-PRZ na dose de 300mg/kg, mostrou-se mais eficaz em relação às outras formulações já que houve diminuição na quantidade dos ovos imaturos e também maduros em ambos os dias de tratamento. Por outro lado, a quantidade de ovos imaturos no grupo tratado aos 45 dias após a infecção foi menor que a de ovos maduros, mostrando que a oviposição foi menor, já que ovos recentes (nos primeiros estágios) foram encontrados em menor quantidade, comprovando que esta formulação, quando administrada neste dia, é superior em relação às outras testadas e aos outros dias de administração. O fato observado é muito importante já que conforme as observações de RICHARDS et al., 1989, o PRZ atua apenas nos ovos maduros, matando-os, e os imaturos continuam se desenvolvendo até serem eliminados.

Já em relação à postura de ovos, os tratamentos feitos com L-PRZ nas doses de 250 e 300mg/kg foram mais eficientes para redução na quantidade de ovos por grama de fezes, tanto aos 30 como aos 45 dias após o tratamento.

Estes resultados sugerem que o aumento do efeito esquistossomicida do L-PRZ na dose de 300mg/kg, em relação às outras doses, pode estar relacionado à maior quantidade de fármaco presente ou à maior viscosidade desta formulação, o que pode favorecer uma liberação mais prolongada do fármaco.

Nos estudos de transporte de PRZ através da membrana intestinal, foi verificado que embora a solubilidade do PRZ em meio aquoso seja maior em presença de PC, o transporte deste fármaco através da membrana intestinal é reduzido com o aumento da quantidade de PC. Este efeito ainda não está totalmente elucidado e algumas hipóteses, não excludentes entre si, foram levantadas para explicar estes resultados (CINTO, 2005). Neste trabalho foi avaliado o efeito da concentração de PC no transporte de PRZ através da membrana intestinal. Quando veiculados em lipossomas contendo maior proporção de PC, o PRZ, compartimentalizado na vesícula lipídica, ficaria retido na membrana intestinal devido à interação da vesícula de PC com esta membrana, formando uma barreira lipídica. Assim, o PRZ poderia atuar mais efetivamente contra os parasitas localizados nas veias mesentéricas do intestino. O efeito reservatório também poderia explicar o aumento da efetividade do PRZ em lipossomas.

Assim, o desenvolvimento de sistemas multiparticulados contendo PRZ, sua estruturação e composição são importantes para avaliar o potencial destes sistemas como veiculadores de fármacos e selecionar a estratégia mais adequada para veicular os fármacos.

- A incorporação do PRZ em lipossomas aumentou sua solubilidade em sistemas aquosos.
- A incorporação de PRZ em sistemas contendo 22,0% de PC (L-PRZ 384/64) leva a formação de um “gel vesicular” com alta viscosidade constituído de lipossomas unilamelares pequenos, lipossomas multilamelares e/ou estruturas lamelares planares que podem agir como uma barreira de difusão para liberação de fármacos.
- Para formulações que não contém PRZ, a estruturação do sistema levando a formação de um “gel vesicular” contendo vesículas densamente empacotadas só ocorre quando há 30,0% de PC.
- A dispersão lipídica contendo 300mg/kg de PRZ, administrada tanto aos 30 como aos 45 dias após a infecção, foi a mais efetiva para o tratamento da esquistossomose mansônica da linhagem BH, pois foi a que mais reduziu a quantidade de ovos por grama de fezes, além de reduzir a quantidade de ovos maduros e imaturos.
- Quanto maior a quantidade de PC utilizada na preparação dos lipossomas contendo PRZ, menor é a absorção intestinal do fármaco, o que pode ocasionar um efeito esquistossomicida mais localizado na membrana intestinal.

AGTMAEL, M. A.; EGGELTE, T. A.; BOXTEL, C. J. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. **TiPS**, v. 20, p. 199-205, 1999.

AVANTI polar lipids. Disponível em: <http://www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html>. Acesso em: 04 dez. 2007.

BILEK, G.; KREMSER, L.; BLAAS, D.; KENNDLER, E. Analysis of liposomes by capillary electrophoresis and their use as carrier in electrokinetic chromatography. **J. Chromatogr. B.**, v. 841, p. 38–51, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde – FUNASA. Esquistossomose: aspectos clínicos, Brasília, 2002. Disponível em: [http://www.funasa.gov.br/guia\\_epi/htm/doencas/esquistossomose/aspectosclin.htm](http://www.funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/esquistossomose/aspectosclin.htm). Acesso em: 11.abr.2002.

CARAFÀ, M.; MARIANECCI, C.; ANNIBALDI, V.; DI STEFANO, A.; SOZIO, P.; SANTUCCI, E. Novel O-palmitoylscleroglucan-coated liposomes as drug carriers: development, characterization and interaction with leuprolide. **Int. J. Pharm.**, v. 325, p. 155-162, 2006.

ÇILEK, A.; ÇELEBI, N.; TIRNAKSIZ, F.; TAY, A. A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration. Investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and stz-induced diabetic rats. **Int. J. Pharm.**, v. 298, p. 176-185, 2005.

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.

CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 10, p. 418-422, 1998.

CRAIG, D. Q. M. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. **Int. J. Pharm.**, v. 231, p. 131-144, 2002.

DELGADO, V. S.; SUÁREZ, D. P.; CESARI, I. M.; HINCAN, R. N. Experimental Chemoterapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquina: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strins on both sexes of the parasite. **Parasitol. Res.**, v. 78, p. 648-654, 1992.

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

DIVISION of parasitic diseases. Disponível em: [http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/Schistosomiasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/Schistosomiasis_il.htm).

Acesso em: 10 jan. 2008.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, p. 1421-1431, 2006.

EL-SAMALIGY, M.S.; AFIFI, N. N.; MAHMOUD, E. A. Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and in vivo performance. **Int. J. Pharm.**, v. 319, p. 121-129, 2006.

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.

FERRARI, M. L. A.; COELHO, P. M. Z.; ANTUNES, C. M. F.; TAVARES, C. A. P.; CUNHA, A. S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bull. World Health Org.**, v. 81, n. 3, p. 190-195, 2003.

FLATEN, G. E.; BUNJES, H.; LUTHMAN, K.; BRANDL, M. Drug permeability across a phospholipids vesicle-based barrier. 2. Characterization of barrier structure, storage stability and stability towards pH changes. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 28, p. 336–343, 2006.

FORMARIZ, T. P.; WANCZINSKI, B. J.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; OLIVEIRA, A. G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 16, n. 1-2, p. 44-57, 2004.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia a base de antimônio. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GIANNANTONI, A.; DI STASI, S. M.; CHANCELLOR, M. B.; COSTANTINI, E.; PORENA, M. New frontiers in intravesical therapies and drug delivery. **Eur. Urol.**, v. 50, p. 1183-1193, 2006.

GREENBERG, R. M. Are  $Ca^{2+}$  channels targets of praziquantel action? **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1-9, 2005.

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

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

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

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

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

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



- JIRAUNGKOORSKUL, W.; SAHAPHONG, S.; SOBHON, P.; RIENGROJPITAK, S.; KANGWANRANGSAN, N. *Schistosoma mekongi*: the *in vitro* effect of praziquantel and artesunate on the adult fluke. **Exp. Parasitol.**, v. 113, p. 16-23, 2006.
- KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 14, p. 397-400, 1972.
- KIM, S. K.; LEE, E. H.; VAISHALI, B.; LEE, S.; LEE, Y-K.; KIM, C-Y.; MOON, H. T.; BYUN, Y. Tricaprylin microemulsion for oral delivery of low molecular weight heparin conjugates. **J. Control. Release**, v. 105, p. 32-42, 2005.
- KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 123-126, p. 369-385, 2006.
- KUSSEL, J.; HAGAN, P. Praziquantel - its use, cost and possible development of resistance. **Parasitol. Today**, v. 15, n. 9, p. 352-354, 1999.
- LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 45, p. 89-121, 2000.
- LI, Y.S.; SLEIGH, AC.; ROSS, AG.P.; WILLIANMS, G.M.; TANNER,M.; MCMANUS, D.P. Epidemiology of *Schistosoma japonicum* in China: morbidity and strategies for control in the dongting lake region. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 273-281, 2000.
- LIMA, A. C. **Obtenção e caracterização de dispersões sólidas de praziquantel.** 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

LOPES, L. B. **Estudo da interação do diclofenaco com lipossomas unilamelares pequenos e utilização destes como núcleo para obtenção de nanocápsulas por polimerização interfacial.** 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

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

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.

MATTOS, A. C. A.; PEREIRA, G. C.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; KUSEL, J. R.; COELHO, P. M. Z. Evaluation of the effect of oxamniquine, praziquantel and a combination of both drugs on the intramolluscan phase of *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.**, v. 102, p. 84-91, 2007.

MODHA, J.; REDMAN, C. A.; THORNHILL, J. A.; KUSEL, J. R. Schistosomes: unanswered questions on the basic biology of the host–parasite relationship. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 10, p. 396-401, 1998.

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

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

MÜLLER, M.; MACKEBEN, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterisation of liposomes with encapsulated local anaesthetics. **Int. J. Pharm.**, v. 274, p. 139-148, 2004.

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

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

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

PESSÔA, S. B.; VIANNA, M. A. Trematódeos parasitas do fígado e do pulmão. In: PESSOA, S. B.; VIANNA, M. A. **Parasitologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982. p. 368.

- PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 527-533, 2004.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14ed. Piracicaba: USP/ESALQ, 2000. 477p.
- RICHARDS, F.; SULLIVAN, J.; RUIZ-TIBEN, E.; EBERHARD, M.; BISHOP, H. Effect of praziquantel on the eggs of *Schistosoma mansoni*, with a note on the implications for managing central nervous system schistosomiasis. **Am. Trop. Med. Parasitol.**, v. 83, n. 5, p. 465-472, 1989.
- SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Quim. Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.
- SARCIAUX, J. M.; ACAR, L.; SADO, P. A. Using microemulsion formulations for oral drug delivery of therapeutic peptides. **Int. J. Pharm.**, v. 120, p. 127-136, 1995.
- SEGOTA, S.; TEZAK, D. Spontaneous formation of vesicles. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 121, p. 51-75, 2006.
- SHAOHONG, L.; KUMAGAI, T.; QINGHUA, A.; XIAOLAN, Y.; OHMAE, H.; YABU, Y.; SIWEN, L.; LIYONG, W.; MARUYAMA, H.; OHTA, N. Evaluation of the antihelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. **Parasitol. Int.**, v. 55, p. 63-68, 2006.

SHUHUA, X.; JIQING, Y.; JINYING, M.; HUIFANG, G.; PEIYING, J.; TANNER, M. Effect of praziquantel together with artemether on *Schistosoma japonicum* parasites of different ages in rabbits. **Parasitol. Int.**, v. 49, p. 25-30, 2000.

SHUHUA, X.; TANNER, M.; N'GORAN, E. K. ; UTZINGER, J. ; CHOLLET, J.; BERGQUIST, R.; MINGGANG, C.; JIANG, Z. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. **Acta Trop.**, v. 82, p. 175-181, 2002.

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

SILER-MARINKOVIC, S.; MOJOVIC, L.; DAVINIC, V.; BUGARSKI, B. Liposomes as carriers of antimicrobial drugs. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 23, n. 5, p. 483-488, 1997.

SULEIMAN, M. I.; A/KARIM, E. I.; IBRAHIM, K. E. E.; AHMED, B. M.; SAEED, A. E. M.; HAMID, A. E. M. E. Photo-thermal stability of praziquantel. **Saudi Pharm. J.**, v. 12, n. 4, p. 157-162, 2004.

SULKOWSKI, W. W.; PENTAK, D.; NOWAK, K.; SULKOWSKA, A. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. **J. Mol. Struct.**, v. 744–747, p. 737–747, 2005.

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

URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona.** 136f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

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.

UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; TU, Z.; SHUHUA, X.; TANNER, M. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, p. 318-323, 2002.

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

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discov. Today**, 2007 (article in press).

WAHL, S. M.; FRAZIER-JESSEN, M.; JIN, W. W.; KOPP, J. B.; SHER, A.; CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of schistosome-induced granuloma and fibrosi. **Kidney Int.**, v. 5, p. 1370-1375, 1997.

WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. Geneva: WHO, 2002. (WHO Technical Report Series, 912).

XIAOMEI, M; ZHENSHENG, Z. Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-stabilized liposomes. **Int. J. Pharm.**, v. 318, p. 55-61, 2006.

YAN, Y.; HOFFMAN, H.; MAKARSKY, A.; RICHTER, W.; TALMON, Y. Swelling of  $L_{\alpha}$ -phases by matching the refractive index of the water-glycerol mixed solvent and that of the bilayers in the block copolymer system of  $(EO)_{15}$ - $(PDMS)_{15}$ - $(EO)_{15}$ . **J. Phys. Chem.**, v. 111, p. 6374-6382, 2007.

ZHANG, W.; VAN WINDEN, E. C. A.; BOUWSTRA, J. A.; CROMMELIN, D. J. A. Enhanced permeability of freeze-dried liposomal bilayers upon rehydration. **Cryobiology**, v. 35, p. 277–289, 1997.

ZUIM, N.R.B. **Características morfológicas e biológicas do *Schistosoma mansoni* oriundo de populações de moluscos selecionados geneticamente**. 95f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.