

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
PRAZIQUANTEL PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE

Laís Bastos da Fonseca

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador(es): José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Nádia Maria Volpato

Rio de Janeiro

Maio de 2012

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
PRAZIQUANTEL PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE

Laís Bastos da Fonseca

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. José Carlos Costa da Silva, D.Sc.

Prof. Márcio Nele de Souza, D.Sc.

Prof^a. Nádia Maria Volpato, D.Sc.

Prof^a. Sílvia Stanisçuaski Guterres, D.Sc.

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Prof. Carlos Medicis Morel, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MAIO DE 2012

Fonseca, Laís Bastos da.

Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo Praziquantel para o tratamento da esquistossomose/ Laís Bastos da Fonseca. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012.

XXIV, 209 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Nádia Maria Volpato

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2012.

Referências Bibliográficas: p. 188-209.

1. Nanopartículas. 2. PMMA. 3. Polimerização em miniemulsão. I. Pinto, José Carlos Costa da Silva, et al. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
PRAZIQUANTEL PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE

Laís Bastos da Fonseca

Maio/2012

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Nádia Maria Volpato

Programa: Engenharia Química

A esquistossomose é uma das doenças mais importantes do mundo em termos sócio-econômicos. No mundo são em torno de 200 milhões de pessoas infectadas, sendo que boa partes são crianças em idade pré-escolar. A administração de medicamentos em crianças é difícil, principalmente quando não há formulações próprias para pediatria e quando o fármaco apresenta um sabor amargo, como é o caso do Praziquantel (PZQ). O PZQ é o fármaco de escolha no tratamento da esquistossomose. Nanopartículas poliméricas são sistemas promissores para uso como veículos de medicamentos, por apresentarem estabilidade coloidal, resistência química e serem de fácil produção. Dessa forma, o objetivo principal do trabalho foi sintetizar o polímero poli (metacrilato de metila) com o PZQ encapsulado, pelo processo de polimerização em miniemulsão. As nanopartículas foram caracterizadas fisico-quimicamente obtendo sempre resultados satisfatórios que demonstraram a incorporação do fármaco e ausência de interação química com o polímero. Os resultados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o fármaco mantém a sua atividade estando incorporado no polímero. Os estudos de toxicidade também foram eficazes. O mascaramento do sabor, entretanto, não foi completamente satisfatório.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DEVELOPMENT OF POLYMERIC NANOPARTICLES WITH PRAZIQUANTEL
FOR THE TREATMENT OF SCHISTOSOMIASIS

Laís Bastos da Fonseca

May/2012

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Nádia Maria Volpato

Department: Chemical Engineering

The *schistosomiasis* is one of the most important diseases in social and economic terms. There are 200 million infected people around the world, most of them very young children. The use of medicines in children is always difficult, when the drug has a bitter taste and special formulations are not available, like praziquantel (PZQ) which is the first choice for treatment of *schistosomiasis*. Polymer nanoparticles constitute promising systems for use as vehicles of drugs. The main objective of this work was to synthesize poly(methyl methacrylate) containing PZQ encapsulated in situ by miniemulsion polymerization. Nanoparticles were characterized obtained results show the successful incorporation of the drug and the absence of chemical interaction with the polymer. The *in vitro* results and the *in vivo* results demonstrate that the drug keeps its activity after incorporation. Toxicity studies show that the obtained nanoparticles do not present cytotoxicity or genotoxicity. However, taste masking effect was not completely satisfactory.

AGRADECIMENTOS

A meus orientadores José Carlos e Márcio Nele pela amizade e confiança depositada.

A minha co-orientadora, Nadia Maria Volpato, por ser além de orientadora uma grande amiga.

Ao meu marido Guilherme, por ser tão companheiro e pela infinita paciência.

A meus pais, meus irmãos e minha avó, pelo amor, carinho e incentivo em todas as horas, além de serem grandes exemplos de caráter e sabedoria.

A meu chefe Jorge Costa por me autorizar a realizar esse trabalho, além de ser um grande amigo em todas as horas.

À amiga Marina Damião, um exemplo de pessoa e profissionalismo, por estar sempre disponível a me auxiliar e por todos os momentos de alegria.

A Bárbara por ser mais que uma amiga presente em todas as horas.

A Marco Antônio por me apresentar aos orientadores e pelos momentos de descontração.

A todos os amigos do LMSCP: Ricardo Aderne, Sôzinha, Caio, Matheus, Cris, Fred, Jorge, Aline, Grazi, Beth. Em especial a Luiza por toda a colaboração e boa vontade, além de ser uma grande amiga no laboratório.

A meus estagiários Diego e Letícia por toda ajuda e dedicação ao trabalho.

Ao amigo Daniel pela colaboração nas dúvidas sobre química orgânica.

A Dra. Tereza Santos de Farmanguinhos por ser uma incentivadora constante além de amiga.

Aos amigos do LEES - Farmanguinhos pelas análises de TGA e DSC, principalmente ao Rafael Seiceira por todas as discussões e ajuda.

Ao grupo de pesquisa do Dr. Paulo Coelho do CPpRR, pela atenção e colaboração nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, especialmente a Ana Carolina e Neusa Araújo.

A Dra. Alessandra Viçosa de Farmanguinhos pelo auxílio com as formulações farmacêuticas.

A Eduardo e Roberto do IMA, pela colaboração nas análises de RMN.

A Dra. Helena Zamith do INCQS pela colaboração nos ensaios de toxicidade.

Aos colegas de trabalho, principalmente aos de Farmanguinhos pela compreensão em alguns momentos de ausência além da colaboração e boa vontade.

Aos meus pais, Renato e Vera, que me mostraram
que tudo é possível, basta acreditar e se esforçar,
pois sem trabalho não se consegue nada.

Grandes exemplos de amor, trabalho e honestidade.

"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)

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível"
(Charles Chaplin)

"A vida é maravilhosa se não se tem medo dela"
(Charles Chaplin)

ÍNDICE

	Páginas
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. ESQUISTOSSOMOSE	4
2.1.1. DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA	5
2.1.2. QUIMIOTERAPIA	6
2.2. PRAZIQUANTEL	7
2.2.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	8
2.2.2. MECANISMO DE AÇÃO, PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS E FARMACOCINÉTICAS	8
2.2.3. CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA	9
2.2.4. FORMAS FARMACÊUTICAS NO BRASIL E NO MUNDO	10
2.3. SUSPENSÕES FARMACÊUTICAS	13
2.3.1. RELAÇÃO MÁSSICA DO PRODUTO E CONCENTRAÇÃO FINAL DA FORMULAÇÃO	15
2.4. ALTERNATIVAS AVANÇADAS DE FORMULAÇÃO PARA FÁRMACOS DE BAIXA SOLUBILIDADE EM ÁGUA	17
2.4.1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTENDO PRAZIQUANTEL	18
2.5. NANOPARTÍCULAS – SISTEMAS POLIMÉRICOS	21
2.5.1. DISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS NO ORGANISMO	25
2.5.1.1. Absorção no trato gastrointestinal de nanopartículas	26
2.5.1.2. Metodologias para avaliação da absorção / permeação	30

2.5.1.3. Metodologias para avaliação da atividade do fármaco encapsulado nas nanopartículas	31
2.5.2. MÉTODOS DE PREPARO DE NANOPARTÍCULAS	32
2.5.2.1. Evaporação de solvente	33
2.5.2.2. Polimerização em emulsão (“in situ”)	34
2.5.3. POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO	39
2.5.3.1. Técnicas de dispersão de miniemulsões	42
2.5.3.2. Polimerização do monômero em miniemulsão	45
2.5.4. CONTROLE DE DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA	47
2.5.5. SECAGEM DAS NANOPARTICULAS	48
2.5.5.1. Liofilização	49
2.5.5.2. Secagem por aspersão	49
2.6. COMENTÁRIOS FINAIS	50
CAPÍTULO 3 - OBJETIVOS	51
3.1. OBJETIVO GERAL	51
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3.3 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	52
CAPÍTULO 4 - METODOLOGIA DA PESQUISA	54
4.1. MATÉRIA-PRIMA E SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)	54
4.2. MÉTODOS	55
4.2.1. ANÁLISE DA MATÉRIA-PRIMA PRAZQUANTEL	55

4.2.1.1. Identificação por espectrofotometria no infravermelho (IR)	55
4.2.1.2. Rotação específica	55
4.2.1.3. Distribuição de tamanhos de partícula	56
4.2.1.4. Dissolução da matéria-prima	57
4.2.1.5. Análise quantitativa (doseamento e substâncias relacionadas)	58
4.2.2. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA DE PZQ NO PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS	59
4.2.2.1. Degradação térmica e termogravimetria	59
4.2.2.2. Teste de Solubilidade do PZQ nos monômeros selecionados	59
4.2.2.3. Teste de solubilidade do PZQ em soluções aquosas de lauril sulfato de sódio	60
4.2.3. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO - ETAPA I	61
4.2.3.1. Composição do sistema reacional - Receita I	61
4.2.3.2. Preparo da miniemulsão - Receita I	61
4.2.4. QUEBRA DAS SUSPENSÕES	63
4.2.5. SECAGEM DAS NANOPARTÍCULAS	64
4.2.6. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO - RECEITA II	64
4.2.6.1. Composição do sistema reacional - Receita II	64
4.2.6.2. Preparo da miniemulsão - Receita II	65
4.2.7. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	65
4.2.7.1. Conversão por gravimetria	65
4.2.7.2. Distribuição de tamanho de partícula	66

4.2.7.3. Determinação de pH	67
4.2.7.4. Taxa de encapsulamento de PZQ	67
4.2.7.5. Interação fármaco-polímero	67
4.2.7.6. Avaliação morfológica	68
4.2.7.7. Monômero residual	68
4.2.7.8. Distribuição de massa molar do polímero	70
4.2.8. ESTUDOS DE PERFIL DE DISSOLUÇÃO	71
4.2.9. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	72
4.2.9.1. ¹H RMN	72
4.2.9.2. ¹³C RMN	72
4.2.9.3. RMN de baixo campo	73
4.2.10. FORMULAÇÃO	73
4.2.10.1. Processo de fabricação	74
4.2.10.2. Avaliação das suspensões	74
4.2.11. ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO	75
4.2.11.1. Estudos in vitro	75
4.2.11.2. Estudos in vivo	77
4.2.12. ESTUDOS DE TOXICIDADE	79
4.2.12.1. Citotoxicidade	79
4.2.12.2. Genotoxicidade	80
4.2.12.2.1 <i>Análise Estatística</i>	82

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5.1. AVALIAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	84
5.2. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO	90
5.2.1. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO - PARTE I (RECEITA I)	92
5.2.1.1. Conversão	94
5.2.1.2. Ultra-turrax e homogeneizador de alta pressão - Efeito do equipamento utilizado para a emulsificação	97
5.2.2. ESTABILIDADE DAS GOTÍCULAS	97
5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS - PARTE I (RECEITA I)	99
5.3.1. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE PARTÍCULA	99
5.3.2. pH	101
5.3.3. ENCAPSULAMENTO DO PZQ	103
5.3.4. INTERAÇÃO FÁRMACO-POLÍMERO	105
5.3.5. ESPECTROSCOPIA DE INFRA-VERMELHO	107
5.3.6. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	109
5.3.7. PROCESSO DE SECAGEM	109
5.3.8. MONÔMERO RESIDUAL	111
5.3.9. DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES DO POLÍMERO	113
5.3.10. LIBERAÇÃO DO FÁRMACO DA MATRIZ POLIMÉRICA - ENSAIO DE DISSOLUÇÃO	115
5.3.11. RESULTADOS PRELIMINARES - PARTE I	120
5.4. REAÇÕES PARTE IIa (RECEITA II)	121

5.4.1. CONVERSÃO	122
5.5. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS - PARTE II	125
5.5.1. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA	125
5.5.2. TAXA DE ENCAPSULAMENTO DO PZQ	126
5.5.3. INTERAÇÃO FÁRMACO - POLÍMERO	127
5.5.4. DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES DO POLÍMERO	128
5.5.5. LIBERAÇÃO DO FÁRMACO DA MATRIZ POLIMÉRICA	131
5.5.6. FORMULAÇÃO	135
5.6. REAÇÕES PARTE IIB (RECEITAII)	138
5.6.1. SOLUBILIDADE DO PZQ EM SOLUÇÃO AQUOSA DE LSS	139
5.6.2. CONVERSÃO	140
5.6.3. DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES DO POLÍMERO	141
5.6.4. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE PARTÍCULA	142
5.6.5. RMN	143
5.6.6. LIBERAÇÃO DO FÁRMACO DA MATRIZ POLIMÉRICA	154
5.6.7. SEPARAÇÃO DO PZQ	155
5.6.8. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS CENTRÍFUGADAS - PRECIPITADO E SOBRENADANTE	156
5.6.8.1. Análises de DSC	156
5.6.8.2. Doseamento de PZQ	157
5.6.9. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA	158
5.6.9.1. Avaliação física	159

5.6.9.2. Avaliação Química	161
5.6.9.3. Avaliação Sensorial da Formulação Sugerida	162
5.7. TESTE IN VITRO	163
5.8. ESTUDOS IN VIVO	174
5.9. ESTUDOS DE TOXICIDADE	176
5.9.1. CITOTOXICIDADE	176
5.9.2. GENOTOXICIDADE	178
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES	185
CAPÍTULO 7 - PERSPECTIVAS FUTURAS	187
CAPÍTULO 8 - BIBLIOGRAFIA	188

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 - Fórmula estrutural do Praziquantel	7
Figura 2 - Aspecto do produto fabricado pela empresa Bayer	10
Figura 3 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso, das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (Fonte: SCHAFFAZICK <i>et al.</i> , 2003)	23
Figura 4 - Esquema cinético clássico das reações de polimerização via radicais livres (Fonte: LENZI <i>et al.</i> , 2004)	37
Figura 5 - Homogeneizador de alta pressão	62
Figura 6 - Foto do reator e dos acessórios empregados na polimerização	63
Figura 7 - Infecção subcutânea do camundongo com as cercárias	75
Figura 8 - Perfusão dos animais e recolhimento dos vermes.	76
Figura 9 - Administração por gavagem	78
Figura 10 - Esquema de tratamento aos animais infectados	78
Figura 11 - Foto do processo de perfusão	79
Figura 12 - Distribuição de tamanho de partícula da matéria-prima	85
Figura 13 - Cromatograma referente a análise de PZQ submetido à degradação térmica em estufa por 6 horas a 85°C	86
Figura 14 - Termograma do PZQ.	87
Figura 15 - Gráfico comparativo das concentrações de saturação de PZQ nos diferentes monômeros e temperaturas.	88
Figura 16 - Cromatograma de uma amostra obtida no teste de solubilidade nas condições cromatográficas do doseamento.	89
Figura 17 - Cromatograma do branco (solução de MMA) obtida no teste de solubilidade nas condições cromatográficas do doseamento.	89
Figura 18 - Cromatograma da mesma amostra da Figura 16 obtida após o ajuste da fase móvel de 3:2 (ACN:Água) para 50:50.	90
Figura 19 - Conversão das reações conduzidas a 80°C. (R7) MMA com 3 g de PZQ e 0,3 g de iniciador; (R8) MMA:óleo (70:30) com 10 g de PZQ; (R9) MMA:óleo (70:30) com 3 g de PZQ e 0,6 g de iniciador.	94

Figura 20 - Conversão das reações conduzidas a 90°C. (R10) MMA:óleo com 6 g de PZQ; (R11) MMA:óleo sem PZQ; (R12) MMA com 15 g de PZQ; (R13) MMA com 12 g de PZQ.	96
Figura 21 - Evolução do tamanho das gotículas das emulsões ao longo do tempo, na presença e ausência de óleo.	98
Figura 22 - Curva de distribuição de tamanho de partícula da amostra R3 (Ultra-turrax) medido por DLS.	100
Figura 23 - Curva de distribuição de tamanho de partícula da amostra R5 (Homogeneizador) medido por DLS.	100
Figura 24 - Mecanismo proposto para o decaimento do pH. Hidrólise do metacrilato de metila (a) com formação de ácido metacrílico (b).	102
Figura 25 - Termogramas de calorimetria diferencial do PZQ, componentes isolados das nanopartículas, mistura física (MF), nanopartículas com fármaco e nanopartículas puras (R1, R2, R3, R4, R5 e R6)	106
Figura 26 - Termogramas de calorimetria diferencial do PZQ, componentes isolados das nanopartículas, mistura física (MF), nanopartículas com fármaco e nanopartículas puras (R7, R8, R9, R10 e R13)	106
Figura 27 - Termogramas de calorimetria diferencial do PZQ, da mistura física (MF) teórica entre o PZQ e as nanopartículas sem o fármaco (R2) e da MF experimental entre o PZQ e as nanopartículas sem o ativo.	107
Figura 28 -Espectro de infravermelho para PZQ puro (A), PMMA puro (B); PMMA com óleo (C), nanopartículas com PZQ (D).	108
Figura 29 - Micrigrafia (MEV), (A) R4 (Ultra-turrax) com magnitude de aproximação de 5456 vezes; (B) R6 (Homogeneizador) com magnitude de aproximação de 12000vezes.	109
Figura 30 - (A) amostra seca no liofilizador; (B) amostra seca no spray dryer	110
Figura 31 - Foto do Spray Dryer. A seta indica aonde há grande perda de material durante o processo de secagem.	111
Figura 32 - Cromatograma do doseamento de monômero residual por CG.	112
Figura 33 - Distribuição das massas molares do PMMA, reação R3	114
Figura 34 - Perfil de dissolução de R7 e R9 em meio pH1,2.	115
Figura 35 - Perfil de dissolução do PZQ dos produtos obtidos de R10 e R13 e dos comprimidos em meio pH 1,2.	116

Figura 36 - Solubilidade do PZQ em diferentes meios de dissolução.	117
Figura 37 - Perfil de dissolução do PZQ de R10 e R13 e dos comprimidos em meio pH 4,5.	118
Figura 38 - Perfil de dissolução do PZQ de R10 e R13 e dos comprimidos em meio pH 5,5.	118
Figura 39 - Perfil de dissolução do PZQ de R10 e R13 e dos comprimidos em meio pH 6,8.	119
Figura 40 - Perfil de dissolução da amostra R13 seca pelas duas técnicas, <i>spray dryer</i> e liofilização.	120
Figura 41 - Conversão das reações a 90°C com Eudragit. (R14) MMA:óleo com 6 g de PZQ e 7 g de Eudragit; (R15) MMA:óleo sem PZQ com 7 g de Eudragit; (R16) MMA com 12 g de PZQ e 10 g de Eudragit.	122
Figura 42 - Conversão das reações a 90°C com Eudragit e EGDMA. (R18) MMA com 12 g de PZQ, 10 g de Eudragit e 5 g EGDMA; (R20) MMA sem PZQ com 10 g de Eudragit e 5 g de EGDMA; (R21) MMA:óleo com 10 g de Eudragit e 5 g de EGDMA.	123
Figura 43 - Conversão das reações a 90°C com EGDMA. (R22) MMA com 12 g de PZQ e 5 g EGDMA; (R23) MMA:óleo com 12 g de PZQ e 5 g de EGDMA; (R24) MMA e 5 g de EGDMA; (R25) MMA:óleo e 5 g de EGDMA.	124
Figura 44 - Distribuição de tamanhos de partícula da amostra R23, medido por DLS.	125
Figura 45 - Termogramas de calorimetria diferencial do PZQ, componentes isolados das nanopartículas, mistura física de alguns componentes e das diferentes nanopartículas obtidas (R16 a R25).	128
Figura 46 - Massas molares médias dos materiais produzidos ao decorrer das reações R14 e R15.	129
Figura 47 - Massa molares médias dos materiais produzidos ao decorrer das reações R16 e R23.	130
Figura 48 - Distribuição das massas molares do PMMA, reação R14.	131
Figura 49 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R16, R17, R18, R19, R23 e dos comprimidos em meio pH 1,2. em meio pH 1,2.	132
Figura 50 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R16, R17, R18, R19, R23 e dos comprimidos em meio pH 4,5.	133
Figura 51 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R16, R17, R18, R19, R23 e	133

dos comprimidos em meio pH 5,5.	
Figura 52 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R16, R17, R18, R19, R23 e dos comprimidos em meio pH 6,8.	137
Figura 53 - Micrografias de MEV. (A) R19; (B) R22; (C) PZQ após ser dissolvido no monômero e seco no liofilizador; (D) PZQ filtrado da emulsão e seco posteriormente.	139
Figura 54 - Solubilidade do PZQ em água e soluções aquosas de LSS em diferentes concentrações e em duas temperaturas, 25 e 90°C..	140
Figura 55 - Conversão das reações realizadas a 90°C com EGDMA. (R26) MMA:óleo com 17 g de PZQ e 5 g EGDMA; (R27) MMA:óleo com 17 g de PZQ e 5 g de EGDMA; (R28) MMA:óleo com 17 g de PZQ e 5 g de EGDMA; (R29) MMA:óleo e 5 g de EGDMA.	141
Figura 56 - Massas molares médias dos produtos das reações R26 e R27.	144
Figura 57 - Espectro ¹ H RMN do PZQ puro.	145
Figura 58 - Espectro ¹³ C RMN do PZQ puro.	147
Figura 59 - Espectro ¹ H RMN da reação R29 (PMMA).	148
Figura 60 - Espectro ¹³ C RMN da reação R29 (PMMA).	149
Figura 61 - Espectro ¹ H RMN das nanopartículas PMMA-PZQ, produzidas na reação R27.	150
Figura 62 - Espectro ¹³ C RMN das nanopartículas PMMA-PZQ, produzidas na reação R27.	155
Figura 63 - Sobreposição dos espectros ¹ H RMN do PZQ das nanopartículas (PMMA-PZQ) produzidas na presença de PZQ na reação R27.	151
Figura 64 - Curvas de distribuição de domínios obtidas por RMN e baixo campo	153
Figura 65 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R26, R27, R28 e dos comprimidos em pH1,2.	154
Figura 66 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R26, R27, R28 e dos comprimidos em pH6,8.	154
Figura 67 - Termogramas obtidos para amostra de PZQ; de produtos das reações R27 e R29 .	156
Figura 68 - Termogramas obtidos para as amostras de PZQ; do produto das reações R27 e R29.	157
Figura 69 – Aspecto visual inicial do ensaio de sedimentação.	160

Figura 70 – Aspecto visual final do ensaio de sedimentação.	160
Figura 71 – Gráfico razão de sedimentação em função do tempo para as formulações testadas.	161
Figura 72 - Vermes 1 hora após receberem o tratamento em meio RPMI 1640. (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 µg/mL; (C) Comprimidos PZQ 1,0 µg/mL; (D) Nano PMMA-PZQ 0,5 µg/mL; (E) Nano PMMA-PZQ 1,0 µg/mL e (F) Nano 2,0 µg/mL.	168
Figura 73 - Vermes 1 hora após receberem o tratamento em meio metanol. (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 µg/mL; (C) Nano PMMA-PZQ 0,5 µg/mL; (D) Nano PMMA-PZQ 1,0 µg/mL e (E) Nano 2,0 µg/mL.	169
Figura 74 - Vermes 24 horas após a troca do meio (RPMI 1640). (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 µg/mL; (C) Comprimidos PZQ 1 µg/mL; (D) Nano PMMA-PZQ 0,5 µg/mL; (E) Nano PMMA-PZQ 1,0 µg/mL e (F) Nano 2,0 µg/mL.	170
Figura 75 - Vermes 24 horas após a troca do meio (metanol). (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 µg/mL; (C) Nano PMMA-PZQ 0,5 µg/mL; (D) Nano PMMA-PZQ 1,0 µg/mL e (E) Nano 2,0 µg/mL.	171
Figura 76 - Vermes 7 dias após a troca do meio (RPMI 1640). (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 µg/mL; (C) Comprimidos PZQ 1 µg/mL; (D) Nano PMMA-PZQ 0,5 µg/mL; (E) Nano PMMA-PZQ 1,0 µg/mL e (F) Nano 2,0 µg/mL.	172
Figura 77 - Vermes 7 dias após a troca do meio em metanol. (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 µg/mL; (C) Nano PMMA-PZQ 0,5 µg/mL; (D) Nano PMMA-PZQ 1,0 µg/mL e (E) Nano 2,0 µg/mL.	173
Figura 78 - Fotomicrografias de linfócitos humanos no ensaio Cometa; (A) Célula não tratada (controle), (B) Célula exibindo migração aumentada de DNA após tratamento com substância mutagênica (MMS)	179

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 - Medicamentos a base de praziquantel comercializados no Brasil e seus cuidados de administração	12
Tabela 2 - Formulação quali-quantitativa do produto Epiquantel 120 mg/ml suspensão oral (EPIQUANTEL, 2007).	13
Tabela 3 - Cálculo dos volumes de dose a serem administrados e de volume final do tratamento para diferentes sugestões de concentração de produto final.	16
Tabela 4 - Concentração utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.	80
Tabela 5 - Caracterização da matéria-prima de praziquantel	84
Tabela 6 - Diâmetros de corte para diferentes frações mássicas acumuladas da matéria-prima	85
Tabela 7 - Resultados do estudo de degradação térmica	86
Tabela 8 - Solubilidade do PZQ nos monômeros selecionados	88
Tabela 9 - Formulações de polimerização em miniemulsão nos testes preliminares	91
Tabela 10 - Reações realizadas com MMA na segunda etapa do trabalho	93
Tabela 11 - Conversão das reações de MMA a 60°C com 3g de PZQ	94
Tabela 12 - Resultado da distribuição de tamanho das nanopartículas obtidas em diferentes reações	99
Tabela 13 - Resultados de pH nos tempos zero, 1 e 3 meses	102
Tabela 14 - Taxa de encapsulamento (%) de PZQ nas nanopartículas em relação a quantidade adicionada.	103
Tabela 15 - Percentual de monômero residual encontrado nas nanopartículas	111
Tabela 16 - Resultados das massas molares médias do PMMA	113
Tabela 17 - Resultados da conversão das reações R14 - R25	124
Tabela 18 - Análise de distribuição granulométrica	125
Tabela 19 - Eficiência do encapsulamento de PZQ	127
Tabela 20 - Valores de pH das nanopartículas dispersas em água	136
Tabela 21 - Média principais das distribuições de tamanhos de partículas dos polímeros R26 a R29	142
Tabela 22 - Deslocamento dos prótons do PZQ em espectros de ¹ H RMN	143
Tabela 23 - Deslocamento químico do PZQ em espectros de ¹³ C RMN	146
Tabela 24 - T ₁ ^H das amostras analisadas	152

Tabela 25 - Teor de PZQ obtido para as amostras centrifugadas e não centrifugadas.	157
Tabela 26 - Natureza e objetivos das formulações propostas	158
Tabela 27 - Formulações quali-quantitativas testadas	159
Tabela 28 - pH das formulações propostas.	161
Tabela 29 - Concentrações reais de PZQ administradas nos ensaio <i>in vitro</i>	164
Tabela 30 - Resultados obtidos com experimento <i>in vitro</i> usando vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos a nanopartículas PMMA-PZQ - Meio de cultura RPMI 1640.	165
Tabela 31 - Resultados obtidos com experimento <i>in vitro</i> usando vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos a nanopartículas PMMA-PZQ - Meio de cultura RPMI 1640 e metanol.	166
Tabela 32 - Resultado do ensaio <i>in vivo</i>	175
Tabela 33 - Ensaio de citotoxicidade das nanopartículas sem PZQ (PMMA) após células sanguíneas <i>in vitro</i> em 2 horas de tratamento.	177
Tabela 34 - Ensaio de citotoxicidade do PZQ em células sanguíneas <i>in vitro</i> após 2 horas de tratamento.	177
Tabela 35 - Ensaio de citotoxicidade das nanopartículas contendo PZQ em células sanguíneas <i>in vitro</i> após 2 horas de tratamento.	178
Tabela 36 - Efeito do PZQ em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i>	179
Tabela 37 – Análises estatística - Efeito do PZQ em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> .	180
Tabela 38 - Efeito do PMMA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i>	181
Tabela 39 - Análises estatística - Efeito do PMMA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i>	182
Tabela 40 - Efeito das nanopartículas com PZQ em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i>	183
Tabela 41 - Análises estatística - Efeito das nanopartículas em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i>	184

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Acrílico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AV	Acetato de Vinila
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EGDMA	Etileno Glicol Dimetacrilato
FDA	Food and Drug Administration
HBL	Equilíbrio Hidrofóbico e Lipofílico
IR	Infra Vermelho
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMA	Metacrilato de Metila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDI	Índice de Poldispersão
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PZQ	Praziquantel
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SQR	Substância Química de Referência
TGA	Termogravimetria
UA	Unidades Arbitrárias

CAPÍTULO 1

Introdução

A esquistossomose é uma doença parasitária e um dos principais problemas de saúde pública que acomete os países subdesenvolvidos, sendo o Brasil o país mais afetado no continente americano (CHITSULO *et al.*, 2000; PORDEUS *et al.*, 2008). O praziquantel (PZQ) é o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose no mundo. No tratamento desta doença, a dose de PZQ a ser administrada nos pacientes é calculada em função do peso, aproximadamente 40 mg/Kg, em uma dose única que é capaz de tratar a doença, mas que não previne a mesma (REICH & GOVINDARAJ, 1998; DAYAN, 2003). Doses de 60 mg/Kg também podem ser requeridas, principalmente quando há chances de reincidência (ISMAIL *et al.*, 1996; WILLIAM *et al.*, 2001).

Crianças são especialmente vulneráveis à esquistossomose e, quando infectadas na idade escolar, são freqüentemente comprometidas psicologicamente e intelectualmente (WHO, 2002). Por ser uma doença comum em crianças em idade pré-escolar, a administração de doses medicamentosas adequadas é muito complicada, já que a variabilidade corpórea entre as crianças é grande. A divisão de comprimidos em “partes” homogêneas é difícil, principalmente em lugares de baixa renda, onde o nível de esclarecimento da população é normalmente muito baixo. Os dados até o momento mostram que a administração pediátrica é adaptada a partir da formulação adulta. Por isso pode-se dizer que uma suspensão sem os caracteres organolépticos adequados e possivelmente até mesmo a aplicação de doses inadequadas (em função da quebra dos comprimidos) são utilizadas em pediatria nos dias de hoje (KEISER *et al.*, 2011). Sendo assim, é de longa data a solicitação do Ministério da Saúde para o desenvolvimento do produto praziquantel suspensão. O desenvolvimento deste produto não ocorreu até hoje por diversos motivos e impeditivos técnicos.

Um dos principais fatores que tem impedido o desenvolvimento de novos produtos é a dificuldade de se conseguir um revestimento que se mantenha íntegro durante o prazo de validade do medicamento. O PZQ é um fármaco extremamente amargo e como o público alvo do medicamento são as crianças, é importante que o

revestimento mascare o sabor, de modo a obter uma maior adesão ao tratamento (WOELFLE *et al.*, 2011).

Além das dificuldades técnicas, também existe a falta de interesse das indústrias farmacêuticas privadas neste medicamento, visto que a esquistossomose é uma doença negligenciada (REICH & GOVINDARAJ, 1998; DECIT, 2010). Por conseguinte, a maioria das (se não todas) tentativas de solucionar o problema são oriundas de universidades, institutos de pesquisa e laboratórios governamentais.

Como os sistemas poliméricos nanoencapsulados são veículos promissores para o transporte de fármacos problemáticos, espera-se com este trabalho resolver as seguintes questões; que o PZQ nanoencapsulado não se dissolva no veículo da suspensão, que o polímero consiga mascarar o sabor do fármaco e não favoreça a dissolução do mesmo no veículo da suspensão.

Além disso, o PZQ é um ótimo fármaco modelo, além de apresentar um sabor amargo desagradável, ele ainda apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, portanto a tecnologia aqui desenvolvida poderá ser aplicada a uma grande gama de fármacos com aplicabilidades variadas.

A técnica empregada neste trabalho para obtenção das nanopartículas é a técnica de polimerização em miniemulsão. Essa técnica foi selecionada por permitir a formação de partículas nanométricas em sistemas de alta estabilidade (LANDFESTER *et al.*, 1999). Outra vantagem da polimerização em miniemulsão é a facilidade de aumento de escala para uma produção industrial (LOPEZ *et al.*, 2008; MANEA *et al.*, 2008). Inicialmente os monômeros de escolha foram ácido acrílico (AC), acetato de vinila (AV) e metacrilato de metila (MMA), por serem biocompatíveis.

Esta Tese de Doutorado está organizada nos seguintes capítulos:

- Capítulo 2: Revisão Bibliográfica – Neste capítulo são abordados os grandes problemas associados a esquistossomose no Brasil e no mundo, e as dificuldades da quimioterapia. Mostra-se ainda que a nanotecnologia constitui uma ferramenta para o tratamento da doença, discutindo-seas técnicas que podem ser empregadas para a produção de nanopartículas e a técnica de polimerização em miniemulsão.

- Capítulo 3: Objetivos – Esse capítulo apresenta os objetivos gerais, os objetivos específicos e a justificativa para a condução desse projeto de pesquisa, demonstrando a relevância do presente estudo.
- Capítulo 4: Metodologia – Neste capítulo são apresentadas as técnicas empregadas para a manufatura das nanopartículas e a caracterização físico-químicas das mesmas.
- Capítulo 5: Resultados e Discussão – Esse capítulo apresenta os resultados obtidos ao longo dessa tese com as respectivas discussões.
- Capítulo 6: Conclusões – Esse capítulo apresenta as principais conclusões obtidas ao longo desta tese.
- Capítulo 7: Perspectivas Futuras – Esse capítulo apresenta sugestões para atividades futuras, e continuidade do projeto.

Essa tese foi desenvolvida no *Laboratório de Modelagem, Simulação e Controle de Processos (LMSCP)* do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ. A tese contou também com a colaboração da Fiocruz, por intermédio das seguintes unidades:

- Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos (RJ), onde foram realizadas várias análises de caracterização;

- Centro de Pesquisa René Rachou (BH), responsável pelos ensaios de atividade *in vitro* e *in vivo* das nanopartículas contendo PZQ;

- Instituto de Controle de Qualidade em Saúde (RJ), responsável pelos ensaios de toxicidade *in vitro*.

Houve também auxílio na realização das análises de RMN pelo Instituto de Macromoléculas (IMA) da UFRJ.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica

2.1. ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma infecção que acomete milhares de pessoas no mundo, causada por três espécies de trematódio: *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*. A infecção tem início com a invasão das cercárias, larvas do *Schistosoma* em seu estado maduro, que penetram na da pele e mucosa do ser humano, quando em contato com água contaminada, ocorrendo no local dermatite pruriginosa (CAFFREY, 2007). A incubação dura em torno de um mês e é caracterizada por febre, mal estar, anorexia, tosse e fadiga, correspondendo esse período à migração pela corrente sanguínea. Na fase invasiva, as larvas atingem a fase adulta e fixam-se nos sistemas porta e mesentérico (LAMBERTUCCI *et al.*, 2000; VENNERVALD *et al.*, 2000).

A vida dos vermes pode ser superior a 20 anos e cada ser humano infectado pode apresentar milhares de vermes. As fêmeas colocam em média 1000 ovos por dia, que são depositados na parede do intestino, onde podem amadurecer, serem destruídos, levados para o fígado ou atingirem a luz intestinal e serem eliminados nas fezes, onde permanecem viáveis por 7 dias (LIMA, 2002a).

As fezes, em contato com a água, liberam os miracídeos, estágio larval de vida livre dos vermes, que penetram em caramujos, onde se reproduzem assexuadamente, iniciando o ciclo no invertebrado. Após um mês o caramujo começa a eliminar as cercárias (milhares ao dia) que infectam a água de rios, lagos e canais de irrigação em zonas endêmicas. As cercárias permanecem na água por 72 horas até a invasão percutânea no homem, onde ela se transforma em esquistossômulos, alterando a sua bioquímica na superfície e permitindo que eles escapem do sistema imune do hospedeiro. Um dia após a penetração, os esquistossômulos já são encontrados nos pulmões e, em nove dias, eles invadem o fígado, onde se alimentam e se desenvolvem até a vida adulta. Os vermes adultos permanecem no sistema mesentérico, onde um

novo ciclo é iniciado pela produção de ovos (FRÉZARD *et al.*, 2005; GRYSEELS *et al.*, 2006). O *S. haematobium* instala-se nas veias do trato geniturinário, o *S. mansoni* nas veias do cólon e mesentério e o *S. japonicum* distribui-se mais amplamente pelas veias do tubo digestivo e sistema porta (LIMA, 2002a; CAFFREY, 2007).

Os ovos podem ser levados para o fígado, gerando inflamação periportal e esplenomegalia. Também pode ocorrer migração para outros tecidos, como pulmões e sistema nervoso central (RICHTER, 2000; LIMA, 2002a). O ovo é o principal elemento da patogenia da esquistossomose; quando amadurece, o miracídeo produz antígenos, gerando uma reação granulomatosa local com lesões muitas vezes irreversíveis. Lesões pulmonares devidas a arteriolite necrosante, com obstrução vascular e hipertensão pulmonar, podem ser observadas, bem como alterações no sistema nervoso central. A fase crônica da doença pode levar à morte. (LAMBERTUCCI *et al.*, 2000; RICHTER, 2000; LIMA, 2002a).

2.1.1. DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA

A esquistossomose é uma doença parasitária e um dos principais problemas de saúde pública que acomete a África, Ásia e América do Sul em um total de 74 países. A estimativa é de que 200 milhões de pessoas estejam afetadas por esta doença, sendo que 20 milhões sofrem severamente, principalmente crianças (CHITSULO *et al.*, 2000; WHO, 2006; TAYLOR, 2008). A taxa de mortalidade é de 280.000 pessoas por ano, sendo o maior percentual de mortes no continente africano (JEZIORSKI E GREENBERG, 2006). Embora as taxas de mortalidade sejam relativamente baixas em adultos, a capacidade debilitante é muito grande. Já em crianças em idade pré-escolar, o risco de morbidade é maior. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas áreas tropicais e subtropicais, a esquistossomose é a segunda doença mais importante em termos sócio-econômicos e de saúde pública, superada apenas pela malária (WHO, 2006).

O Brasil é o país mais afetado das Américas, sendo que sua área endêmica abrange 19 estados, com aproximadamente 26 milhões de habitantes expostos ao risco de contrair a doença. Estima-se que, destas, 8 milhões estejam parasitadas. O aumento da população em áreas de risco e a falta de saneamento elevam a proliferação da

esquistossomose (CHITSULO *et al.*, 2000). Para um método de controle de transmissão eficiente, além de medidas sanitárias, é necessária a quimioterapia.

2.1.2. QUIMIOTERAPIA

O tratamento medicamentoso da esquistossomose sempre foi limitado pela dificuldade de serem encontrados quimioterápicos que exibissem alta eficácia e grande tolerabilidade. No início, foram utilizados o tartarato de potássio e antimônio, tártaro emético, introduzido em 1918, seguido pelo estibofeno. Os derivados antimoniais, apesar de atuarem com eficácia contra as três principais espécies do gênero *Shistosoma*, deixaram de ser usados no tratamento desta helmintose por ocasionarem inúmeros efeitos colaterais, como a trombocitopenia e outras discrasias sanguíneas (NOVAES *et al.*, 1999).

Posteriormente, foram utilizados a lucantona e a hicantona, que são eficazes, especificamente contra o *S. mansoni* e o *S. haematobium*. Foi também empregado o fármaco 1-niridazol, eficaz contra o *S. haematobium* e o *S. japonicum*. Estes fármacos não são mais utilizados na terapia medicamentosa da esquistossomose por resultarem em reações adversas, tais como lesões hepáticas e renais, convulsões, psicoses, alucinações visuais e auditivas, estados confusionais e outros efeitos indesejáveis sobre o sistema nervoso central (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Atualmente os fármacos de escolha para o tratamento das esquistossomoses são a oxamniquina e o praziquantel (PZQ). O primeiro só atua na esquistossomose mansônica e apresenta efeitos colaterais no sistema nervoso central e efeitos carcinogênicos, além de possuir um custo bem elevado (ARAÚJO *et al.*, 2008a). Esses fármacos apresentam algumas limitações, como baixa eficácia no tratamento, em função da baixa atividade sobre o *S. mansoni* na forma imatura e a ocorrência de resistência aos fármacos (FREZARD E MELO, 1997; FERRARI *et al.*, 2003; FREZZA *et al.*, 2007). Em função disso, alternativas tecnológicas para obtenção de sistemas que aumentem a eficácia terapêutica são fundamentais.

2.2. PRAZIQUANTEL

O PZQ é um derivado imidazolidinônico, descoberto em 1972 na Alemanha, cuja fórmula estrutural está mostrada na Figura 1. Ele foi selecionado entre 400 moléculas com atividade anti-helmíntica para tratamento de parasitas trematodos e cestodos (REICH E GOVINDARAJ, 1998).

O praziquantel (PZQ) é um anti-helmíntico de amplo espectro, foi o primeiro produto aprovado para uso veterinário no tratamento da esquistossomose, e logo foi empregado para o tratamento de outras verminoses como a cisticercose. Em seguida, foi aprovado seu uso em humanos (WASTON, 2009). Hoje o PZQ é o fármaco de escolha no tratamento de todas as espécies de esquistossomos, sendo também indicado para o tratamento de teníase, cisticercose e infecções por *Diphyllobothrium spp* e *Hymenolepis nana*. O PZQ faz parte da lista de fármacos essenciais da OMS (NOVAES *et al.*, 1999; GREENBERG, 2005; WHO, 2006; TAYLOR, 2008).

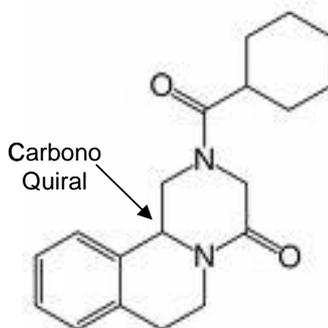


Figura 1 – Fórmula estrutural do praziquantel

No início dos anos 80 o alto custo desse medicamento era um obstáculo para o controle da esquistossomose em países pobres (REICH & GOVINDARAJ, 1998). Desde o início da década de 90, o PZQ apresenta um baixo custo de utilização em função da competição internacional e do surgimento de genéricos, por conta da expiração da patente do fármaco.

2.2.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

O nome químico do praziquantel é (\pm)-2ciclo-hexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona. Esse fármaco se apresenta sob a forma de pó ou de cristais brancos, com faixa de fusão de 136 a 138°C (F. BRAS. IV, 1996; THE MERCK INDEX, 2001). O PZQ apresenta baixa solubilidade em água (0,4 mg/mL), o que, associado à sua baixa molhabilidade, aumenta as dificuldades para a preparação de formulações farmacêuticas como soluções orais, suspensões, granulados e injetáveis. Porém, o PZQ é solúvel em etanol e facilmente solúvel em clorofórmio (F. BRAS. IV, 1996; DE LA TORRE *et al.*, 1999). Esse fármaco é fotosensível, possui gosto amargo, é higroscópico e é estável em condições normais (THE MERCK INDEX, 2001).

O PZQ é normalmente obtido como uma mistura racêmica (1:1 na mistura de enantiômeros), sendo que o R-(-)-enantiômero é ativo, enquanto o S-(+)-enantiômero é inativo, e apresenta maior toxicidade (LIM *et al.*, 1995; CIOLI, 1998; MEIER E BLASCHKE, 2001; FENWICK *et al.*, 2003; GREENBERG, 2005; ROSZKOWSKI *et al.*, 2006). Além disso, o enantiômero inativo, S-(+)-enantiômero, está associado aos efeitos colaterais do medicamento bem como ao sabor amargo. Dessa forma a síntese do enantiômero ativo puro está no plano de negócios da OMS para o período de 2008 a 2013 (WOELFLE *et al.*, 2011).

2.2.2. MECANISMO DE AÇÃO, PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS E FARMACOCINÉTICAS

O mecanismo de ação do praziquantel se baseia na alteração da homeostasia do cálcio nas células do verme; entretanto, esse mecanismo ainda não é bem elucidado. A homeostasia provoca contração da musculatura e danos no tegumento, camada que protege o verme do mundo exterior ("pele"), resultando em paralisia e morte do helminto. Uma vantagem deste fármaco é sua ação, não só nas formas adultas do helminto, mas também nas formas imaturas e nas cercárias (forma do parasita que infecta o homem ao penetrar na pele) (MARTIN, 1997; RANG *et al.*; 2002; DAYAN, 2003).

O PZQ é absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal e seu pico plasmático é alcançado 1 a 3 horas após sua administração. A administração concomitante com alimentos aumenta significativamente a biodisponibilidade do PZQ (CASTRO *et al.*, 2000). Este fármaco sofre intenso efeito de primeira passagem no fígado, sendo seus metabólitos inativos (DAYAN, 2003). Assim, as “formas jovens” dos vermes são expostas a baixas concentrações de PZQ na circulação sistêmica. Assim como outros fármacos, esta substância liga-se amplamente às proteínas plasmáticas (85,0%).

A meia-vida plasmática do PZQ varia em torno de 60 a 90 minutos. A eliminação ocorre pela urina. O fármaco também é excretado pelo leite materno, devendo-se, portanto, evitar a lactação durante 3 ou 4 dias após sua administração (LIMA, 2002b).

Em doses terapêuticas o praziquantel não exerce nenhum efeito no homem, somente no helminto (RANG *et al.*; 2002; LIMA, 2002b). Efeitos indesejáveis podem ocorrer, porém são leves, transitórios e de rara importância clínica, pois o PZQ é um fármaco de baixa toxicidade. Os efeitos mais comuns são distúrbios gastrointestinais, tonteira, dores musculares e articulares, erupções cutâneas, febre baixa, hepatomegalia e esplenomegalia (LAMBERTUCCI *et al.*, 2000; RANG *et al.*, 2002).

Poucas interações medicamentosas são conhecidas: administração concomitante de carbamazepina, fenitoína ou dexametasona pode ocasionar diminuição dos níveis sanguíneos do praziquantel (LIMA, 2002b).

2.2.3. CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

O PZQ é um fármaco de classe II; ou seja, apresenta baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade pelas membranas do trato gastrointestinal (LINDENBERG *et al.*, 2004; PASSERINI *et al.*, 2006). A solubilidade de um fármaco é determinada pela solubilização da dosagem mais alta de um medicamento em 250 mL de uma solução tampão de pH entre 1,0 e 8,0. O fármaco será considerado altamente solúvel se a dose deste for solúvel em um volume de tampão menor ou igual a 250 mL. Já uma alta permeabilidade é quando a biodisponibilidade absoluta é maior que 90% (AMIDON *et al.*, 1995). Esses fatores são fundamentais no processo de absorção e, conseqüentemente, na biodisponibilidade de fármacos, uma vez que a velocidade de

dissolução é diretamente proporcional à solubilidade. Portanto, a velocidade de dissolução é fundamental para que haja absorção, para que concentrações efetivas do fármaco atinjam o tecido do parasita (CAFFREY, 2007; ANSEL *et al.*, 2007). Já a permeabilidade é fundamental no processo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco.

2.2.4. FORMAS FARMACÊUTICAS NO BRASIL E NO MUNDO

Atualmente a única forma farmacêutica existente no mercado é a de comprimidos, nas dosagens 150, 500 e 600 mg, sendo a posologia feita de acordo com a massa corporal do paciente. As indústrias farmacêuticas responsáveis pela produção destes medicamentos com registro ativo, conforme listagem no *site* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são a Merck S/A com os medicamentos Cestox® (150 mg) e Cisticid® (500 mg), e Farmanguinhos – Fundação Oswaldo Cruz, com o medicamento Praziquantel (600 mg). A dose de 600 mg é a mais comum no mundo, o que dificulta a administração a crianças pois a divisão ou o esmagamento do comprimido acentua o sabor amargo, dificultando a aceitação por elas (WOELFLE *et al.*, 2011). O produto de referência internacional à base de praziquantel é fabricado pela empresa alemã Bayer Healthcare Pharmaceuticals com o nome de Biltricide, comercializado na forma de comprimidos revestidos com a dosagem de 600 mg, conforme mostrado na Figura 2.



Figura 2 – Aspecto do produto fabricado pela empresa Bayer

Observa-se que o comprimido, mesmo sendo revestido, possui 3 sulcos, permitindo que o comprimido seja partido em até 4 partes, para melhor adequação da dose para uso pediátrico. Este procedimento, além de anular o efeito de mascaramento de sabor proporcionado pelo revestimento (quando a película está íntegra), pode ocasionar variações de dosagem durante o processo de corte e atrapalhar a terapêutica, conforme já descrito em literatura e mencionado anteriormente (VAN SANTEN *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2011; VERRUE *et al.*, 2011).

A Tabela 1 apresenta detalhes sobre os medicamentos à base de praziquantel comercializados no Brasil e seus cuidados de administração. A única formulação líquida, específica para uso pediátrico e citada na literatura (Epiquantel 120 mg/ml suspensão), é produzida por uma indústria farmacêutica egípcia chamada Eipico (Egyptian International Pharmaceutical Industries CO.) (BOTROS *et al.*, 2010). A formulação é comercializada em embalagens de 15 ml com validade de 3 anos à temperatura ambiente, mas não é distribuída pelo SUS no Brasil nem pela OMS no mundo (EPIQUANTEL, 2007; OLDS E DASARATHY, 2000). Em relação ao gosto dessa formulação não há nenhum relato na literatura, mas acredita-se que não tenha boa aceitação pelas crianças, caso contrário a OMS provavelmente já a teria adotado.

A formulação quali-quantitativa do referido produto assim como as funções de cada ingrediente são apresentadas na Tabela 2.

Como pode ser notado na Tabela 2, a formulação apresenta uma forma farmacêutica de suspensão, em função da baixa solubilidade do fármaco no solvente água. A formulação apresentada é do tipo pronta para uso, ou seja, não é necessária a suspensão prévia do pó.

Tabela 1 – Medicamentos à base de praziquantel comercializados no Brasil e os cuidados na administração

Medicamento	Fabricante	Forma Farmacêutica	Dosagem	Excipientes	Validade	Cuidados de administração	Referência
Cestox	Merck S.A.	Comprimidos	150 mg	amido (de milho), celulose microcristalina, estearato de magnésio, laurilsulfato de sódio e povidona.	36 meses a temperatura ambiente	A quantidade recomendada de comprimidos deve ser ingerida de uma só vez, durante uma refeição. Os comprimidos devem ser engolidos inteiros, sem mastigar.	www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25881-1-0].PDF
Cisticid	Merck S.A.	Comprimidos	500 mg	amido de milho, celulose microcristalina, dióxido de silício, estearato de magnésio, laurilsulfato de sódio e povidona.	36 meses a temperatura ambiente	A quantidade de comprimidos deve ser estabelecida pelo médico, em função do peso corporal do paciente. Devido ao gosto desagradável do PZQ, os comprimidos devem ser engolidos inteiros, com líquido, durante as refeições. Se necessário, podem ser dissolvidos e administrados por sonda nasogástrica.	www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25883-1-0].PDF
Praziquantel	Farmanguinhos	Comprimidos	600 mg	celulose microcristalina, estearato de magnésio, amidoglicolato de sódio, povidona, laurilsulfato de sódio	24 meses a temperatura ambiente	Praziquantel é administrado por via oral, de preferência com alimentos. Os comprimidos não devem ser mastigados, mas podem ser partidos ao meio ou em quatro partes, para permitir a administração de doses individualizadas. Como tem gosto amargo, deve ser ingerido imediatamente com suficiente quantidade de líquidos para evitar vômitos	http://www2.far.fiocruz.br/farmanguinhos_old/index.php?Itemid=139&id=3%3Ap&limitstart=20&option=com_phocadownload&view=category

Tabela 2 – Formulação quali-quantitativa do produto Epiquantel 120 mg/ml suspensão oral (EPIQUANTEL, 2007).

Ingredientes	%p/v	Função (Handbook*)
Praziquantel micronizado	12	Ativo
Sacarose	45	Edulcorante
Hidroxipropilmetilcelulose	0,34	Agente suspensor
Carboximetilcelulose	0,2	Agente suspensor
Sacarina sódica	0,15	Edulcorante
Óleo de anis	0,10	Aromatizante
Mentol	0,10	Aromatizante
Benzoato de sódio	0,15	Conservante
Dióxido de silício coloidal	0,08	Agente suspensor
Sorbitol 70% solução	6,0	Edulcorante/ Co-solvente
Propilenoglicol	0,2	Co-solvente
Água purificada qsp	100 ml	Solvente

*KIBBE, A. H. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3 ed. Washington, DC: American Pharmaceutical Association, 2000.

2.3. SUSPENSÕES FARMACÊUTICAS

A forma farmacêutica suspensão é uma excelente ferramenta para a administração de fármacos de baixa solubilidade. Durante o desenvolvimento de uma suspensão, deve-se garantir que o fármaco a ser suspenso tenha um tamanho de partícula bastante reduzido com intuito de assegurar uma baixa velocidade de sedimentação (ANSEL *et al.*, 2000). Por isso, a utilização do fármaco micronizado na Tabela 2.

A formulação de uma suspensão requer a presença de agentes suspensores, que podem ser classificados como modificadores de viscosidade, e os agentes flocculantes e tixotrópicos. O aumento da viscosidade propicia a diminuição da velocidade de sedimentação e aumenta a uniformidade da dose; contudo, o aumento da viscosidade não pode ultrapassar um limite em que a administração fique comprometida por dificuldade de escoamento do produto. Entre os agentes incrementadores da viscosidade usualmente utilizados em suspensões orais estão as gomas (celuloses hidrossolúveis que produzem soluções coloidais viscosas) e as argilas (ANSEL *et al.*, 2005).

Tendo em vista que a sedimentação é um fenômeno difícil de ser controlado (principalmente em suspensões prontas), deve-se intervir para que o sedimento formado seja facilmente redispersível, no momento da administração. Para isso, deve-se produzir um sistema floculado no interior da suspensão. Entre os agentes floculantes mais comumente empregados estão os eletrólitos, utilizados para floculação de ativos que se ionizam, por meio do balanceamento de cargas e redução do potencial zeta. Há também agentes floculantes poliméricos como o amido, os alginatos e os derivados da celulose. Nesse caso, as cadeias ramificadas formam no interior da suspensão um retículo semelhante ao de um gel, no qual ficam retidas as partículas do suspensóide. A sedimentação em flocos é mais rápida, o que pode ser prejudicial à uniformidade da dosagem; contudo, é considerada desejável, já que garante uma maior estabilidade física da suspensão e facilita a resuspensão (PRISTA *et al.*, 1995).

É importante também ressaltar a presença de edulcorantes e aromatizantes, para melhoria de sabor da formulação, principalmente nos casos de fármacos de sabor amargo.

Sabor é definido como "a sensação de aroma percebida na boca em contato com uma substância". Um alimento ou medicamento que é palatável é aquele que é "agradável ao paladar" (MATSUI, 2007). A amargura excessiva dos ingredientes farmacêuticos de fórmulas para via oral (líquidas/suspensão ou comprimidos mastigáveis / sublinguais) é um dos maiores problemas que enfrentam os formuladores (ZHENG *et al.*, 2006).

Crianças diferem dos adultos quanto ao gosto. Lactentes e crianças têm uma preferência por substâncias com sabor doce (MATSUI, 2007). É frequente que as crianças não tomem medicamentos corretamente por causa do sabor desagradável. O não cumprimento do tratamento pode levar ao agravamento da condição de doente (SUTHAR e PATEL, 2011). A disponibilidade de uma formulação adequada de um medicamento é frequentemente um obstáculo para o tratamento de crianças, especialmente as mais jovens, que são incapazes de tomar formas farmacêuticas sólidas (MATSUI, 2007).

Tecnologias de mascaramento do sabor têm sido usadas para resolver o problema da adesão do paciente. Uso de adoçantes, aminoácidos e aromatizantes, são muitas vezes insuficientes para mascarar o sabor amargo de alguns medicamentos (SUTHAR E PATEL, 2011). A flavorização de uma preparação farmacêutica é complexa, pois a

percepção do paladar agradável ou desagradável depende de preferências individuais (FERREIRA, 2002).

Em função da baixa solubilidade do fármaco na fase aquosa, a forma farmacêutica de escolha para esse trabalho é a suspensão. Diferentemente do produto egípcio, sugere-se a utilização da suspensão extemporânea. A mesma apresenta várias vantagens em relação às suspensões prontas para uso, dentre elas :

- Facilidade de produção - trata da mistura e envase de pós, o que confere uma alta produtividade ao processo.
- Estabilidade - a baixa atividade de água garante uma estabilidade mais adequada do produto armazenado.
- Facilidade na logística de distribuição - suspensões extemporâneas podem ser envasadas em frascos (se possível plásticos) ou em sachets apresentam um peso unitário de transporte menor que as formas líquidas prontas. Além disso, a portabilidade por parte dos responsáveis do paciente também é facilitada.

Existem também algumas desvantagens, tais como a geração de pós no ambiente de produção, a dependência do usuário na reconstituição da forma farmacêutica e a manutenção de estabilidade no meio líquido após a reconstituição.

2.3.1. RELAÇÃO MÁSSICA DO PRODUTO E CONCENTRAÇÃO FINAL DA FORMULAÇÃO

Uma vez escolhida a forma farmacêutica, suspensão extemporânea, deve-se escolher uma massa de envase que atenda a um esquema posológico que possa ser facilmente usado na terapêutica. A Tabela 3 simula algumas opções de volume de dose a ser administrado e de volume final do tratamento, usando diferentes sugestões de concentração de produto final para uma otimização de embalagem do produto.

A dosagem de 60 mg/kg/dia foi escolhida por ser a maior dosagem a ser administrada no público pediátrico e para o tratamento da esquistossomose.

A sugestão de concentração de 120 a 200 mg/ml é a que permite a administração do menor volume por dosagem e a que necessitaria do menor volume/ tamanho de embalagem final.

Tabela 3 – Cálculo dos volumes de dose a serem administrados e de volume final do tratamento para diferentes sugestões de concentração de produto final (20 mg/Kg três vezes ao dia).

Necessidades de doses diárias			Sugestões de dosagens da suspensão (mg/ml)							
			200 ¹		120 ²		60 ³		30 ⁴	
Peso (Kg)	Dose Unitária (mg)	Dose diária (mg)	Dose (mL)	Total (mL)	Dose (mL)	Total (mL)	Dose (mL)	Total (mL)	Dose (mL)	Total (mL)
15	300	900	1,5	4,5	2,5	7,5	5,0	15	10,0	30
20	400	1200	2,0	6	3,3	10	6,7	20	13,3	40
25	500	1500	2,5	7,5	4,2	12,5	8,3	25	16,7	50
30	600	1800	3,0	9	5,0	15	10,0	30	20,0	60
35	700	2100	3,5	10,5	5,8	17,5	11,7	35	23,3	70
40	800	2400	4,0	12	6,7	20	13,3	40	26,7	80

¹ Concentração sugerida pelo Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde

² Concentração da suspensão pediátrica egípcia.

^{3 e 4} Concentrações sugeridas neste trabalho.

2.4. ALTERNATIVAS AVANÇADAS DE FORMULAÇÃO PARA FÁRMACOS DE BAIXA SOLUBILIDADE EM ÁGUA

Estima-se que cerca de 40% dos fármacos novos falhem durante o desenvolvimento por possuírem uma pobre biodisponibilidade, geralmente associada à baixa solubilidade em água desses compostos (KOCBEK *et al.*, 2006. QUAN *et al.*, 2011). Este é um dos maiores desafios em termos de formulação que a indústria tem vivido nos últimos tempos. Existem diversas alternativas a serem avaliadas quando há o desafio de trabalhar com fármacos pouco hidrossolúveis. As mais relatadas na literatura são a formação de microemulsões, o encapsulamento por lipossomas, a formação de sais, a redução de tamanho de partículas, a formação de dispersões sólidas, a complexação e o encapsulamento em nanopartículas poliméricas.

As microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, compostos por dois líquidos imiscíveis (geralmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos localizado na interface entre as duas fases hidrofílica e hidrofóbica (FORMARIZ *et al.*, 2005). As microemulsões apresentam grande potencial como sistemas de liberação de fármacos, pois podem aumentar a estabilidade e a solubilidade de fármacos, além de aumentarem a biodisponibilidade sem aumentar os efeitos colaterais sistêmicos (LAWRENCE E REES, 2000). Esses sistemas têm a capacidade de melhorar a solubilização de fármacos lipofílicos em água, além de protegê-los da hidrólise enzimática e aumentar o potencial de absorção devido à presença de tensoativo (HOAR E SCHULMAN, 1943; DANIELSSON E LINDMAN, 1981; FORMARIZ *et al.*, 2005).

Os lipossomas são estruturas esféricas constituídas por moléculas anfifílicas à base de fosfolipídeos que contêm duas cadeias hidrofóbicas e uma cabeça hidrofílica. Essas espécies são biodegradáveis por serem constituídas de fosfolipídeos. A biodegradabilidade e a não toxicidade dos principais constituintes dos lipossomas permitem que eles possam ser usados para o encapsulamento de diversos agentes terapêuticos, independentemente da carga ou massa molecular. A encapsulação de fármacos em lipossomas pode alterar a farmacocinética, reduzindo os efeitos tóxicos e aumentando a eficácia terapêutica (MOURÃO *et al.*, 2005; DATE *et al.*, 2007). Entretanto, o desenvolvimento de fármacos em lipossomas é limitado, em função da baixa eficiência de encapsulamento, rápida interação com fármacos solúveis em água na

presença de componentes sanguíneos e da baixa estabilidade desses sistemas (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

As dispersões sólidas são misturas heterogêneas de fármacos pobremente solúveis em água, dispersos em carreadores solúveis e biologicamente inertes. Essas misturas são preparadas com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade oral dos fármacos por redução do tamanho de partícula e alteração da forma cristalina (DE LA TORRE *et al.*, 1999).

A complexação é uma técnica usada comumente com ciclodextrinas. A solubilidade em água e as taxas de dissolução de fármacos hidrofóbicos aumenta consideravelmente quando estes são complexados com ciclodextrinas. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos solúveis em água. O fármaco lipofílico se complexa através da cavidade hidrofóbica da ciclodextrina, melhorando assim sua solubilidade (LOFTSSON E BREWSTER, 1996; BECKET *et al.*, 1999).

As nanopartículas ocupam uma posição de destaque entre os sistemas de liberação de fármacos atualmente disponíveis, por apresentarem estabilidade coloidal, resistência química e serem de fácil de produção (LANDFESTER *et al.*, 2010). As nanopartículas dividem-se basicamente em nanocápsulas e nanoesferas e apresentam uma faixa de tamanhos característicos de 10 a 1000 nm (RAO E GECKELER, 2011). Atualmente há questionamentos em relação a essa faixa, pois muitos autores e órgãos regulatórios, como o FDA (Food and Drug Administration), consideram nanopartículas materiais que tenham de 1 a 100 nm. Além do potencial incremento das propriedades de dissolução de fármacos hidrofóbicos, as nanopartículas podem apresentar outras vantagens biofarmacêuticas, como aumento na biodisponibilidade, melhoria na proporcionalidade de doses, redução da variabilidade em indivíduos alimentados ou em jejum, redução da variabilidade inter-pacientes e melhoria na taxa de absorção (tanto em humanos quanto em animais) (MÜLLER *et al.*, 2001).

2.4.1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTENDO PRAZIQUANTEL

A literatura apresenta alguns trabalhos que objetivam aumentar a biodisponibilidade do praziquantel com auxílio de diversos sistemas. Esses sistemas possuem capacidade de compartimentalizar de maneira eficiente agentes terapêuticos e

modificar as propriedades e o comportamento de fármacos em meios biológicos, aumentando a eficácia dos fármacos. Esses sistemas são capazes de alterar a farmacocinética, aumentar a solubilidade de ativos lipofílicos, reduzir a distribuição inespecífica e aumentá-la nos tecidos alvo.

EL-ARINI E LEUENBERGER (1998) formaram dispersões sólidas de polivinilpirrolidona (PVP) com PZQ. Esses sistemas promovem o aumento da área específica pela redução do tamanho de partícula, além de promover outras alterações como a passagem do fármaco do estado cristalino para amorfo, o aumento da molhabilidade e a redução das forças de coesão (SETHIA E SQUILANTE, 2003). Ambos os componentes foram dissolvidos em uma solução etanólica, em que o solvente foi posteriormente evaporado. Polímeros hidrossolúveis, como PVP, aumentam a solubilidade e a taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis em água. O alvo do trabalho foi aumentar a solubilidade e as características de dissolução do PZQ em uma dispersão sólida PZQ-PVP, comparando-se os resultados obtidos com os da mistura física entre os mesmos componentes e com os da própria matéria-prima de PZQ. O sistema proposto aumentou a taxa de dissolução em relação às misturas físicas. O complexo formado atuou como uma nova entidade química, com propriedades diferenciadas das observadas nos outros sistemas. Nas misturas físicas, o polímero agiu como um agente formador de complexos em solução, aumentando também o percentual de dissolução do fármaco em função do tempo, quando comparado com os resultados obtidos quando o PZQ foi estudado isoladamente. Nesse sistema, o polímero provavelmente atuou como um promotor de desintegração.

DE LA TORRE *et. al.* (1999) também prepararam uma dispersão sólida de PZQ em PVP. As dispersões foram preparadas pelo método de evaporação do solvente. O objetivo deste estudo foi verificar as propriedades físicas e a taxa de dissolução do PZQ em dispersões sólidas de PZQ-PVP. Os resultados da dissolução foram semelhantes aos encontrados por EL-ARINI E LEUENBERGER (1998), demonstrando um aumento da taxa de dissolução tanto das dispersões sólidas quanto na mistura física PZQ-PVP, sendo a taxa de liberação desta última inferior ao da primeira. Nesse trabalho, a caracterização da dispersão foi mais efetiva. A inclusão de PZQ na matriz de PVP foi observada por microscopia eletrônica de varredura, que demonstrou que a dispersão possui uma estrutura lamelar atribuída ao PVP e alguns filamentos oriundos do PZQ. Na dispersão sólida, a quantidade de PZQ na superfície das partículas de PVP diminuiu

com o aumento da fração de polímero. A análise térmica foi realizada; entretanto, não foi conclusiva. Os resultados de difração de raios X demonstraram as diferenças existentes entre os co-precipitados amorfos PZQ-PVP.

BECKET *et al.* (1999) modificaram o PZQ com ciclodextrinas. O trabalho teve como objetivo aumentar a solubilidade do PZQ, permitindo uma futura administração parenteral do fármaco. O trabalho apresentou uma boa complexação do PZQ com a β -ciclodextrina. Este fato foi confirmado por análise térmica, ressonância magnética nuclear (RMN) e análise elementar. O complexo ciclodextrinas-PZQ permitiu um incremento da velocidade de dissolução do praziquantel, quando comparada ao fármaco livre.

AKBARIEH *et al.* (1992), MOURÃO *et al.* (2005) e FREZZA *et al.* (2007) incorporaram PZQ em lipossomas. Estes trabalhos objetivaram a aumentar a biodisponibilidade do PZQ em lipossomas. A avaliação foi realizada através de estudos *in vivo*. Os resultados verificaram que a liberação do PZQ em lipossomas foi mais efetiva que a do PZQ livre, permitindo um aumento da concentração do fármaco na circulação, reduzindo a quantidade de ovos do parasita e matando o verme.

MAINARDES E EVANGELISTA (2005) produziram nanopartículas de PLGA (copolímero de ácido lático e ácido glicólico) contendo PZQ. As nanopartículas constituíam uma matriz polimérica em que as substâncias ativas eram adsorvidas. Esses sistemas têm sido amplamente empregados na liberação de fármacos, pois permitem um aumento da concentração de ativo nos tecidos alvo devido, entre outros fatores, ao tamanho de partícula, aceitável para injeções intravenosas. O trabalho demonstrou uma incorporação de PZQ de 10 a 30% nas nanopartículas poliméricas. O fármaco nanoencapsulado apresentou uma cinética de liberação *in vitro* muito mais lenta do que o fármaco livre, podendo ser empregado em sistemas de liberação controlada.

PASSERINI *et al.* (2006) avaliaram as técnicas de “*melt granulation*” (granulação por fusão) e “*spray congealing*” (liofilização) para dissolução do PZQ em matrizes orgânicas. Com a primeira técnica foram feitos grânulos de PZQ com lactose, com PEG 4000 e poloxamer 188 (copolímero em bloco de óxido de etileno e propileno). A segunda técnica permitiu a fabricação de micropartículas com Gelucire® 50/13 (Polioxilglicerídeo). A caracterização dos grânulos permitiu observar que o poloxamer 188 exerceu um maior efeito sobre a solubilidade do PZQ que o PEG 4000. As

micropartículas de PZQ aumentaram significativamente a taxa de dissolução, quando comparadas ao fármaco livre e aos grânulos. As duas técnicas descritas foram consideradas adequadas, pois, além de cumprirem a finalidade de aumentar a dissolução do PZQ, também são rapidamente implementadas, apresentam baixo custo e são livres de solventes.

LIMA *et al.* (2007) prepararam dispersões sólidas de PZQ em polietilenoglicol (PEG) com auxílio de um fluido supercrítico de dióxido de carbono, objetivando um aumento da taxa de dissolução do fármaco. As dispersões alcançaram um perfil de dissolução melhor do que o obtido com as misturas físicas, provavelmente em função de uma maior interação do PZQ com o carreador, resultando no aumento da área específica (pela redução do tamanho de partícula).

Os trabalhos aqui apresentados se preocuparam basicamente com o aumento da taxa de dissolução do PZQ em veículos aquosos e foram bem sucedidos. BECKETT (1999) e MOURÃO (2005) sugerem o uso de outras vias de administração além da via oral, como a via parenteral. No entanto, isso gera um aumento do custo do tratamento. Nenhum dos trabalhos citados aqui gerou um produto acabado; ou seja, um medicamento. Nenhum dos trabalhos relatados apresentou preocupação com o mascaramento de sabor. É importante observar também que as técnicas de formação das nanopartículas empregadas nos estudos publicados são limitadas a pequenas escalas.

2.5. NANOPARTÍCULAS – SISTEMAS POLIMÉRICOS

Os anos 50 e 60 foram caracterizados por grandes avanços na área farmacêutica, quando surgiram as formulações de liberação retardada e controlada. A estratégia empregada foi o desenvolvimento de sistemas de liberação “minimizados”, ou seja, com partículas de pequeno tamanho. Em 1960 foram desenvolvidas as primeiras nanopartículas para produção de vacinas testes. O primeiro produto comercial nanoparticulado na área farmacêutica foi o Abraxame® (albumina sérica humana nanoparticulada contendo paclitaxel), que apareceu no mercado no início de 2005 (KREUTER, 2006). O Paclitaxel é uma formulação do taxol em nanopartículas de albumina (polímero natural). As nanopartículas de albumina foram usadas porque são naturais e não apresentam toxicidade (DUNCAN, 2006). A partir desse momento,

outros produtos foram surgindo como o Combidex®, nanocápsulas de óxido de ferro empregadas como agentes de contraste em exames de imagem por ressonância magnética para avaliação de tumores. Entretanto, na maioria dos medicamentos existentes não é revelado o tipo de interação entre o fármaco e o polímero, acredita-se que seja por uma questão de sigilo industrial.

Atualmente a área de nanotecnologia tem recebido grandes investimentos por parte das indústrias farmacêuticas por ser promissora para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos para diferentes usos, como o uso oral, intramuscular, injeções subcutâneas, transdérmicos, dentre outros. As nanopartículas poliméricas também vêm sendo empregadas para estabilização de fármacos, proteínas e DNA recombinante frente a agentes como pH e luz; na prevenção da toxicidade; para aumento da absorção no organismo e conseqüentemente da biodisponibilidade; para o mascaramento de sabor e outras características organolépticas; e como ferramenta para formulação de formas farmacêuticas para liberação modificada (O'DONNELL E MCGINITY, 1997; YAMAGATA *et al.*, 2003; NGWULUKA, 2010; LANDFESTER *et al.*, 2010).

O uso de sistemas multiparticulados pode ser benéfico para os tratamentos, pois permite uma rápida e uniforme distribuição do fármaco pela superfície do intestino, diminuindo a variação na absorção (BECKERT *et al.*, 1996). Esse fato é de grande relevância fisiológica, pois as partículas podem ficar menos sujeitas à degradação pelo pH ácido, além de aumentar o tempo de meia vida de fármacos que são rapidamente metabolizados ou excretados, como demonstrado por FERRUTI (1981). A aplicação deste tipo de tecnologia tem como objetivos principais aumentar a eficácia de diversos tratamentos, pois permite uma distribuição rápida e uniforme pelo trato gastrointestinal (TGI), diminuir a variação na biodisponibilidade, diminuir os efeitos colaterais encontrados nos métodos convencionais, reduzir o risco de desestabilização do fármaco, propiciar maior reprodutibilidade de dose, diminuir o número de fármacos usados para o tratamento de uma doença e dispensar modos de aplicação nos quais é exigida qualificação profissional especial (como, por exemplo, nas aplicações de injetáveis, que possuem também diversos outros inconvenientes) (LIN E KAO, 1991; UHRICH, 1999).

Foi demonstrado por SCHREIRER (2001) que o esvaziamento gástrico de *pellets* com diâmetro inferior a 1,4 mm e densidade de até 2,4 g/cm³ é extremamente rápido, semelhante ao esvaziamento de líquidos, independentemente da alimentação. Dessa

forma, nanopartículas são ainda mais eficazes na distribuição pelo TGI, em função do menor diâmetro das partículas, e da maior captação intracelular (REIS *et al.*, 2006).

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas genericamente como nanoesferas e nanocápsulas (Figura 3). Nanoesferas são estruturas contínuas, nas quais os compostos ativos podem estar adsorvidos na superfície, aprisionados ou dissolvidos na matriz. As nanocápsulas, por sua vez, têm uma capa polimérica e um núcleo oleoso interno. Neste caso, as substâncias ativas estão normalmente dissolvidas no núcleo, mas também podem estar adsorvidas na superfície (UHRICH *et al.*, 1999; KUMAR, 2000; SOPPIMATH *et al.*, 2001; VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2008). Nanocápsulas e nanoesferas são excelentes carreadores de fármacos, pois moléculas frágeis podem ser preservadas de degradações enzimáticas fisiológicas quando estão presas a um nanocarreador (VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2008).

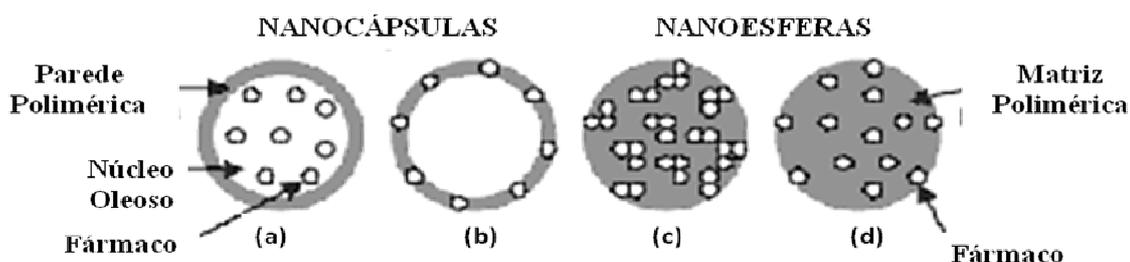


Figura 3 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso, das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (Fonte: SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Os polímeros empregados com finalidades terapêuticas podem ser biodegradáveis ou não-biodegradáveis. Os primeiros são naturalmente expelidos pelo organismo, o que é desejável; já os segundos precisam ser retirados do corpo após a liberação do ativo, a não ser em aplicações orais em que o polímero passe através do trato gastrointestinal. A eliminação total do organismo num curto período de tempo é fundamental para que não ocorra acúmulo e descontrole da quantidade de um determinado fármaco no corpo humano (UHRICH *et al.*, 1999; VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2008). As rotas usuais

de degradação *in vivo* são a hidrólise e a clivagem enzimática. Para alguns polímeros, a clivagem da cadeia resulta em produtos poliméricos solúveis em água, que podem ser excretados (LOPES *et al.*, 2005; SOPPIMATH *et al.*, 2001). O termo degradação refere-se normalmente à clivagem das ligações (processo químico), enquanto o termo erosão refere-se à deleção do material, processo físico que pode ocorrer por dissolução ou difusão. Em polímeros biodegradáveis ambos os mecanismos ocorrem, mas a extensão da erosão de superfície varia radicalmente com a estrutura química do polímero (SOPPIMATH *et al.*, 2001). A erosão é desejada porque a cinética de erosão e a taxa de liberação de fármacos são altamente correlacionadas. Dependendo do interesse do sistema de liberação, a magnitude da erosão pode ser alterada mudando simplesmente a área específica do dispositivo de liberação do fármaco. A erosão também pode ser retardada por polímeros, formados por unidades monoméricas hidrofóbicas, e pelo uso de excipientes hidrofóbicos, que podem estabilizar o polímero e o fenômeno da erosão (UHRICH *et al.*, 1999; PILLAI E PANCHAGNULA, 2001).

Além da biodegradabilidade, outras características também devem ser avaliadas. Por exemplo, os polímeros e seus produtos de degradação devem ser atóxicos (FERRUTI, 1981). Além disso, deve ser avaliada a finalidade do sistema de liberação para que se escolha o polímero com propriedades pertinentes.

Dentre os polímeros selecionados para este trabalho, o poli(metacrilato de metila), PMMA, se destaca, pois apresenta boa performance vítrea, resistência a fatores externos como o tempo, transparência e excelente estabilidade dimensional. Além disso, o PMMA foi o primeiro polímero acrílico a ser utilizado como biomaterial (CHEN *et al.*, 2010). O PMMA não é biodegradável, mas é biocompatível. Biomedicamente é empregado em cimento dental, em próteses ósseas e no revestimento de fármacos para administração oral (CHEN *et al.*, 2010). Essa classe de polímeros pode ser conjugada com proteínas, biomoléculas e ingredientes farmacêuticos ativos, encontrando usos promissores nas áreas de sistemas de liberação de fármacos, culturas de célula, bioprocessos enzimáticos, dentre outros (UCHEGBU E SCHATZLEIN, 2006b; TOMAR *et al.*, 2011).

2.5.1. DISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS NO ORGANISMO

O comportamento das nanopartículas no organismo deve ser monitorado, pois em função do pequeno diâmetro, as partículas podem se acumular no organismo e não serem eliminadas. A preocupação central é de como o organismo se comporta com esses nanomateriais. A resposta para essa questão ainda não está bem elucidada; logo, deve-se ter uma grande preocupação permanente com o uso desses materiais (DUNCAN, 2006). Os dados de distribuição das nanopartículas no organismo, administradas pela via intravenosa, demonstram que elas se concentram principalmente no fígado, baço e medula óssea, pelo sistema de fagocitose mononuclear (UCHEGBU E SCHATZLEIN, 2006). Estes órgãos funcionam como reservatórios, fazendo com que as nanopartículas desapareçam rapidamente da circulação. Dessa forma, a segunda etapa do processo é a liberação do fármaco no corpo humano e a degradação ou excreção do polímero (UCHEGBU E SCHATZLEIN, 2006). Assim, deve-se ter a preocupação com o acúmulo, eliminação e degradação desses sistemas.

A biocompatibilidade é importante nesses materiais. Efeitos adversos ou efeitos positivos devem ser analisados. A toxicologia é fundamental em todos esses estudos e pesquisas são obrigatórias nesses sistemas. Para o uso desses materiais em seres humanos, é necessário coletar toda a informação possível a respeito do nível toxicológico. Atualmente há preocupações com o risco para a saúde, como a possível alteração de genes em células hepáticas ou a destruição de células lipídicas, que são muito sensíveis à nanopartículas (DUNCAN, 2006).

A segurança para uso humano depende da rota de administração, da dose, frequência de dose e liberação de fármacos. A administração oral é a principal via de administração de medicamentos, além de ser a mais conveniente. Entretanto, diversos fatores afetam a biodisponibilidade do fármaco após a administração oral, como a baixa permeabilidade do fármaco a mucosa intestinal, a permeabilidade restrita no TGI, a baixa taxa de dissolução nos fluidos intestinais gerando uma absorção limitada e instabilidade do fármaco no TGI (PONCHEL E IRACHE, 1998; ARAÚJO *et al.*, 1999; AHLIN *et al.*, 2002).

Conforme mencionado anteriormente, sistemas nanoparticulados possibilitam um aumento na farmacocinética de vários fármacos, pois protegem os mesmos contra a degradação ácida e são capazes de transportar moléculas que não são absorvidas pela

circulação sistêmica, dentre outras propriedades já mencionadas (ARAÚJO *et al.*, 1999, MÜLLER *et al.*, 2001; AHLIN *et al.*, 2002; ESTEVES *et al.*, 2004). MAINCENT *et al.* (1986) demonstraram que a biodisponibilidade da vincamina era de aproximadamente 25%; contudo, após a administração desse mesmo fármaco em nanopartículas de poli(hexilcianoacrilato), a biodisponibilidade aumentou para 40%. AMMOURY *et al.* (1991) incorporaram indometacina em nanocápsulas de poli(isobutilcianoacrilato) e conseguiram minimizar o efeito colateral de ulceração estomacal em relação ao fármaco livre. DAMAGÉ *et al.* (1990) e LI *et al.* (2007) demonstraram que a incorporação da insulina em nanopartículas aumentou a absorção via oral, por proteger o fármaco da degradação enzimática no TGI.

2.5.1.1. Absorção no trato gastrointestinal de nanopartículas

Os fatores que interferem na absorção intestinal das nanopartículas são o tamanho da partícula, a natureza do polímero, o potencial zeta, o meio de dispersão, o revestimento com lecitinas, além da presença de nutrientes no TGI que podem influenciar a captação das partículas (DELIE, 1998; TOMAR *et al.*, 2011). O TGI é permeável a diversas partículas como nutrientes e eletrólitos; entretanto, funciona também como uma barreira para a entrada de patógenos e substâncias tóxicas. Os sistemas coloidais são permeáveis e os mecanismos de passagem dessas partículas são a captação pela via paracelular, a captação intracelular e o transporte através das células epiteliais da mucosa intestinal além da captação pelo sistema linfático pelas células *M* e de *Peyer* (KREUTER, 1991; HUSSAIN *et al.*, 2001; AHLIN *et al.*, 2002).

As nanopartículas administradas pela via oral podem seguir diferentes vias: trânsito direto no TGI até eliminação pelas fezes, bioadesão (adesão às mucosas intestinais) e absorção, sendo as duas primeiras vias as mais importantes (PONCHEL E IRACHE, 1998). Nesse contexto, acredita-se que o aumento da biodisponibilidade de fármacos inseridos em nanopartículas é devido ao prolongamento do tempo de contato do medicamento com a mucosa intestinal (MAINCENT *et al.*, 1986).

A bioadesão é um processo pelo qual partículas ficam imobilizadas na superfície intestinal por um mecanismo de adesão. Esse mecanismo permite prolongar o tempo de residência do fármaco no sítio de ação, aumentar o gradiente de concentração do ativo e

melhorar a absorção, uma vez que o contato direto do fármaco com as células do intestino é o primeiro passo na etapa de absorção (PONCHEL E IRACHE, 1998). O muco do intestino é composto por glicoproteínas de alta massa molar que permitem a adesão por interações não específicas das nanopartículas poliméricas através de ligações de hidrogênio ou pelas forças de Van der Waals (PONCHEL E IRACHE, 1998). A adesão é otimizada quando o polímero está seco, mas a administração via oral faz com que as partículas se misturem aos líquidos endógenos. Em alguns casos a hidratação prematura pode diminuir drasticamente a interação muco – fármaco. A bioadesão pode também ocorrer por interações específicas entre as células da parede intestinal e os carreadores, através de receptores. Nesse caso, pode-se utilizar grupamentos ligados nas paredes poliméricas que permitam uma interação específica com os receptores alvo. Um exemplo clássico é a inclusão de lecitinas, que permite uma interação específica com as células *M*. Contudo, esses mecanismos são mais difíceis de acontecer, devido à limitada difusão das partículas pelo muco (PONCHEL E IRACHE, 1998).

Estudos de absorção são realizados para tentar avaliar a cinética de interação entre nanopartículas e a mucosa intestinal. DURRER E IRACHE (1994) demonstraram a cinética de absorção entre partículas de diferentes tamanhos de poli(estireno) na mucosa intestinal de rato. Eles observaram que após 10 minutos de experimento, o equilíbrio era atingido para as partículas de 230 nm, enquanto que as de 670 nm só atingiam o mesmo estado após 30 minutos.

Os mecanismos de interação são afetados pelas características físico-químicas das nanopartículas. No caso em que ocorre captação intracelular, é importante conhecer o mecanismo de captação que pode ser via pinocitose, endocitose não específica, endocitose mediada por receptores (como opsinas e lecitinas), e fagocitose. Esses mecanismos ainda não estão todos bem elucidados. Para conhecê-los, é importante conhecer bem o material de trabalho, principalmente as características de superfície e os tamanhos de partícula, dentre outros (LANDFESTER *et al.*, 2010). Entretanto, o aumento da longevidade e estabilidade dos nanocarreadores na mucosa intestinal, e posteriormente na circulação sanguínea, podem ser realizados por intermédio de modificações nas propriedades de superfície (tamanho, superfície e carga das partículas), além de processos formulativos (meio de dispersão onde as nanopartículas são inseridas para administração) (TORCHILIN E TRUBETSKOY, 1995; HUSSAIN *et al.*, 2001; UCHEGBU E SCHATZLEIN, 2006a). Polímeros anfipáticos como

poli(etilenoglicol) (PEG), poli(vinilpirrolidona) e poli(acrilamida), podem ser empregados para prolongamento do tempo das nanopartículas na circulação e alteração da biodistribuição, por serem facilmente adsorvidos na superfície do carreador, devido a interações hidrofóbicas, e por apresentarem uma porção hidrofílica que, exposta ao ambiente externo, protege estericamente a nanopartícula das proteínas plasmáticas existentes na circulação sanguínea (TORCHILIN E TRUBETSKOY, 1995; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

As nanopartículas também são comuns em aplicações intravenosas, em que são facilmente adsorvidas por proteínas sanguíneas, as opsoninas. As ligações das nanopartículas às opsoninas fazem uma ponte entre as partículas e os macrófagos. O uso do PEG nesses sistemas favorece o aumento da concentração das nanopartículas na circulação por uma proteção estérica, impedindo o depósito das opsoninas na superfície das nanopartículas (SOPPIMATH *et al.*, 2001; VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2008). Outras substâncias, como poloxamine, poloxamer (co-polímero óxido de etileno e propileno) e polissorbato, também aumentam o tempo das partículas na circulação. As primeiras reduzem a captação pelo fígado e o polissorbato permite uma maior penetração em órgãos alvo conforme demonstrado por ILLUM E DAVIS (1984) e ARAÚJO *et al.* (1999) em partículas de poli(metacrilato de metila) (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

A carga na superfície das partículas é outro fator importante. Como já mencionado, nanopartículas com cargas positivas apresentam uma baixa biodisponibilidade oral, em função da repulsão eletrostática. A difusão das nanopartículas pelo muco depende inicialmente de uma interação com os enterócitos, células da parede intestinal, que depende das características de superfície das partículas (HUSSAIN *et al.*, 2001). O tamanho de partícula associado às propriedades de superfície, também interfere no processo de difusão. Partículas com diâmetro de 14 nm permeiam o muco intestinal e entram em contato com os enterócitos em apenas 2 minutos. As mesmas partículas, com 415 nm de diâmetro, demoram cerca de 30 minutos, enquanto as partículas com 1000 nm de diâmetros não são capazes de se difundirem pelo muco (HUSSAIN *et al.*, 2001). A hidrofiliidade também é um parâmetro que deve ser avaliado. De uma forma geral, quanto mais hidrofóbico é o polímero, maior é a permeabilidade pelo muco e menor é a translocação para o interior da célula, onde o ambiente é mais hidrofílico (NORRIS E SINKO, 1997). Por outro

lado, quanto mais hidrofílico for o polímero, mais rapidamente ele será eliminado. Polímeros hidrofóbicos com carga positiva ou neutra apresentam uma maior interação com os enterócitos, conseqüentemente, maior absorção intestinal. Polímeros com carga negativa possuem baixa afinidade pelos tecidos intestinais. Entretanto, quando se combina a hidrofilicidade com a carga negativa, a propriedade de bioadesão aumenta. Assim, a combinação de ambos os fatores afeta a captação gastrointestinal de forma positiva (REIS *et al.*, 2006). Por isso, é sempre fundamental avaliar o alvo do fármaco encapsulado.

As nanopartículas também podem ter o processo de absorção intensificado, a depender do veículo em que elas são administradas. LI *et al.* (2007) suspenderam nanopartículas de fluoresceína isotiocianato com insulina em uma solução de hidroxipropil-metilcelulose (HPMC), um polímero que atua como modificador de viscosidade. O estudo demonstrou que o aumento da viscosidade permitiu uma maior aderência no TGI em relação às amostras sem HPMC. É importante ressaltar que a insulina é rapidamente depurada do organismo.

O veículo em que as nanopartículas estão dispersas também influencia as propriedades de superfície, alterando a absorção das mesmas. O trabalho de ARAÚJO *et al.* (1999) é apresentado mais detalhadamente por tratar de um sistema semelhante ao deste projeto. Os autores apresentaram o mecanismo de captação e distribuição de nanopartículas de PMMA no TGI. As partículas de PMMA foram marcadas com carbono 14 e apresentavam tamanho em torno de 130 nm. As partículas foram suspensas em dois meios aquosos com tensoativos (poloxamine 908 e polissorbato 80), na concentração de 5% e em dois meios oleosos, um com ácido oléico e outro com óleo de amendoim. Também foi preparada uma solução aquosa salina para ser utilizada como controle. Os tensoativos selecionados foram baseados no estudo de TRÖSTER *et al.* (1990), que demonstrou após administração intravenosa de nanopartículas de PMMA que o poloxamine 908 foi mais efetivo no aumento do tempo de circulação, reduzindo a captação pelo fígado. O polissorbato 80 foi o tensoativo mais eficiente no transporte até órgãos alvo que não possuem retículo endotelial (ou seja, sistema fagocitário). Os tensoativos aumentam a hidrofilicidade do PMMA, enquanto os óleos mantêm a superfície mais hidrofílica. As suspensões foram introduzidas nos ratos através de um tubo plástico até o estômago, pelo processo conhecido como gavagem. Os resultados encontrados demonstraram níveis das nanopartículas radioativas no

estômago, na parede estomacal, na primeira porção do intestino, no colón, na parede intestinal, na circulação sanguínea, no fígado e em alguns tecidos e órgãos residuais. A suspensão com polissorbato 80 apresentou em todos os órgãos estudados uma maior concentração da dose durante o tempo do ensaio. As formulações oleosas apresentaram uma concentração mais elevada das nanopartículas no fígado, baço e medula óssea. A adição de polissorbato 80 aumentou significativamente a captação das nanopartículas, quando comparada com a formulação controle, enquanto o óleo de amendoim não apresentou a mesma função. Dessa forma, é possível que os tensoativos induzam uma interação específica com as células do TGI. Para concluir, o estudo demonstrou que as propriedades de superfície alteram a captação das nanopartículas pelo organismo. Nesse estudo o resultado surpreendeu os pesquisadores, pois quanto mais hidrofílica foi a superfície, maior foi a permeação no TGI em relação às superfícies hidrofóbicas. Acredita-se que as propriedades de superfície influenciaram a questão da bioadesão nas paredes do TGI, alterando o tempo de trânsito gástrico das partículas pequenas. Nesse estudo foi observada também uma eliminação elevada do material particulado após 48 horas pela bile e urina.

2.5.1.2. Metodologias para avaliação da absorção / permeação

As metodologias empregadas para avaliação da absorção de nanopartículas no TGI foram demonstradas por DELIE (1998) num trabalho de revisão. A microscopia de luz, fluorescência e confocal, podem ser aplicadas para localizar e quantificar partículas no organismo (KRIWET E KISSEL, 1996; DELIE, 1998). A microscopia eletrônica, é uma boa ferramenta para localizar partículas na célula, mas sem quantificação, em virtude do pequeno campo de observação; a microscopia eletrônica de varredura permite inclusive diferenciar células M dos enterócitos, enquanto a microscopia eletrônica de transmissão gera informações preciosas a respeito da localização intracitoplasmática (DELIE, 1998). Os cortes histológicos permitem avaliar diretamente a presença e localização das nanopartículas no tecido; entretanto, não podem ser utilizados na quantificação, sendo um ensaio somente semi-quantitativo. Neste tipo de análise, partículas com diâmetro inferior a 0,5 µm podem estar agregadas, gerando falsos resultados. A contagem de partículas em uma fase líquida (que pode ser também sangue ou linfa) pode ser realizada com o uso do equipamento hemacitômetro, sendo

uma das análises de maior precisão para partículas maiores que 0,5 μm (DELIE, 1998). A incorporação de partículas fluorescentes a superfície das nanopartículas para qualificação e quantificação também é uma técnica bem difundida. As partículas são posteriormente analisadas por fluorimetria. Outras técnicas, como cromatografia de permeação em gel e radioisótopos, também podem ser utilizadas para avaliação do processo de absorção oral das nanopartículas (DELIE, 1998).

Modelos de avaliação da absorção no TGI *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* também são aplicados. Os modelos *in-vivo* fornecem diversas informações sobre a captação e distribuição de nanopartículas; entretanto, nesse modelo fatores como variabilidade entre animais, espécies, idade e condições patológicas acabam levando em alguns casos à divergência dos resultados. Um exemplo é a absorção de partículas, que em geral é maior em ratos do que em hamister (DELIE, 1998). Modelos *in vitro* e *ex vivo* são preferidos, pois possibilitam o uso de ferramentas farmacológicas que fornecem informações relacionadas ao mecanismo de captação. Os experimentos *in vitro* são realizados em culturas de células e permitem, com um curto período de incubação, obter informações sobre as interações célula - partícula polimérica. Nesse tipo de estudo, as células geralmente utilizadas são as do tipo Caco-2, derivadas do cólon humano (KRIWET E KISSEL, 1996; NORRIS E SINKO, 1997; DELIE, 1998). Já os ensaios *ex vivo* utilizam tecido intestinal fresco de mamíferos e apresentam a vantagem de permitir avaliar a permeabilidade das nanopartículas em diversas porções do intestino (JEZYK *et al.*, 1992; DELIE, 1998; AHLIN *et al.*, 2002).

2.5.1.3. Metodologias para avaliação da atividade do fármaco encapsulado nas nanopartículas

Sempre que um fármaco é encapsulado, é necessário verificar se o mesmo continua tendo efeito; ou seja, consegue se libertar da matriz e exercer a sua função terapêutica. Os ensaios para avaliação da atividade podem ser realizados por estudos *in vitro* e *in vivo*. A combinação de ambos os estudos é o ideal, principalmente quando se pensa em segurança e eficácia. Os ensaios *in vitro* podem ser feitos pelos estudos de dissolução ou liberação, onde se mimetizam as condições fisiológicas (TOMAR *et al.*, 2011). Nesse ensaio apenas é verificado se o fármaco consegue ser liberado da matriz

que o contém, não demonstrando assim a eficácia. Está só é comprovada em estudos *in vivo*.

Os estudos *in vivo* de materiais nanoparticulados devem ser realizados primeiramente em animais por questões de segurança. Obviamente que estes ensaios devem ter autorização prévia do Comitê de Ética. Como o objetivo desses estudos é verificar eficácia, é importante trabalhar com animais "infectados" pela doença a ser tratada. TOMAR *et al* (2011) testou insulina em micro e nanopartículas poliméricas em coelhos diabéticos objetivando verificar a ação do fármaco a partir desses sistemas, os resultados foram positivos.

2.5.2. MÉTODOS DE PREPARO DE NANOPARTÍCULAS

O preparo de nanopartículas poliméricas pode ser feito por diversos modos; entretanto, há alguns fatores que devem ser observados, como a toxicidade dos solventes empregados, a facilidade de aumento de escala e a eficiência do encapsulamento do material desejado (REIS *et al.*, 2006). O processo de preparo de nanopartículas mais usual na área farmacêutica é a técnica de evaporação de solvente (SILVA *et al.*, 2003; RAO E GECKELER, 2011). Nesta tese, a polimerização de monômeros, "*in situ*", por miniemulsão foi a técnica escolhida. A polimerização de monômeros permite "desenhar" o material que se quer obter, uma vez que se está realizando a síntese do polímero ao mesmo tempo que se faz o encapsulamento. A técnica de polimerização *in situ* pode ser realizada por algumas rotas distintas, sendo a polimerização em emulsão, miniemulsão e microemulsão as principais (RAO E GECKELER, 2011). A escolha do método de preparo depende da natureza do polímero e do fármaco, além da via de administração. Lembrando que o produto final deve apresentar as seguintes características (JAIN *et al.*, 1998):

- Manutenção da estabilidade e atividade do fármaco, uma vez que o mesmo deve estar íntegro para exercer a sua função farmacológica;
- Alta eficiência de encapsulação, pois quanto maior for a concentração de fármaco encapsulado, melhor, uma vez que será menor a quantidade de nanopartículas a ser utilizada nas formas farmacêuticas;

- Baixa polidispersão de tamanho, para que sejam obtidas doses medicamentosas uniformes;

- Perfil de liberação do fármaco reprodutível, para que as nanopartículas apresentem sempre cinética de dissolução semelhante, e para que as doses do medicamento em questão tenham reprodutibilidade;

- As micro/nanopartículas devem apresentar bom fluxo e não apresentar agregação ou aderência, uma vez que esses fatores prejudicam a manipulação do material, causando a perda de produto e a dificuldades de ajuste de dose.

2.5.2.1. Evaporação de solvente

A técnica de evaporação de solvente foi desenvolvida nos anos 70 para a preparação de microesferas de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis. O processo baseia-se na emulsificação inicial de uma mistura que contém um solvente volátil, o fármaco, tensoativo e o polímero em uma fase externa, que pode ser água ou um óleo no qual o polímero é insolúvel. A emulsão é então submetida a agitação constante, seguida pela evaporação do solvente (por vácuo geralmente), levando à precipitação do polímero e do fármaco. As nanopartículas formadas podem ser lavadas para a retirada dos aditivos, como os tensoativos, filtradas e secas sob condições apropriadas (JAIN *et al.*, 1998; VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2008; RAO E GECKELER, 2011).

As principais vantagens desta técnica são (KIM *et al.*, 2002; VARDE E PACK, 2004; FREITAS *et al.*, 2005; VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2008):

Método simples, não havendo a necessidade de uso de equipamentos especializados;

Pode-se obter uma emulsão polimérica estável, sem comprometer a atividade do fármaco;

Não precisam ser empregadas altas temperaturas;

É possível controlar o tamanho de partículas (nanômetros a micrômetros), intermédio da combinação de estabilizantes e agitação apropriada da mistura;

Observam-se altas taxas de recuperação de partículas, quando comparadas a outras técnicas;

Existe a possibilidade de incorporar tanto fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos.

A desvantagem principal da técnica de evaporação de solvente é a possibilidade de coalescência das nanogotículas durante o processo de evaporação do solvente, afetando o tamanho da partícula e a morfologia do material (RAO E GECKELER, 2011). Para ativos lipofílicos, como o PZQ, são preconizadas as emulsões óleo em água (O/A), utilizando solventes orgânicos insolúveis em água (O'DONNELL E MCGINITY, 1997). A adaptação de metodologias de emulsão múltiplas (como O/A/O) também vem sendo utilizada (HERRMANN *et al.*, 1998; HOMBREIRO-PÉREZ *et al.*, 2003). O polímero é solubilizado inicialmente em solvente orgânico e emulsificado com água, na presença de tensoativos. O solvente posteriormente é evaporado sob agitação mecânica e pressão reduzida (O'DONNELL E MCGINITY, 1997; RAO E GECKELER, 2011). Deve-se também atentar que a produção de nanocápsulas por essa técnica é muito difícil, já que seria necessária a formação de uma emulsão trifásica e a evaporação preferencial do solvente da casca polimérica. Finalmente, deve-se observar que é necessário usar um solvente adicional no sistema, além do polímero e do fármaco, o que impõe custos e riscos adicionais. Essa técnica é adequada em uma escala laboratorial, pois o aumento de escala requer métodos que utilizem baixa energia de emulsificação (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

2.5.2.2. Polimerização em emulsão (“in situ”)

A polimerização em emulsão é um dos métodos mais comuns para a síntese de diversos polímeros. O uso de água como meio de dispersão torna essa técnica ambientalmente favorável, sendo indicada para a manufatura de polímeros empregados na indústria farmacêutica e alimentícia, uma vez que não há preocupação com a retirada do solvente orgânico (RAO E GECKELER, 2011)

A produção de nanopartículas por polimerização *in situ* ocorre quando se adiciona monômero na emulsão, ao invés de uma solução de polímero. Pelo processo de polimerização, obtém-se então as nanopartículas. A polimerização em emulsão ocorre em um meio heterogêneo, em que a reação ocorre nas partículas poliméricas (20 a 1000

nm de diâmetro) dispersas na fase aquosa (ARAÚJO, 1999; NGWULUKA, 2010). A polimerização em emulsão clássica é um processo de ampla aplicação industrial, ocorrendo na maioria das vezes em meio composto por água como agente de dispersão, monômero, emulsificante e iniciador (ASUA, 2002; ESTEVES *et al.*, 2004; RAO E GECKELER, 2011). A água, como meio dispersante, apresenta as vantagens de não ser tóxica, possuir condutividade térmica elevada, reduzir a viscosidade do meio e permitir a solubilização de sais, além das motivações de ordem econômica.

O monômero é uma substância orgânica que, no caso das polimerizações em emulsão, apresenta uma solubilidade limitada na fase aquosa. Desta forma, quando se mistura água e monômero, o sistema forma 2 fases. Quando o sistema é agitado na presença de estabilizantes, a fase orgânica se encontra na forma de gotas dispersas na fase aquosa contínua.

O emulsificante, também chamado de surfactante ou agente tensoativo, é utilizado para promover estabilidade das gotas de monômero e também das partículas de polímero (LENZI *et al.*, 2003). O emulsificante é usualmente composto por uma longa cadeia de hidrocarbonetos de natureza hidrofóbica com uma extremidade hidrofílica, de natureza iônica ou não iônica (ASUA, 2002). Quando são adicionadas pequenas quantidades de emulsificante na água, este se encontra disperso na fase aquosa e na superfície das gotas de monômero (e/ou partículas de polímero), estabilizando-as. A partir de uma determinada concentração de emulsificante (CMC, concentração micelar crítica), que depende do tipo de emulsificante e da composição e temperatura da fase aquosa, são formados agregados de emulsificante chamados de micelas. Nas micelas os grupos hidrofílicos se orientam em direção à fase aquosa, enquanto os grupos hidrofóbicos se dirigem para o interior (PIIRMA, 1982; ASUA, 2002). Quando o sistema se encontra acima da CMC, a solubilidade aparente do monômero aumenta, já que este é parcialmente absorvido pela região hidrofóbica das micelas; ou seja, ocorre a formação de agregados coloidais compostos por moléculas de emulsificante e inchados com monômero solubilizado (ARAÚJO, 1999).

Os surfactantes utilizados para a polimerização em emulsão devem reunir os seguintes requisitos: ser mais solúvel na fase aquosa; estar prontamente disponível para adsorção na superfície das gotas; adsorver fortemente e não ser facilmente deslocado quando duas gotas colidem; reduzir a tensão interfacial para valores inferiores a 5×10^{-3} N/m; gerar um potencial eletro-cinético suficiente para que as gotas em emulsão não

coalesçam e permaneçam afastadas uma das outras; ser utilizado em pequenas concentrações; ser relativamente barato, não-tóxico e seguro para manusear (EL-AASSER E MILLER, 1997; ASUA, 2002). Vê-se que a lista de atributos não é pequena.

Os iniciadores utilizados nestas reações são quase sempre solúveis na fase aquosa (LENZI *et al.*, 2003). Inicialmente o sistema é composto por gotas de monômeros estabilizadas pelo tensoativo e pela fase aquosa. A partir do instante em que o iniciador é inserido, a polimerização é iniciada e uma nova fase é formada, com a nucleação das partículas de polímero (CORTINA, 2007). Com a decomposição do iniciador e a geração de radicais livres, cuja velocidade depende da natureza química do iniciador, do pH do meio e da temperatura do sistema, estes radicais são responsáveis por iniciar a polimerização. As partículas poliméricas são formadas com a captura de radicais pelas micelas inchadas em monômero ou pela precipitação das cadeias em crescimento na fase aquosa (LENZI *et al.*, 2004). Esse mecanismo dá origem às seguintes fases de polimerização:

Fase I – Nucleação

É a primeira fase de polimerização em emulsão clássica, em que as partículas de polímero são formadas pela entrada de radicais livres na micela (processo de nucleação heterogênea) ou pela precipitação dos oligômeros formados na fase aquosa (processo de nucleação homogênea). Na miniemulsão, a nucleação ocorre pela entrada de radicais nas gotas de monômero previamente emulsificadas. Na emulsão convencional as gotas de monômero (1-10 μm) são bem maiores que as micelas inchadas com monômero (10-20 nm). Em contrapartida, as micelas estão em maior quantidade que as gotas de monômero; dessa forma, as partículas são formadas preferencialmente por nucleação homogênea ou heterogênea (LANDFESTER *et al.*, 1999; ASUA, 2002; LENZI *et al.*, 2004; CHEN E SAJJADI, 2009). É nesta etapa que muitas propriedades importantes do sistema são estabelecidas, como a distribuição de tamanhos de partícula.

Na etapa de nucleação uma quantidade crescente de emulsificante é requerida para estabilizar as partículas em crescimento durante o processo clássico em emulsão, levando ao esgotamento das micelas. Nesse ponto ocorre o final da nucleação micelar e o início da fase de crescimento, em que se observa uma concentração constante de

monômeros nas partículas, devido à presença de gotas de monômero no sistema. No processo em miniemulsão, essa etapa não ocorre, uma vez que as partículas foram previamente formadas e não existem reservatórios de monômero livre no meio.

Fase II – Crescimento

A fase monomérica é então consumida até que as gotas de monômeros desapareçam na segunda etapa de reação.

Fase III – Concentrações decrescentes de monômero

Quando as gotas de monômero se exaurem, a reação continua até o consumo completo do monômero existente nas partículas poliméricas. Nesta etapa nota-se um aumento da viscosidade, que pode ocasionar uma redução de constante cinética de terminação e resultar no aumento da taxa de polimerização (ARAÚJO, 1999). Esse fenômeno é chamado de efeito gel e pode justificar o aumento descontrolado das taxas de reação (CHEN E SAJJADI, 2009).

As reações de polimerização em emulsão seguem o mecanismo clássico de radicais livres, como ilustrado de forma simplificada na Figura 4. Muitas outras etapas mecanísticas podem ser possíveis, como a transferência de cadeia para o polímero, que pode causar a formação de gel (material insolúvel) (LANDFESTER, 2006). Por envolver espécies de alta massa molar, a etapa de terminação é mais afetada pelo aumento de viscosidade do meio. No entanto, é importante salientar que a dimensão extremamente reduzida da partícula polimérica confere ao sistema uma natureza compartimentalizada; ou seja, os radicais eventualmente presentes nas partículas podem não se encontrar para promover a etapa de terminação. Por isso, a taxa de terminação é fortemente influenciada pela taxa de captura de radicais formados no meio aquoso. Uma vez capturado um segundo radical, a terminação ocorre de forma praticamente imediata (PIIRMA, 1982). Exceções importantes ocorrem quando a partícula é muito grande ou o efeito gel é muito intenso.

<p>Iniciação</p> $I^y \xrightarrow{k_d} 2R^{*y}$ $R^{*y} + M^y \longrightarrow P_1^{*y}$	<p>Transferência para Monômero</p> $P_j^{*y} + M^y \xrightarrow{k_{tm}} \Omega_j^y + P_1^{*y}$
<p>Propagação</p> $P_j^{*y} + M^y \xrightarrow{k_p} P_{j+1}^{*y}$	<p>Terminação por Combinação</p> $P_j^{*y} + P_k^{*y} \xrightarrow{k_{comb}} \Omega_{j+k}^y$

Figura 4 - Esquema cinético clássico das reações de polimerização via radicais livres (Fonte: LENZI *et al.*, 2004)

Na polimerização em emulsão clássica, as partículas poliméricas formadas não correspondem às gotas de emulsão primária, conforme discutido por LANDFESTER *et al.* (1999). É importante ressaltar que a concentração de agente emulsificante é o fator preponderante para determinação da taxa de reação, já que é a concentração de tensoativo que determina quantas partículas são formadas. Outro ponto importante a ressaltar é que a massa molar é definida principalmente pela concentração de iniciador. Admitindo-se que a terminação é imediata, a cadeia polimérica cresce durante o período de tempo decorrido entre dois eventos de captura de radicais livres gerados no meio aquoso. Esse intervalo de tempo é inversamente proporcional a taxa de geração de radicais livres no meio aquoso.

A polimerização em emulsão apresenta várias vantagens: mais fácil controle da temperatura por causa da presença de água; altas taxas de polimerização; alto grau de polimerização e possibilidade de uso do produto final diretamente, dispensando etapa de separação (LENZI *et al.*, 2004). Uma desvantagem importante é a dificuldade da remoção de resíduos de emulsificantes e de monômero quando há a necessidade do emprego do polímero puro. Além disso, a maior complexidade dos mecanismos envolvidos resulta em uma maior dificuldade para modelagem, monitoramento e controle do processo (HIROTA *et al.*, 2004).

Desde o aparecimento da Teoria de Harkins (1945), foram realizados muitos estudos envolvendo reações de polimerização em emulsão. Porém, diversos aspectos deste tipo de reação seguem despertando o interesse da comunidade acadêmica, como, por exemplo, os mecanismos de nucleação (GILBERT, 1995), a partição dos componentes entre as diversas fases presentes no sistema e a otimização e elaboração de

estratégias de controle para este tipo de processo (CHIEN E PENLIDIS, 1990, GIUDICI, 2000; VIEIRA *et al.*, 2002).

2.5.3. POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO

O termo miniemulsão é empregado genericamente para descrever dispersões submicrométricas (na faixa de tamanho de 30-500 nm) do tipo óleo em água, que apresentam grande estabilidade por extensos períodos, sendo preparadas a partir de um sistema contendo óleo, água, surfactante e co-estabilizante (LANDFESTER *et al.*, 1999; ASUA, 2002; ZHANG *et al.*, 2008). A miniemulsão tem como característica permitir a obtenção de uma mistura estável, formada por gotículas de monômero, suspensas em um meio heterogêneo. Dessa forma, as gotas de monômero se comportam como o *locus* primário da polimerização e cada gota se comporta como um “nano reator”; ou seja, cada gota de monômero se transforma em uma partícula polimérica (ANTONIETTI E LANDFESTER, 2002; GUO E ZETTERIUND, 2011).

A técnica de polimerização em miniemulsão permite criar polímeros diferenciados, utilizando os mesmo materiais empregados na técnica de emulsão clássica, em função da sua versatilidade funcional e habilidade para incorporar substâncias orgânicas e inorgânicas (EL-JABY *et al.*, 2009). Essa é a principal vantagem da miniemulsão, quando comparada com a emulsão clássica: a formação de nanopartículas com a incorporação de materiais *"in situ"*, além de permitir o encapsulamento de maiores quantidades de ativo. A única exigência imposta pela técnica é a compatibilidade do material a ser encapsulado com o monômero, por isso essa técnica tem ganhado cada vez mais atenção (ZHANG *et al.*, 2008; FAUCHEU *et al.*, 2010; FONSECA *et al.*, 2010). Outras vantagens são as altas conversões e as altas massas molares obtidas. Além disso, pode-se obter alto teor de sólidos e baixa viscosidade (SAMAKANDE *et al.*, 2008).

A polimerização em miniemulsão difere da polimerização em emulsão clássica porque na primeira as nanopartículas são previamente formadas e estabilizadas, com auxílio de um hidrófobo, co-estabilizantes e agitação e/ou cisalhamento rigoroso. Na emulsão clássica, as partículas poliméricas são formadas por intermédio de nucleação de uma fase polimérica, por precipitação de cadeias poliméricas formadas na fase aquosa

ou por reação nas micelas formadas pelas moléculas do surfactante (ANTONIETTI E LANDFESTER, 2002; ROMIO *et al.*, 2009; FONSECA *et al.*, 2010; RAO E GECKELER, 2011). Nesse sistema utiliza-se também menores quantidades de tensoativos, quando comparada à emulsão clássica (RAO E GECKELER, 2011). O processo de polimerização em emulsão clássico não é adequado para a produção de nanocápsulas e/ou nanoesferas contendo fármacos porque, de forma geral, não é possível transferir o fármaco do meio para o interior das nanopartículas poliméricas nucleadas. Na verdade, quando se tenta encapsular materiais pela técnica de emulsão clássica, obtêm-se nanoestruturas formadas pelo material a ser encapsulado depositado sobre a superfície da partícula polimérica (FAUCHEU *et al.*, 2010). Outra questão é que a técnica de miniemulsão permite a obtenção de nanocápsulas em uma simples etapa de reação, baseado na diferença da tensão interfacial e no processo de separação de fases durante a polimerização, ao contrário do processo de emulsão clássico (ROMIO *et al.*, 2009). Para finalizar RAO e GECKELER (2011) apresentaram uma sucinta comparação entre ambas as técnicas demonstrando que a emulsão obtida no processo de polimerização em emulsão apresenta menor estabilidade no armazenamento e maior índice de polidispersão das distribuições de tamanho de partícula, às vezes apresentando partículas maiores que 10 μ m.

O processo de polimerização em miniemulsão é iniciado pela dispersão de uma fase dispersa (mistura monômero, óleo) em uma fase contínua (aquosa) na presença de emulsificantes e co-estabilizantes (geralmente hidrofóbicos), utilizando um dispositivo de dispersão adequado para alcançar um estado estacionário, em que se observa o equilíbrio da taxa de rompimento e coalescência (LANDFESTER, 2006; EL-JABY *et al.*, 2007; LOPEZ *et al.*, 2008; ROMIO *et al.*, 2009). Durante a etapa de polimerização, as gotículas são nucleadas e polimerizadas idealmente sem alteração das suas identidades. O tamanho das gotículas após a polimerização depende da quantidade e do tipo de tensoativo, além do tempo e intensidade de agitação, e do tipo de agitador (EL-JABY *et al.*, 2009).

A literatura descreve dois mecanismos que podem alterar o número e o tamanho das partículas após a dispersão: a degradação difusional (“Ostwald ripening”) e a coalescência entre as gotículas. Nesse contexto, a escolha do surfactante e do co-estabilizador são fundamentais. A principal função do tensoativo é estabilizar as gotas do monômero, evitando a coalescência, enquanto que a principal função do co-

estabilizador é retardar a degradação de *Ostwald*, criando uma pressão osmótica desfavorável ao processo de degradação em cada gota (LANDFESTER, 2002; ROMIO *et al.*, 2009).

Em uma emulsão óleo em água, a transferência de massa das gotas menores para as maiores, degradação de *Ostwald*, ocorre naturalmente e influencia a distribuição do tamanho de partícula. Quando as gotas pequenas não são estabilizadas contra a degradação difusional, elas vão desaparecendo e o tamanho médio das gotículas aumenta com o tempo. O processo de degradação é promovido pela diferença de potencial químico existente entre os componentes presentes nas gotas menores e nas gotas maiores. Por causa da natureza hidrofóbica dos componentes emulsionados, o aumento de potencial químico nas partículas pequenas por causa da alta área específica pode ser muito significativo, o que promove transferência de massa espontânea das partículas menores para as maiores através da fase aquosa. Esse efeito pode ser minimizado com a inserção de aditivos que reduzam a energia de interface, o potencial químico da fase dispersa ou que aumentem às resistências à transferência de massa entre o meio aquoso e as partículas. A escolha do co-estabilizante é muito importante por diversos fatores já citados, mas também pelo fato dele permanecer no polímero final. Co-estabilizantes usuais são o álcool cetílico e hexadecano (ASUA, 2002). Os co-estabilizadores, por serem insolúveis em água, não podem difundir na fase aquosa. Assim, ao remover monômero de uma gotícula, ocorre um aumento na concentração do co-estabilizante retardando ou impedindo a degradação de *Ostwald* e mantendo a estabilidade das pequenas gotículas formadas durante a polimerização.

O processo de coalescência acontece quando duas gotículas estão próximas o suficiente para que ocorra o contato entre as gotas, levando à formação de uma única gota maior. Os tensoativos empregados na miniemulsão devem apresentar as mesmas características daqueles usados na polimerização em emulsão. LANDFESTER (1999) observou que o tamanho das gotículas dependia da quantidade da fase dispersa. Quando esta diminuía, o tamanho das partículas também se reduzia, em virtude da diminuição da taxa de coalescência. LANDFESTER (2000) estudou os mecanismos de estabilidade de polimerização em miniemulsão utilizando lauril sulfato de sódio (LSS) como tensoativo e notou que a área recoberta por LSS aumentava com o aumento do tamanho de partícula. Assim, para atingir um estado estável após a polimerização em miniemulsão, é necessário mais surfactante por área interfacial.

Na polimerização em miniemulsão o látex formado é usualmente opaco e de coloração branca, sendo basicamente uma cópia de gotículas originais polimerizadas, se a reação for ideal. O tamanho de cada partícula formada é determinado pelo processo de rompimento e estabilidade de cada gotícula de monômero (LANDFESTER *et al.*, 1999). Nesse sistema, não existem micelas presentes e a tensão superficial se encontra acima da saturação da solução de tensoativo, se a concentração de surfactante for adequadamente controlada (LANDFESTER *et al.*, 2001). Como consequência, a cobertura superficial das gotículas da miniemulsão por moléculas de surfactantes não é completa (LANDFESTER *et al.*, 2000).

No trabalho aqui proposto, a técnica selecionada para produzir as nanopartículas foi a polimerização em miniemulsão, uma vez que esta permite que um componente insolúvel em água, como o praziquantel, seja colocado diretamente na gotículas da miniemulsão para que seja realizada a reação de polimerização. Na área farmacêutica essa técnica não é usual. Durante a revisão na literatura foi encontrado apenas um trabalho a respeito da incorporação de fármacos por polimerização em miniemulsão "*in situ*", que foi o de ZHANG *et al.* (2008), que encapsulou paclitaxel em nanocápsulas de poli(etileno glicol) - poli(n butil cianoacrilato). Entretanto, a parte de caracterização foi realizada basicamente para os polímeros, sem a presença do fármaco, não abordando a interação deste com a matriz. Além disso, algumas citações a respeito da possibilidade da aplicação desta técnica na produção de medicamentos nanoencapsulados foram encontradas, como o trabalho de NGWULUKA (2010), que apresenta alguns exemplos de polimerização *in situ* com fármacos; entretanto, por técnicas diferentes. Além disso, pouca informação foi apresentada sobre os processos.

Por fim, uma grande vantagem da técnica de polimerização em miniemulsão é que se trata de uma tecnologia baseada em água; ou seja, não faz uso de solventes orgânicos, podendo ser considerada uma tecnologia ambientalmente amigável (FONSECA *et al.*, 2010).

2.5.3.1. Técnicas de dispersão de miniemulsões

O processo de emulsificação inicia-se com uma pré mistura das duas fases: uma aquosa, que contém o surfactante, e uma orgânica, que contém o co-estabilizante

dissolvido no monômero. A ordem com que os componentes são misturados não interfere na taxa de polimerização, desde que se tenha uma eficiente homogeneização. Assim, conclui-se que o número de gotículas formadas não é afetado pela ordem da pré-mistura (MILLER *et al.*, 1994; ASUA, 2002). A emulsificação ocorre em duas etapas: a deformação e o rompimento das gotas, aumentando a área específica da emulsão, e a estabilização das gotas pelo tensoativo (ANTONIETTI E LANDFESTER, 2002).

Os equipamentos normalmente empregados para dispersão das miniemulsões são o ultra-turrax (rotor-stator), o ultra-som e homogeneizador de alta pressão (ANTONIETTI E LANDFESTER, 2002; LOPEZ *et al.*, 2008). LOPEZ *et al.* (2008) testaram os três equipamentos e demonstraram que o rotor-stator não foi capaz de reduzir as gotículas da fase dispersa ao tamanho requerido (aproximadamente 100 nm). Isso ocorre porque o ultra-turrax possui uma energia específica limitada, resultando em gotículas frequentemente na faixa de 1 µm (KOHLENER *et al.*, 2010). Entretanto, o ultra-som e o homogeneizador de alta pressão permitiram a preparação de um látex com partículas de pequeno tamanho, com uma miniemulsão com alto conteúdo de fase orgânica e com grande concentração de resina. A diferença entre as duas últimas técnicas é que o ultra-som permite o preparo de pequenos volumes, ao contrário do homogeneizador e do ultra-turrax.

O ultra-turrax é um equipamento de cisalhamento que induz forte cisalhamento por meio da rotação em alta velocidade de um rotor em relação a um estator físico. O tamanho das gotículas formadas depende da intensidade de cisalhamento gerada, que depende da geometria do equipamento e da velocidade de rotação. O ultra-turrax e equipamentos afins não são tão eficientes, uma vez que não permitem obter uma distribuição de tamanho de gotícula homogênea, sendo que as partículas apresentam uma ampla faixa de tamanhos (ASUA, 2002; LOPEZ *et al.*, 2008).

O ultra-som, também chamado sonicador, gera ondas de ultra-som que causam oscilações das moléculas de fluido nas proximidades do local de propagação das ondas. O sistema é mantido agitado, para garantir que todo o fluido passe na região de sonificação e para que ocorra a quebra de todas as gotas de monômero. Dessa forma, o tempo de sonificação é fundamental no processo de miniemulsão (ASUA, 2002). O principal problema dessa técnica de emulsificação é que ela é difícil de escalonar (EL-JABY *et al.*, 2009). Primeiramente, a técnica pode ser considerada cara, sendo que a eficiência depende fortemente da relação existente entre a área do sonicador e o volume

do meio. Por isso, a técnica é também difícil de implementar em um ambiente real de produção. Por essa razão, a técnica de sonicação parece mais adequada ao ambiente laboratorial, para estudos de viabilidade cinética do processo de polimerização.

O homogeneizador de alta pressão envolve a pressurização de dispersões por uma bomba com deslocamento positivo e o posterior fluxo através de uma abertura estreita a altas velocidades. O processo gera elevados gradientes de velocidade e de tensão de cisalhamento, que promovem a dispersão fina da mistura. A posição da válvula de abertura pode ser controlada por diferentes dispositivos de pressão. O líquido emulsionado pode recircular várias vezes através do homogeneizador. Quanto maior o número de ciclos, menor o tamanho das gotículas. Dessa forma, os tamanhos das partículas podem ser controlados ajustando a pressão e o número de ciclos no equipamento (QUAN *et al.*, 2011). O homogeneizador de alta pressão é o equipamento mais eficaz para emulsificação, enquanto o ultra-turrax é o menos eficiente.

Recentemente, EL-JABY *et al.* (2009) empregaram um misturador estático no processo de homogeneização. Até o presente momento, não havia sido realizado nenhum estudo com este equipamento na geração de miniemulsão. Esse estudo demonstrou que o misturador estático produz gotículas nanométricas (aproximadamente 110 nm) com um controle adequado de distribuição de tamanho, além de constituir uma alternativa econômica, prática e segura. A princípio, este equipamento ainda apresenta a vantagem de poder ser aplicado industrialmente com um consumo de energia aparentemente menor, quando comparada ao homogeneizador de alta pressão (EL-JABY *et al.*, 2009).

O homogeneizador de alta pressão é a técnica recomendada para aumento de escala (*scale-up*) do processo de miniemulsão (ASUA, 2002; MANEA *et al.*, 2007; LOPEZ *et al.*, 2008). Entretanto, há algumas divergências, conforme relatado por GUO E ZETTERLUND (2011), que alegam que o processo de homogeneização é um impeditivo ao escalonamento. No processo de homogeneização deve-se ter cuidado para não formar radicais livres, que podem ser gerados pelo aquecimento decorrente do processo de escoamento através da fenda (cavitação). Caso isso aconteça antes da etapa de polimerização no reator, o látex final e a distribuição de tamanho de partículas podem ser significativamente afetados.

2.5.3.2. Polimerização do monômero em miniemulsão

O processo de formação das partículas corresponde à primeira etapa do processo de polimerização em miniemulsão. A princípio, a nucleação pode ocorrer pelos mesmos três métodos já descritos anteriormente: nucleação heterogênea, nucleação homogênea ou nucleação na gota monomérica. Entretanto, ao contrário da emulsão convencional, na miniemulsão ideal espera-se que a nucleação do polímero ocorra na gota de monômero, em função da grande área específica disponível, local onde a maior parte do tensoativo deve estar adsorvida, restando pouco surfactante livre para formar micelas ou estabilizar a polimerização na fase aquosa. Dessa forma, o número de partículas não deve ser alterado durante a polimerização ideal (ANTONIETTI E LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002; EL-JABY et al., 2009).

No sistema de polimerização em miniemulsão o aparecimento de micelas é indesejável, uma vez que o objetivo é provocar a nucleação nas gotículas. O surgimento de micelas depende do número de gotas, da distribuição do tamanho das gotas e da concentração de tensoativo aplicada. A escolha do sistema de homogeneização é importante, pois quanto maior é a intensidade de agitação, menores são as gotículas formadas e maior é a quantidade de surfactante requerido para estabilizá-las, sobrando menos tensoativo livre para a formação das micelas (HANSEN E UGELSTAD, 1979).

A fase de esgotamento do monômero é a segunda etapa e ocorre de modo semelhante à discutida para o processo convencional de polimerização em emulsão. Quando se tem co-polimerização, uma vez que a partição dos monômeros entre as fases do sistema pode levar a variações na composição do copolímero e à produção de copolímeros diferentes na polimerização convencional e na miniemulsão (ASUA, 2002).

Iniciador

Os iniciadores utilizados no processo de polimerização em miniemulsão podem ser solúveis na fase aquosa ou orgânica (MORI E KAWAGUCHI, 2006). A reação de polimerização em que o iniciador é dissolvido na fase aquosa ocorre de maneira semelhante à do processo de polimerização em emulsão tradicional. A única diferença relevante reside no fato de que os radicais formados na fase aquosa entram nas gotas de monômero na miniemulsão e nas micelas e partículas de polímero na emulsão clássica.

Os iniciadores solúveis em água mais comuns são persulfato de potássio e persulfato de amônio. No caso do iniciador ser solúvel na fase orgânica, ele é dissolvido antes da preparação da miniemulsão e a reação é iniciada dentro das gotas submicrométricas. Esse processo é comparável ao da polimerização em suspensão, em que o iniciador é alimentado nas gotas monoméricas da suspensão. Na miniemulsão, em virtude das gotículas serem muito pequenas, pode ocorrer efeitos de compartimentalização que reduzem a eficiência do processo, já que dois radicais são gerados simultaneamente durante a decomposição do iniciador. Os iniciadores solúveis na fase orgânica mais usados são 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN), peróxido de laurila e peróxido de benzoíla.

O tipo de iniciador impacta diretamente o processo de polimerização em miniemulsão. Por isso, o iniciador deve ser bem escolhido, de acordo com as propriedades finais do polímero que se deseja obter (MORI E KAWAGUCHI, 2007).

Tensoativo

Os tensoativos têm a função de reduzir a tensão interfacial entre a fase orgânica e aquosa através de um rearranjo na superfície. O índice de HLB (Equilíbrio Hidrofóbico e Lipofílico) mede a proporção entre a parte hidrofílica e lipofílica de um surfactante. O valor HLB aumenta proporcionalmente ao aumento na polaridade do tensoativo; ou seja, a solubilidade do mesmo em meio aquoso. Esse parâmetro é bem empregado para seleção de surfactantes, com o objetivo de prever o grau de estabilidade que um determinado tensoativo pode proporcionar (HOLMBERG *et al.*, 2002). É importante ressaltar que alguns surfactantes podem apresentar o mesmo índice HLB, mas terem comportamentos diferentes em relação à estabilização de uma dispersão.

Existem três tipos básicos de tensoativos para estabilização de miniemulsões: os iônicos, que podem ser catiônicos ou aniônicos, e os não iônicos. O uso de estabilizantes catiônicos é o menos usual. O lauril sulfato de sódio é um tensoativo aniônico dos mais utilizados em formulações de miniemulsão, combinado com um co-estabilizante seletivo pra a fase orgânica (LANDFESTER *et al.*, 1999).

O tamanho médio de partícula é diretamente afetado pela concentração de tensoativo. Quanto menor é a quantidade de tensoativo, maior é o tamanho médio das partículas. Diferentes surfactantes em uma mesma concentração levam à formação de distribuições granulométricas variadas (LANDFESTER, 2001; ZYL *et al.*, 2004). A

quantidade de emulsificante empregada nas polimerizações em miniemulsão varia tipicamente entre 1 e 5% da massa dos monômeros.

Co-estabilizadores

Conforme já citado, o uso de co-estabilizadores visa retardar a degradação de *Ostwald* nas gotículas. Eles devem ser utilizados numa concentração adequada para exercer a sua função. Esses compostos exercem uma pressão osmótica dentro das gotículas, neutralizando a pressão de Laplace, uma vez que permanecem dentro de cada gotícula não se difundindo no meio. A eficácia do co-estabilizador aumenta com a baixa solubilidade em água, no caso de miniemulsão óleo em água (LANDFESTER *et al.*, 2010). Quanto maior é o comprimento da cadeia do co-estabilizador, maior é a estabilidade da miniemulsão, pois estes compostos reduzem a energia livre da mistura na fase orgânica (LANDFESTER, 2001). Os co-estabilizadores mais usuais são o hexadecano e o álcool cetílico; entretanto, diversas outras substâncias podem ser empregadas para esse fim, como polímeros insolúveis em água (ANTONIETTI E LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002). FONTENOT e SCHORK (1992) demonstraram que o uso de polímeros hidrofóbicos como co-estabilizantes é vantajoso, pois estabilizam as gotículas durante a polimerização e apresentam uma boa compatibilidade com o monômero. A quantidade usual de co-estabilizador varia em torno de 1 a 10% em relação à massa da fase orgânica.

2.5.4. CONTROLE DE DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA

As miniemulsões de monômeros formadas sem a presença do iniciador podem ser armazenadas por um determinado período de tempo, até serem polimerizadas. No processo de homogeneização, a distribuição do tamanho das gotículas resulta da interação entre alguns fenômenos, conforme discutido por ASUA (2002):

- Dependendo do equipamento empregado na homogeneização, pode ocorrer o rompimento das gotículas por turbulência, cavitação, forças de extensão e forças de colisão.

- A coalescência das gotículas depende do fluxo padrão do aparelho de homogeneização e também do tensoativo empregado para estabilização das gotas monoméricas.

- Devido à contribuição da energia de superfície, o potencial químico do monômero nas gotas pequenas é maior que nas gotas grandes. Dessa forma, a difusão do monômero ocorre das gotas pequenas para as grandes. O co-estabilizador minimiza esse processo, contribuindo para reduzir o tamanho de partícula durante o período de homogeneização. Quanto mais insolúvel for o co-estabilizador em água, mais eficaz ele será como agente de pressão osmótica. Para co-estabilizadores mais solúveis em água, como o álcool cetílico, observa-se que os tamanhos das gotas da miniemulsão não são muito sensíveis ao processo de homogeneização. Entretanto, quando é utilizado o hexadecano (mais hidrofóbico), o tamanho das gotas diminui bastante no sistema de homogeneização, a depender das condições de operação (MILLER *et al.*, 1994).

- Degradação das gotas por difusão de monômeros, que normalmente é o mecanismo principal para o aumento do tamanho das gotas de monômero.

Antes da etapa de polimerização, as miniemulsões estocadas por períodos prolongados podem apresentar problemas de estabilidade, uma vez que pode haver aumento descontrolado no tamanho das gotículas (ASUA, 2002). A coalescência das gotas é causada pela colisão das mesmas devido ao movimento Browniano e forças de Van der Waals. A extensão deste processo depende fortemente do sistema de surfactante utilizado. O movimento Browniano é ocasionado pela energia térmica existente no meio, em que a intensidade de movimento é diretamente proporcional à temperatura e inversamente proporcional ao tamanho de partícula. A agitação do sistema pode levar à formação de gradientes de velocidade que podem aumentar a força e a frequência das colisões (ARAÚJO, 1999).

2.5.5. SECAGEM DAS NANOPARTICULAS

A manutenção de nanopartículas para preparações farmacêuticas em emulsão apresenta algumas desvantagens, como o risco de contaminação microbiológica. Como a fase contínua é aquosa, pode ocorrer degradação polimérica por hidrólise, além da instabilidade físico-química, em virtude da agregação e sedimentação das partículas.

Assim, o armazenamento aconselhável é sob a forma de pó, para a obtenção de uma maior estabilidade do produto. Dois processos são amplamente difundidos para esse fim: a liofilização (*freeze drying*) e a secagem por aspersão (*spray drying*). Ambos os processos podem ser empregados em escala industrial (VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2008).

2.5.5.1. Liofilização

O princípio da liofilização consiste na remoção de água de uma amostra congelada por sublimação e dessorção sob vácuo. Esse processo é dividido em três etapas: primeiro ocorre o congelamento da amostra, depois faz-se a sublimação e, finalmente, faz-se a dessorção da água não congelada (VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2008).

O processo de liofilização aplicado a nanopartículas apresenta algumas vezes certos inconvenientes, como a perda da integridade do material (rompimento das partículas) e a agregação (que em muitos casos pode ser irreversível). Nesses casos, o uso de açúcares e outras substâncias, como a poli(vinilpirrolidona) (cryoprotectants), pode aumentar a resistência das nanopartículas, minimizando o estresse do processo de secagem e aumentando a estabilidade durante a estocagem (AHLIN *et al.*, 2002; ABDELWAHED *et al.*, 2006a; ABDELWAHED *et al.*, 2006b; REIS *et al.*, 2006; VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2008).

2.5.5.2. Secagem por aspersão

A técnica de secagem por aspersão (*spray-drying*) transforma líquidos em partículas secas através de um processo contínuo. Esse processo pode ser dividido em quatro etapas. A primeira etapa consiste na alimentação da emulsão/suspensão dentro do pulverizador, onde é feito o contato com o ar e a pulverização da corrente líquida na corrente gasosa que flui a alta velocidade. O contato com o ar quente promove a secagem do material. A separação do material seco do gás de secagem ocorre posteriormente em uma câmara de decantação (BROADHEAD *et al.*, 1992;

VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2008). A principal vantagem da técnica em relação à liofilização, é o baixo preço, além de ser um processo mais rápido e que permite modular algumas características físico-químicas do material final. Entretanto, há alguns relatos que indicam que o pó decantado, ao ser redispersado, apresenta agregados irreversíveis (VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2008).

2.6. COMENTÁRIOS FINAIS

Com base na revisão apresentada, pode-se concluir há uma necessidade real em buscar opções farmacêuticas para o tratamento da esquistossomose, principalmente para as crianças. A esquistossomose é uma doença negligenciada, conforme apresentado, não despertando assim, interesse de grandes multinacionais farmacêuticas. Dessa forma, a incumbência de se tentar desenvolver formulações alternativas, acaba indo as universidades e laboratórios públicos no Brasil. A nanotecnologia nesse sentido, vem como uma grande aliada na solução desses problemas; entretanto, há diversos cuidados que devem ser tomados, por se tratarem de partículas muito pequenas. A síntese das nanopartículas poliméricas podem ser feitas por diversas metodologias, onde a polimerização *in situ* se destaca, por permitir modular as características do material, além de já formar uma partícula encapsulada com o fármaco em uma única etapa.

CAPÍTULO 3

Objetivos

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desta tese é o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo praziquantel e que possam ser inseridas em formulações farmacêuticas, suspensão ou pó para suspensão com sabor agradável. Essas formas farmacêuticas são preconizadas para crianças, em virtude da facilidade de administração e ajuste de dose em função da massa corpórea.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os impactos de diferentes equipamentos (ultra-turrax e homogeneizador de alta pressão) no processo de obtenção de nanopartículas por polimerização em miniemulsão. Essa avaliação é feita com auxílio de análises físico-químicas que caracterizam as propriedades finais dos materiais obtidos. As propriedades são correlacionadas com o desempenho das nanopartículas em condições fisiológicas.
- Avaliar o desempenho de diferentes monômeros na manufatura de nanopartículas de praziquantel. Três monômeros são avaliados metacrilato de metila, acetato de vinila e ácido acrílico. No processo de manufatura são observadas possíveis interações entre o fármaco, o monômero e as condições de reação.
- Caracterização das nanopartículas obtidas. As propriedades finais das nanopartículas são extremamente importantes para caracterizar o desempenho do produto obtido. Uma questão importante é obter informações sobre o impacto que as condições de reação exercem sobre as características das nanopartículas.
- Realizar estudos *in vitro* e *in vivo* das nanoartículas obtidas, utilizando como referência a formulação usual de comprimidos de PZQ com 600 mg. Esses

estudos permitem avaliar a liberação do PZQ a partir da matriz bem como a atividade do fármaco a partir das nanopartículas *in vivo*.

3.3 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

O tratamento atual da esquistossomose consiste em aplicações orais de doses diárias de 40 a 60 mg/Kg. Atualmente, conforme já mencionado, só há no mercado a forma farmacêutica de comprimidos nas dosagens de 150, 500 e 600 mg. O público alvo da doença são crianças. Uma criança de 3 anos de idade com cerca de 20 Kg no estado mais grave da doença deve receber a administração de 1200 mg de praziquantel por dia. A maior dosagem de PZQ em comprimidos são 600 mg. Dessa forma, para o comprimido conter a dose necessária, ele tem que ter aproximadamente 1 g de peso, pois ainda há os excipientes. Crianças em geral não conseguem engolir 2 comprimidos de 600 mg em seqüência. Uma questão importante diz respeito à dificuldade de administrar vários comprimidos de uma única vez, já que a deglutição de uma unidade farmacêutica já é por si só bastante complicada, por causa do tamanho e do gosto ruim do medicamento. Em virtude da ausência de medicamentos para o tratamento da esquistossomose de uso pediátrico, o Ministério da Saúde (MS) solicita há bastante tempo o desenvolvimento do medicamento Praziquantel suspensão 120 mg/mL.

Conforme já relatado, diversos trabalhos têm procurado melhorar a taxa de liberação e/ou absorção do PZQ. Na grande maioria das vezes as técnicas empregadas são limitantes, pois não possibilitam um aumento de escala para a produção industrial. Nenhum dos trabalhos reportados de fato apresenta um medicamento, mas apenas propostas de formulações parenterais e injetáveis basicamente. Essas formas farmacêuticas aumentam muito o custo do medicamento, além de exigirem que pessoas qualificadas apliquem o produto.

A técnica de polimerização em miniemulsão proposta nesse trabalho é extremamente promissora e apresenta diversas vantagens em relação às demais:

- Permite a obtenção de nanopartículas do fármaco em uma única etapa;
- Permite o controle da distribuição do tamanho de partícula;
- É uma técnica de baixo custo;
- Apresenta facilidade de aumento de escala.

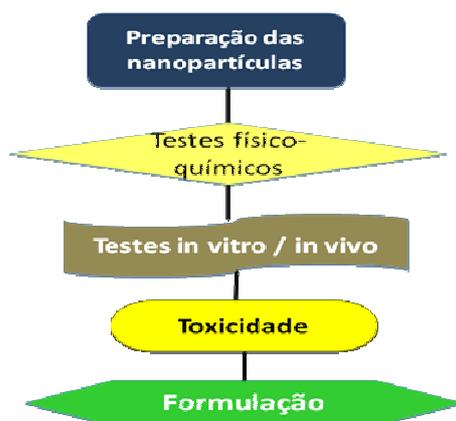
A grande relevância do projeto diz respeito à obtenção de nanopartículas poliméricas de PZQ pela técnica de miniemulsão, que simultaneamente mantenham a integridade do fármaco e promovam o mascaramento de sabor em um veículo aquoso, que será o meio da suspensão por pelo menos 2 anos, prazo de validade sugerido na legislação brasileira (BRASIL, 2005).

O trabalho proposto também apresenta originalidade, uma vez que não há relatos na literatura de polimerização em miniemulsão *in situ* com fármacos, visando à produção de medicamentos. Particularmente, nada há disponível a respeito da preparação de miniemulsões de praziquantel.

CAPÍTULO 4

Metodologia da Pesquisa

Esse capítulo aborda os materiais utilizados e as técnicas de caracterização empregadas no trabalho, com a descrição e o objetivo de cada uma delas, abaixo o fluxograma da metodologia.



4.1. MATÉRIA-PRIMA E SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)

- Praziquantel substância química de referência (SQR), fabricante USP lote G (teor 100%). Essa SQR foi empregada como padrão; ou seja, como referência para as análises descritas a seguir que exigiram a identificação e quantificação do PZQ nas nanopartículas.
- Praziquantel matéria-prima, lote: 48396, fabricante: Yixing City Xing Yu Medicine Chem., validade: 10/2012, fornecida por Farmanguinhos. Esse fármaco foi empregado na preparação das nanopartículas.

O PZQ foi utilizado conforme recebido, sem qualquer purificação adicional.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. ANÁLISE DA MATÉRIA-PRIMA PRAZIQUANTEL

A análise do praziquantel (PZQ) foi realizada com o objetivo de aprovar a matéria-prima para o preparo das nanopartículas. Os testes realizados para assegurar a qualidade da matéria-prima foram: identificação por espectrofotometria no infravermelho, rotação específica, tamanho de partícula, dissolução por dispersão, doseamento e substâncias relacionadas. Todos foram realizados de acordo com a Farmacopéia Americana (USP 31, 2008a).

4.2.1.1. Identificação por espectrofotometria no infravermelho (IR)

A amostra foi dispersa em brometo de potássio (KBr), na proporção de 1% (p/p) e levada ao espectrofotômetro de infravermelho (Shimadzu, modelo IR Prestige-21) onde foi realizada varredura entre 400 e 3800 cm^{-1} utilizando a célula de reflectância difusa. O espectro obtido da amostra foi comparado com o da SQR de PZQ preparada nas mesmas condições. O espectro de absorção no IR da amostra deve apresentar máximos de absorção nos mesmos comprimentos de onda daqueles obtidos no espectro de praziquantel padrão (USP 31, 2008a).

4.2.1.2. Rotação específica

Conforme já descrito, o PZQ é normalmente encontrado como uma mistura racêmica. Dessa forma, a matéria-prima empregada nesse trabalho também foi avaliada. O teste de rotação específica foi realizado em polarímetro digital automático Acatec Modelo PDA 9300. As amostras foram preparadas a uma concentração de 1% nos solventes etanol e clorofórmio conforme o trabalho de Roszkowski *et al.* (2006). O equipamento foi zerado com o solvente e em seguida eram lidas as amostras.

4.2.1.3. Distribuição de tamanhos de partícula

A avaliação do tamanho de partícula foi realizada por difração de laser. Esse método parte do princípio de que o ângulo de difração do laser é inversamente proporcional ao tamanho da partícula em que o feixe de luz incide. Sendo assim, o tamanho de partícula é calculado com base na intensidade de luz medida pelo detector, em função do ângulo de difração. O equipamento permite a recirculação da amostra em frente ao feixe do laser e a técnica possui a vantagem de ser rápida e ter boa reprodutibilidade (RAWLE, 2004). Nesse cálculo foi empregada a aproximação de Fraunhofer, que admite que todos os tamanhos de partícula espalham a luz com a mesma eficiência e que as partículas analisadas são opacas, não transmitindo a luz incidida (MARTIN, 1993; RAWLE, 2004; AZEMA, 2006).

O equipamento empregado foi o MasterSizer da Malvern Instruments. Este consiste em uma fonte de raio laser, um conjunto de detecção (formado por 81 foto-sensores e um tubo multiplicador) e um amostrador (célula de recirculação). A faixa de leitura do equipamento é de 0,02 μm a 2000 μm .

Preparo do meio de dispersão

O meio empregado para as amostras foi água, com adição de laurilsulfato de sódio (LSS) na concentração de 0,01% para estabilização. Ao volume de meio preparado, foi adicionada massa de PZQ até saturação do meio, evitando assim a solubilização de algumas partículas da matéria-prima. Após agitação em placa por 24 horas, o meio foi filtrado através de papel de filtro, sendo logo em seguida submetido a uma segunda filtração em membrana de 0,45 μm . Foram preparados 4 litros de meio de dispersão para análise da matéria-prima. A escolha do meio foi feita de acordo com a solubilidade do PZQ, por ser necessário um solvente no qual o fármaco fosse praticamente insolúvel. O uso do tensoativo teve como objetivo aumentar a molhabilidade das partículas.

Procedimento

Foram transferidos aproximadamente 100 a 130 mL do meio de dispersão para o amostrador de líquidos Hydros 2000S do equipamento. A primeira etapa consistia na

leitura do meio sem a amostra, com a finalidade de realizar a leitura de fundo (*background*) do equipamento. Foi adicionada a matéria-prima ao meio de dispersão até obter uma obscuração (perda de transmissão de luz) de aproximadamente 5% sob agitação contínua para dispersão das partículas. A suspensão assim preparada foi utilizada para as análises.

4.2.1.4. Dissolução da matéria-prima

A cinética de dissolução da matéria-prima de PZQ foi realizada em dissolutor de cubas Vankel modelo VK7010, empregando o aparato 2 (pá), com o meio ácido clorídrico 0,1M acrescido do tensoativo lauril sulfato de sódio (LSS) na concentração de 2% (p/v). O volume utilizado foi de 900 mL. A velocidade de agitação empregada foi de 50 rpm e a temperatura do meio de dissolução nas cubas foi de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A escolha das condições baseou-se na metodologia descrita na Farmacopéia Americana (USP 31, 2008b) para comprimidos de praziquantel.

Foi realizado o perfil de dissolução nos tempos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos. O meio de dissolução pronto foi pré-aquecido em placas de aquecimento até 38°C , uma vez que sempre há perda de calor na transferência para as cubas. Após a transferência do meio para as cubas, com auxílio de uma proveta de 1000 mL, o mesmo foi submetido ao ultra-som, por cerca de 15 minutos, com o intuito de fazer a desaeração (meios contendo tensoativos não são filtrados a vácuo, devido à quantidade excessiva de espuma formada) (FLISZAR *et al.*, 2005). O estudo foi iniciado após a estabilização da temperatura nas seis cubas. Foram pesados 600 mg de PZQ matéria-prima em 6 tubos de ensaio. Os tubos foram pesados antes e depois da adição da matéria-prima, sendo a diferença de peso utilizada para o cálculo da dose adicionada a cada cuba. As amostras de meio foram coletadas por cânulas de amostragem manual nos tempos estabelecidos. O volume coletado foi de 10 mL, não tendo havido reposição do meio. O processo de filtração foi realizado com filtros cilíndricos de polietileno de 10 μm acoplados às cânulas. Logo após a coleta, era conectado na seringa um filtro de membrana Millex[®] de 0,45 μm . Foi adotado esse sistema devido ao reduzido tamanho de partícula de algumas amostras.

A quantificação de PZQ nos meios empregados no ensaio de dissolução foi realizada por espectrofotometria de absorção no UV-Vis, tomando por base as condições descritas na Farmacopéia Americana (USP 31, 2008). Após a coleta das amostras, as mesmas foram lidas diretamente no espectrofotômetro (Varian, modelo Cary 50). Uma curva padrão foi feita para garantir a boa execução dos procedimentos. Em primeiro lugar, foi preparada solução estoque de PZQ, onde foram pesados, com precisão analítica, cerca de 17,0 mg de PZQ SQR com teor de 100,0% e transferidos para balão volumétrico de 25,0 mL. Foram adicionados 3 mL de metanol e o volume foi completado com o meio de dissolução, resultando em uma solução com concentração de 0,68 mg/mL. A partir desta solução, foram retiradas alíquotas de 3 mL e 5 mL para balões volumétricos de 10 mL contendo o meio de dissolução, a fim de caracterizar uma curva com 3 pontos com as seguintes concentrações: 0,204, 0,340 e 0,680 mg/ml.

4.2.1.5. Análise quantitativa (doseamento e substâncias relacionadas)

A realização desta análise foi baseada na metodologia proposta na Farmacopéia Americana (USP 31, 2008a), com a finalidade de determinar a pureza da matéria-prima. O teste foi realizado pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise foi realizada em cromatógrafo Merck modelo Elite Lachrom, com injetor automático, provido de detector ultravioleta com arranjo de diodos (PDA). As condições de análise foram:

- Coluna empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C₁₈) 4 mm x 25 cm, 10 µm da marca Teknokroma;
- Fase móvel acetonitrila : água (60:40);
- Detector PDA em 210 nm;
- Fluxo de 1,5 mL/min;
- Volume de injeção 10 µL;
- Temperatura ambiente.

As amostras foram preparadas pesando-se 50 mg de PZQ para balão volumétrico de 50 mL. Depois, retiraram-se 2 mL para balão de 10,0 mL. O diluente usado foi a

própria fase móvel. A solução padrão foi preparada pesando-se 25,0 mg de PZQ SQR para balão de 25,0 mL. Foram retirados 2 mL para balão volumétrico de 10 mL também na fase móvel.

4.2.2. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA DE PZQ NO PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS

A matéria-prima foi avaliada em relação a sua estabilidade nas condições das reações de polimerização *in situ*.

4.2.2.1. Degradação térmica e termogravimetria

A sensibilidade à degradabilidade térmica do PZQ foi o primeiro parâmetro avaliado. Primeiramente foi realizado um teste em estufa de circulação de ar (marca Quimis), onde foram pesados 1 g de PZQ em triplicata. As amostras foram levadas a estufa previamente aquecida a 85°C. Alíquotas foram retiradas depois de 3 e 6 horas e foram analisadas por CLAE, conforme a metodologia descrita na seção 4.2.1.4. Ao atingirem a temperatura ambiente, foram pesadas amostras com cerca de 50 mg (4 réplicas para cada “pesada” inicial).

O segundo ensaio realizado foi a termogravimetria. Essa análise foi realizada em equipamento TGA Mettler Toledo, modelo SDTA 851. As amostras foram submetidas a uma faixa de temperatura de 25 a 700°C com vazão de aquecimento de 10°C/min. Nesta análise foi utilizado Nitrogênio como gás de arraste na vazão de 50 mL/min.

4.2.2.2. Teste de Solubilidade do PZQ nos monômeros selecionados

O teste de solubilidade do PZQ nos monômeros previamente selecionados (metacrilato de metila, acetato de vinila e ácido acrílico) foi realizado para averiguar a quantidade de fármaco que poderia ser adicionado às reações de polimerização. As amostras foram preparadas nas temperaturas 25, 37, 55, 75 e 90°C, em triplicata. A

faixa de temperatura foi escolhida em função das temperaturas usuais de reação por polimerização por miniemulsão. Em erlenmayer com tampa de 50 mL foram adicionados 20 mL de monômero, volumetricamente. Em placa de aquecimento, deixou-se atingir e estabilizar a temperatura desejada. Em seguida, adicionou-se PZQ até não haver mais solubilização do mesmo, após 3 horas, alíquotas foram filtradas a quente. Retirou-se então uma alíquota de 10 µL, transferida para balão volumétrico de 10 mL, usando como diluente acetonitrila.

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida nas seguintes condições:

- Coluna empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C₁₈) 4 mm x 25 cm, 10 µm da marca Teknokroma;
- Fase móvel acetonitrila: água (50:50);
- Detector PDA em 210 nm;
- Fluxo de 1,0 mL/min;
- Volume de injeção 10 µL;
- Temperatura ambiente.

4.2.2.3. Teste de solubilidade do PZQ em soluções aquosas de lauril sulfato de sódio

O teste de solubilidade do PZQ em solução aquosa contendo LSS nas concentrações de 5,5 e 22 mg/mL foi realizado para averiguar a quantidade de fármaco que poderia ficar retido na fase aquosa e não ser incorporado no polímero. Esse estudo foi realizado na temperatura ambiente e a 90°C, por conta das temperaturas aplicadas no processo de polimerização. Os ensaios foram realizados em triplicata. Em erlenmayer com tampa de 50 mL foram adicionados 20 mL de água, volumetricamente. Em placa de aquecimento com agitação, fez-se um banho de óleo e deixou-se atingir a temperatura de $90 \pm 3^\circ\text{C}$. As análises realizadas a temperatura ambiente foram realizadas em placa de agitação apenas. Em seguida, adicionou-se PZQ até não haver mais solubilização do mesmo. Após 24 horas, alíquotas de 5 mL foram filtradas a quente e transferiu-se 1 mL para tubo de ensaio contendo 2 mL de metanol. O conteúdo

foi homogeneizado em vortex e levado ao cromatógrafo líquido conforme metodologia descrita na seção 4.2.2.2.

4.2.3. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO - PARTE I

Todas as reações em miniemulsão realizadas neste trabalho foram iniciadas por radicais livres. Essa primeira parte do trabalho teve como objetivo avaliar as condições de reação e verificar a eficiência das mesmas.

4.2.3.1. Composição do sistema reacional - Receita I

- Tensoativo: solução de lauril sulfato de sódio (5,0 g de LSS em 50,0 g de água destilada).

- Agente tamponante: solução de bicarbonato de sódio (0,3 g de NaHCO_3 em 31,0 g de água).

- Iniciador: solução de persulfato de potássio (0,3 e 0,6 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ em 31,0 g de água).

- Solvente: 115 g de água destilada.

- Monômero: 100, 70 e 50 g de monômero (metacrilato de metila, acetato de vinila e ácido acrílico).

- Óleo: 0, 30 e 50 g de óleo mineral (vaselina).

- Fármaco: 3 a 10 g de praziquantel.

A temperatura de reação variou de 60 a 90°C.

4.2.3.2. Preparo da miniemulsão - Receita I

O preparo da miniemulsão ocorre em três etapas. A primeira etapa consiste na solubilização do PZQ e da vaselina (esta última quando está presente na reação) no monômero e das soluções de lauril sulfato de sódio e de bicarbonato de sódio na água.

Esse sistema é agitado previamente em placa de agitação por 5 minutos para execução de uma pré-mistura.

A segunda etapa consiste no preparo da miniemulsão propriamente dita. Neste trabalho foram utilizados 2 equipamentos: o ultra-turrax T25 Basic da Ika Labortechnik e o homogeneizador de alta pressão APLAB-10 / 1.000 Bar da Artepeças. O ultra-turrax foi operado na velocidade de 9200 rpm por 15 minutos. Em função da volatilidade do monômero, a amostra submetida ao ultra-turrax foi colocada em um banho de gelo. No homogeneizador de alta pressão foi empregada uma pressão de 800 bar por 10 minutos a uma vazão de 10.000 m³/h (Figura 5).

A terceira e última etapa consiste na reação de polimerização, na qual o iniciador é adicionado. A miniemulsão era então adicionada a um reator encamisado de 1L de vidro, composto de uma tampa com seis orifícios, onde a entrada central é utilizada para a haste do agitador. As demais entradas são empregadas para adição da amostra e iniciador, inserção do termômetro, conexão do condensador e retirada de alíquotas durante o processo (Figura 6). Os orifícios que não são utilizados permanecem tampados durante a reação.



Figura 5 – Homogeneizador de alta pressão



Figura 6 – Foto do reator e dos acessórios empregados na polimerização.

No reator foi utilizado um agitador com impelidor tipo hélice, com diâmetro total de 4,5 cm. O controle da agitação foi realizado por meio de um agitador mecânico modelo RW20D2Mn, da marca IKA Labortechnik, alimentado por um motor de corrente contínua com comando digital e possibilidade de operar em uma faixa de rotação de 288 a 2400 rpm.

A manutenção da temperatura do meio reacional é feita pela circulação de água através da camisa do reator. A água é aquecida por um banho termostático modelo HAAKE C35P, da marca Thermo. Para evitar a perda do monômero do meio reacional por evaporação e arraste, um condensador resfriado a água é conectado a um dos orifícios do reator.

4.2.4. QUEBRA DAS EMULSÕES

Conforme descrito anteriormente, as emulsões finais não são a forma mais adequada para armazenar as nanopartículas, principalmente quando se objetiva uma preparação farmacêutica. Nesse trabalho, o produto final é uma emulsão. Dessa forma, a quebra das emulsões e a secagem das mesmas constituem etapas importantes para o isolamento das nanopartículas. Na separação das emulsões foram testados alguns

processos; o uso de não-solventes, no caso foi utilizado etanol, a centrifugação e a liofilização direta da emulsão. Diferentes processos foram testados porque nem todos foram eficazes para os diversos tipos de emulsões obtidas.

4.2.5. SECAGEM DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram secas por liofilização no liofilizador CHRIST modelo BETA 1-16 a uma temperatura de -50°C e um vácuo de 0,4 mbar.

A secagem por *spray drying* também foi testada em equipamento Buchi Mini Spary Dryer B-191, os parâmetros empregados foram:

- Temperatura de alimentação do ar de 120°C ;
- Temperatura da câmara de decantação de 86°C ;
- Velocidade de aspiração de ar de 73 a 100% da escala;
- Bombeamento do líquido na velocidade de 13% da escala;
- Pressão de aspiração de ar de 600 mbar.

4.2.6. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO - PARTE II

A parte II do trabalho foi caracterizada pela otimização das reações da parte I.

4.2.6.1. Composição do sistema reacional - Receita II

- Tensoativo: solução de lauril sulfato de sódio (5,0 e 2,5 g de LSS em 50,0 g de água destilada);

- Agente tamponante: solução de bicarbonato de sódio (0,3 g de NaHCO_3 em 31,0 g de água);

- Iniciador: solução de persulfato de potássio (0,6 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ em 31,0 g de água);

- Veículo: 115 g de água destilada;

- Monômero: 100 e 70 g de monômero metacrilato de metila;
- Eudragit® E100: 7 a 10 g;
- Agente reticulante Etileno Glicol Dimetacrilato (EGDMA): 5 g;
- Óleo: 0, 23 e 30 g de óleo mineral (vaselina);
- Fármaco: 12 a 17 g de praziquantel.

A temperatura de reação foi de 90°C.

4.2.6.2. Preparo da miniemulsão - Receita II

O preparo da miniemulsão ocorre em três partes, conforme descrito na seção 4.2.3.2. A única diferença é a inclusão do Eudragit®E100, que é dissolvido previamente no monômero, e/ou do EGDMA, que é disperso no monômero também. Nessa parte do trabalho foi utilizado apenas o homogeneizador de alta pressão com pressões de 400, 600 e 800 bar.

4.2.7. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Com o objetivo de avaliar a eficácia do processo de polimerização, bem como as características das nanopartículas poliméricas obtidas, algumas análises foram realizadas em amostras do produto final. As técnicas e metodologias utilizadas no trabalho estão descritas a seguir.

4.2.7.1. Conversão por gravimetria

A conversão por gravimetria é determinada como a razão entre a massa de polímero presente no reator e a massa de monômero alimentada. A massa de polímero é calculada a partir do resíduo seco obtido pela evaporação de uma amostra de látex em uma estufa com ventilação forçada. Para calcular a massa de polímero, é necessário

subtrair a massa de hidroquinona sólida adicionada para parar a reação e a fração de sólidos não poliméricos presente no resíduo seco.

Durante as reações, alíquotas em torno de 5 mL eram retiradas de dentro do reator com a ajuda de uma seringa. As amostras foram coletadas de 30 em 30 minutos. Recipientes (barquetas) feitos de papel de alumínio eram pesados. Em seguida, adicionavam-se 3 gotas de uma solução de hidroquinona a 1,0%, pesando novamente a amostra recolhida do reator. As amostras eram levadas a estufa por um período de 12 a 26 horas a 70°C. Após esse período o resíduo seco obtido era novamente pesado.

4.2.7.2. Distribuição de tamanho de partícula

Os métodos usuais utilizados para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas são baseados em espectroscopia de correlação fotônica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e/ou microscopia eletrônica de transmissão (MET). Vários estudos têm sido desenvolvidos para a avaliação dos principais fatores que afetam o diâmetro das partículas de sistemas nanoestruturados. Geralmente, as nanopartículas, mesmo quando preparadas com auxílio de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm. Entretanto, partículas com diâmetros em torno de 60 a 70 nm ou mesmo inferiores a 50 nm podem ser obtidas.

A medida de tamanho de partícula neste trabalho foi realizada utilizando equipamento de Dispersão Dinâmica de Luz, ZETASIZER NANO ZS modelo ZEN 3600 da Malvern Instruments, que determina o diâmetro médio das partículas por intermédio da taxa de difusão das partículas através do fluido. A amostra é iluminada por um feixe de laser e a luz espalhada pelas partículas é captada por um cabo de fibra ótica colocado em um determinado ângulo e transmitida para o tubo fotomultiplicador e pulso amplificador/discriminador, onde é transformada em um sinal elétrico. A intensidade da luz captada pelo detector sofre interferência da movimentação das partículas, devido ao movimento Browniano. As partículas pequenas se movem rapidamente, gerando rápidas flutuações de intensidade da luz, enquanto que grandes partículas mudam de posição lentamente, causando uma lenta flutuação de intensidade. Estas flutuações na intensidade contêm informações sobre a taxa de difusão das

partículas. Conhecendo-se o coeficiente de difusão com a equação de Stokes-Einstein, obtém-se o tamanho de partícula (FLORENCE E ATTWOOD, 2003).

As amostras foram preparadas introduzindo-se uma gota da emulsão diretamente na cubeta de quartzo. O volume da cubeta era preenchido com água deionizada, previamente filtrada em membrana de 0,45 µm. As amostras eram homogeneizadas com um pipeta Pauster e introduzidas no equipamento para leitura.

4.2.7.3. Determinação de pH

Informações relevantes sobre a estabilidade de emulsões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, como função do tempo. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indício de degradação do polímero (GUTERRES *et al.*, 1995; PAUL *et al.*, 1997). A determinação do pH das emulsões foi realizada em equipamento da Metrohm, modelo 780, previamente calibrado com soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0 (Merck), a temperatura ambiente.

4.2.7.4. Taxa de encapsulamento de PZQ

Este ensaio teve o objetivo de determinar a quantidade de PZQ que foi realmente encapsulado. Esse teste foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência. As amostras foram preparadas com as nanopartículas secas. Foram pesadas em torno de 165 mg de pó para balão volumétrico de 25 mL, onde foram adicionados 15 mL de metanol. As amostras foram levadas ao ultra-som por 10 minutos. Em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm com auxílio de seringa direto no “vial”. As condições cromatográficas de análises estão descritas na seção 4.2.2.2.

4.2.7.5. Interação fármaco-polímero

A análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foi empregada neste trabalho com o objetivo de demonstrar se realmente ocorreu alguma interação fármaco – polímero e se o PZQ foi realmente incorporado nas nanopartículas. As análises foram realizadas em equipamento DSC 1822e da Mettler Toledo. Foram pesadas em torno de 3 mg de cada amostra. As amostras foram submetidas a uma faixa de aquecimento de 25 a 200°C com taxa de aquecimento de 10°C/min em cadinho de alumínio com tampa furada. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste numa vazão de 80 mL/min. Um cadinho de alumínio vazio foi empregado como referência. Os termogramas, obtidos para as amostras que continham as nanopartículas, foram comparados com aqueles obtidos para amostras do polímero, do branco (polímero mais óleo), do PZQ puro e das misturas físicas (1:1) entre o fármaco e o polímero, com e sem óleo.

4.2.7.6. Avaliação morfológica

A análise de morfologia foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no equipamento MEV Quanta 200 da FEI Company. O detector empregado foi de elétrons secundários (ETD). Uma ponta de espátula contendo a amostra era adicionada a um pedaço de fita dupla face que estava aderida no suporte. O suporte era levado a uma câmera para a metalização com ouro em atmosfera de argônio e alto vácuo. Posteriormente, as amostras eram levadas ao microscópio. A espessura final da camada de ouro era de aproximadamente 300 Å.

4.2.7.7. Monômero residual

A pesquisa de monômero residual foi realizada por cromatografia a gás em equipamento da Agilent modelo 6890N.

As condições cromatográficas foram:

- Detector: FID a 250°C
- Gás de arraste: hélio
- Vazão de ar comprimido: 320 mL/min

- Vazão de nitrogênio: 23mL/min
- Vazão de hidrogênio: 32 mL/min
- Split: 30 mL/min
- Coluna: DB-5, 30 m x 250 μ m x 0,25 μ m
- Temperatura da coluna: 300°C

Todas as soluções foram preparadas com a adição do padrão interno. O padrão interno (PI) foi preparado pesando-se em torno de 1500 mg de octanol para balão volumétrico de 200 mL, utilizando etanol como diluente. As amostras foram preparadas pesando-se aproximadamente 1 g de polímero para balão volumétrico de 10 mL, onde foi adicionado 1 mL da solução de padrão interno e 5 mL de etanol. As amostras foram levadas ao ultra-som por 10 minutos. Em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente.

Para essa análise foi preparada uma curva padrão de seis pontos. Primeiramente foi feita uma solução estoque de metacrilato de metila, pesando-se em torno de 5 g para balão volumétrico de 100 mL com etanol. Retirou-se uma alíquota de 5 mL para balão volumétrico de 25 mL. A partir desta solução foram feitas as seguintes diluições:

- Ponto 1: 1 mL para balão volumétrico de 100 mL com 10 mL da solução do PI;
- Ponto 2: 1,5 mL para balão volumétrico de 50 mL com 5 mL da solução do PI;
- Ponto 3: 1,25 mL para balão volumétrico de 25 mL com 2,5 mL da solução do PI;
- Ponto 4: 1,75 mL para balão volumétrico de 25 mL com 2,5 mL da solução do PI;
- Ponto 5: 2,25 mL para balão volumétrico de 25 mL com 2,5 mL da solução do PI;
- Ponto 6: 2,75 mL para balão volumétrico de 25 mL com 2,5 mL da solução do PI.

Foi feita uma calibração linear na forma:

$$y = a + bx$$

Onde y é a razão das áreas do analito e padrão interno obtidas para a solução amostra e padrão interno, a é o coeficiente linear, b é o coeficiente angular e x é a concentração da amostra que está sendo avaliado em mg/mL.

4.2.7.8. Distribuição de massa molar do polímero

A determinação da distribuição de massa molar do polímero pode fornecer informações em relação à influência de componentes da formulação sobre o processo de polimerização, sobre a ocorrência de reações químicas entre o fármaco e o monômero e, ainda, sobre a degradação do polímero, como função do tempo. A técnica empregada nesse trabalho para a determinação da distribuição de massa molar do polímero, é a cromatografia de permeação em gel. A análise de distribuição de massas molares foi realizada em equipamento da marca Viscotek modelo VE2001. Nessa técnica, a separação ocorre exclusivamente por causa dos diferentes tamanhos das moléculas (LUCAS *et al.*, 2001; MEEHAN *et al.*, 2003).

As condições cromatográficas foram:

- Fase móvel: tetrahidrofurano
- Fluxo: 1mL/min
- Volume de injeção: 100 μ L
- Detector: índice de refração (VE 3580)
- Coluna: são utilizadas 4 colunas Phenomenex com tamanho de poros de 500 Å, 10⁴ Å, 10⁵ Å, 10⁶ Å
- Temperatura: 40°C

As amostras foram preparadas pesando-se em torno de 10 mg de amostra para balão volumétrico de 10 mL, sendo a concentração final de 0,1%. Para estas análises foram preparadas quatro soluções padrão de poli(estireno) com as seguintes massas molares:

Solução 1: 1.850.000, 226.000, 23.000 g/mol;

Solução 2: 1.000.000, 100.000, 12.600 g/mol;

Solução 3: 65.000, 520.000, 2.340 g/mol;

Solução 4: 335.000, 43.500 g/mol.

4.2.8. ESTUDOS DE PERFIL DE DISSOLUÇÃO

Os estudos de perfil de dissolução objetivaram avaliar a liberação do fármaco, PZQ, a partir da matriz polimérica em diversos meios de dissolução com relevância fisiológica. Nesse contexto, foram realizados perfis nos seguintes meios de pH: gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 4,5; 5,5 e 6,8). Todas as amostras das nanopartículas, após a secagem, e os comprimidos utilizados nesse trabalho foram avaliados quanto à cinética da dissolução. O estudo foi realizado em dissolutor com amostrador automático Distek 6100. Previamente a esse ensaio foi realizado o teste de solubilidade do PZQ nos diferentes meios propostos a 37°C. O procedimento foi o mesmo descrito na seção 4.2.2.2., mudando apenas o meio, como mencionado.

O preparo dos meios foi realizado da seguinte forma:

-pH 2,1: Diluíram-se 8,5 mL de HCl concentrado em 1000 mL de água. O pH foi aferido com auxílio do potenciômetro.

-pH 4,5: Pesaram-se 2,99 g de acetato de sódio para balão volumétrico de 1000 mL, que foi avolumado com água. Em seguida, em um bechér, foi vertida a solução citada e adicionaram-se 14 mL de ácido acético 2 N.

-pH 5,5: Pesaram-se 5,98 g de acetato de sódio para balão volumétrico de 1000 mL, que foi avolumado com água. Em seguida, em um bechér, foi vertida a solução citada e adicionaram-se 3 mL de ácido acético 2 N.

-pH 6,8: Pesaram-se 27,22 g de fosfato de potássio monobásico 0,2 M para balão volumétrico de 1000 mL, que foi avolumado com água. Em seguida, retiraram-se 250 mL dessa solução para balão volumétrico de 1000 mL. Em um bechér, foi vertida a solução citada e adicionaram-se 11,2 mL de hidróxido de sódio 0,2 N.

Todos os meios receberam uma quantidade de lauril sulfato de sódio para concentração final de 0,5% (p/v). As condições de dissolução foram baseadas na metodologia descrita na USP 34 para praziquantel comprimidos. As condições estão descritas abaixo:

- Aparato 2, pá a 50 rpm

-Volume de meio: para as nanopartículas trabalhou-se com 500 mL, para os comprimidos usou-se 900 mL.

-Dose: as nanopartículas foram colocadas em dose equivalente a 60 mg de Praziquantel. As nanopartículas eram pesadas em um tubo de ensaio e transferidas para as cubas. Em seguidas, os tubos vazios eram pesados novamente e pela diferença sabia-se a dose adicionada em cada cuba de dissolução. Os comprimidos foram colocados inteiros na cuba, na sua dose original, 600 mg.

-Tempos de coleta: 5, 10, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Nos tempos pré determinados eram coletados 10 mL, que eram filtrados no momento da coleta em filtro Millex de 0,45µm (Millipore) em *vials* de 2 mL. Os *vials* eram inseridos no HPLC para a quantificação de PZQ dissolvido, de acordo com a metodologia da seção 4.2.7.4.

4.2.9. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As análises de ^1H RMN, C^{13} e de baixo campo foram realizadas no Instituto de Macromoléculas (IMA) da UFRJ pelos pesquisadores Eduardo Miguez e Roberto Neto.

4.2.9.1. ^1H RMN

Pesaram-se aproximadamente entre 10 a 15 mg de amostra. As amostras foram dissolvidas em 0,8 mL de clorofórmio deuterado e transferidas para tubo de 5 mm, em seguida, as amostras foram levadas ao equipamento Varian Mercury VX 300.

4.2.9.2. ^{13}C RMN

Pesaram-se aproximadamente entre 80 a 100 mg de amostra. As amostras foram dissolvidas em 0,8 mL de clorofórmio deuterado e transferidas para tubo de 5 mm. Em seguida, foram levadas ao equipamento Varian Mercury VX 300.

4.2.9.3. RMN de baixo campo

As amostras foram preparadas, inserindo uma quantidade no tubo para que a célula de medição ficasse com 1,5 cm de altura (aproximadamente 2 g). O tubo era inserido no equipamento Oxford Instruments, modelo Maran Ultra, 23,4MHZ. Em seguida era aguardada a estabilização da medida por cerca de 5 minutos. A temperatura empregada foi de 27°C, a faixa de Tau empregada foi de 0,01 a 20 e³ ms. A leitura foi realizada em triplicata com 40 pontos cada, o número de leituras foi igual a 4.

4.2.10. FORMULAÇÃO

A formulação a ser testada, nesta tese, está descrita a seguir. Os excipientes foram escolhidos de acordo com as justificativas apresentadas abaixo:

- Agente suspensor – O agente suspensor sugerido para esta formulação é o excipiente composto de celulose microcristalina e carboximetilcelulose. Esta combinação promove a formação de um gel tixotrópico, que é facilmente fluidificado sob agitação. Pode-se, além disso, associar um polímero hidrofílico para aumentar a viscosidade da formulação e conferir às partículas uma superfície mais hidrofílica. Os polímeros hidrofílicos mais utilizados são os derivados de celulose. Como foi descrito no Capítulo 2 carboximetilcelulose e hidroxipropilcelulose foram usados em uma formulação feita pela indústria farmacêutica egípcia EIPICO.
- Conservante – O conservante sugerido é o benzoato de sódio ou o sorbato de potássio. Esses compostos são comumente empregados em preparações líquidas e semi-sólidas, para a prevenção do crescimento e desenvolvimento de microrganismos.
- Aroma – O aroma sugerido foi um único aroma, que proporcione um sabor agradável. Um bom aroma é preponderante para a adesão do paciente, especialmente quando se trata do público pediátrico. Nesse trabalho será empregado um aroma de banana.
- Edulcorante – O edulcorante sugerido é uma combinação de sacarina sódica e ciclamato de sódio conferindo um sabor adoçado à formulação *sugar-free*. Por se

tratar de uma população pobre, com hábitos sanitários precários, o objetivo foi evitar cáries.

- Tensoativo - O uso de tensoativo foi analisado de acordo com os testes preliminares da emulsão formada.
- Corantes – No momento não é utilizado nenhum tipo de corante, em função do aroma ser de banana e a formulação final já ser de cor branca.
- Embalagens – No momento não é analisado o efeito associado ao uso de embalagens neste trabalho. Isso será avaliado posteriormente quando for avaliar a estabilidade do produto final.

Uma suspensão para reconstituição consiste no preparo de um fármaco puro na forma em pó, ou mistura de pós. A adição do veículo (água) deve ser realizada no momento da utilização do medicamento.

4.2.10.1. Processo de fabricação

Misturam-se inicialmente os componentes com peneiração prévia e, se necessária, moagem. A mistura de pó obtida é envasada em frasco de vidro âmbar.

4.2.10.2. Avaliação das suspensões

As suspensões propostas neste trabalho são analisadas de acordo com os seguintes testes:

- Aspecto visual: avaliando se a aparência é homogênea ou não.
- Aspectos físicos: determinando o tempo de sedimentação e a ressuspensibilidade.
- Aspectos físico-químicos: consistindo nos ensaios de pH, viscosidade e reologia, teor de fármaco e estabilidade após reconstituição e após 24 horas
- Aspectos sensoriais: analisando o sabor das suspensões analisadas seguindo um protocolo desenvolvido pela Embrapa.

A razão de sedimentação consiste em introduzir a suspensão em uma proveta e deixá-la depositar até que não aumente a altura do sedimento. Mede-se, então, as alturas do sedimento e da fase líquida. A relação da altura do sedimento com a altura da fase líquida indica o volume de sedimentação. Quanto maior esta relação, mais elevado é o grau de floculação (ANSEL *et al.*, 2007).

A resuspensibilidade consiste em analisar o tempo de redispersão do sedimento. A resuspensibilidade pode ser de forma rápida (fácil dispersão do sedimento - sedimento floculado) ou de forma lenta (o sedimento não se dispersa com facilidade – sedimento defloculado) (ANSEL *et al.*, 2007).

4.2.11. ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO

Todo trabalho cujo alvo é o desenvolvimento de um medicamento precisa ser submetido a testes de eficácia e segurança. Esses estudos foram realizados no Centro de Pesquisa René Rachou da Fiocruz (CPqRR), em Belo Horizonte, no Laboratório de Esquistossomose, coordenado pelo Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, referência em esquistossomose no país.

Para a realização de qualquer estudo com uso de animais, é necessária a aprovação prévia no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). A licença CEUA empregada nesse trabalho foi L0118/09 da Pesquisadora Neusa Araújo do CPqRR.

As análises foram realizadas pela Pesquisadora Ana Carolina Alves Mattos com o meu acompanhamento.

4.2.11.1. Estudos in vitro

Para os estudos *in vitro*, foram infectados 7 camundongos Swiss, com aproximadamente 20 g de peso. Os animais foram infectados pela via subcutânea com aproximadamente 100 ± 10 cercárias do *S. mansoni* (Figura 7).



Figura 7 - Infecção subcutânea do camundongo com as cercárias

Após 40 dias de infecção, os animais foram sacrificados, utilizando solução injetável de pentobarbital sódico a 3% em uma dose de 300 μ L. Em seguida, foi realizado um corte no abdômen do animal, que foi imobilizado com as vísceras expostas. A partir desse momento, faz-se a perfusão de acordo com técnica descrita por SMITHERS e TERRY (1965), objetivando o recolhimento dos vermes íntegros. Os vermes são recolhidos em uma placa de Petri contendo soro fetal bovino inativado e meio de cultura RMPI-1640 com 100 μ g/mL de penicilina e estreptomicina, usado na perfusão (Figura 8).

Na sequência, as placas com os vermes são lavadas com meio de cultura e, em seguida, os vermes são transferidos a outras placas contendo meio de cultura estéril em fluxo laminar. Por fim, os vermes são inseridos em uma placa estéril de 24 poços, sendo que cada poço possui 1 mL de meio de cultura e recebe de 2 a 3 casais de vermes.

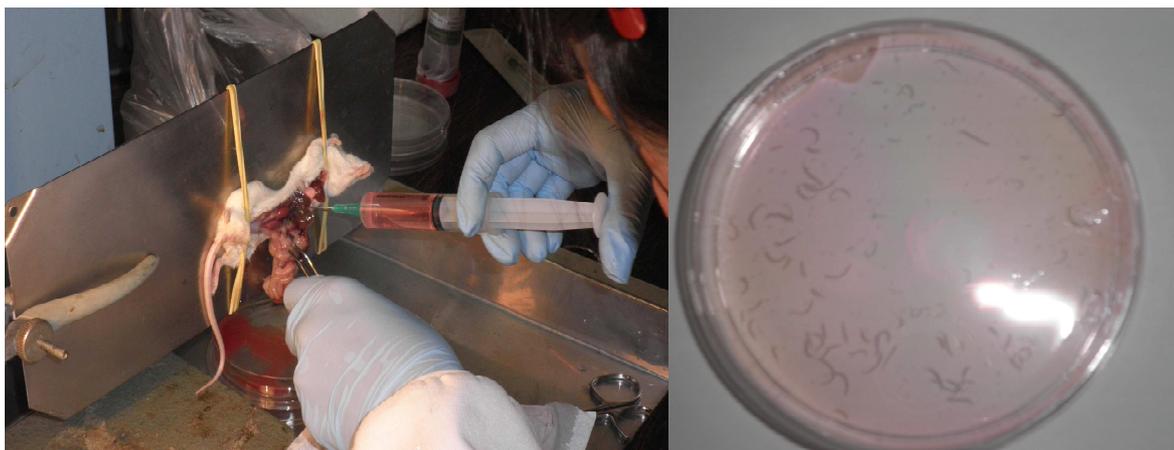


Figura 8 - Perfusão dos animais e recolhimento dos vermes.

As nanopartículas com e sem PZQ foram diluídas em meio de cultura e em metanol nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ de PZQ. Amostras de comprimidos de PZQ produzidos por Farmanguinhos também foram diluídas na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de fármaco, para serem utilizadas como padrão em ambos os diluentes. Dessa forma, foram montadas duas placas: uma com meio de cultura e a outra com metanol. Cada dois poços receberam as soluções descritas acima e outros dois poços, ficaram apenas com o meio de cultura, sendo estes o controle. Após a adição do material aos poços, a placa foi levada ao microscópio invertido OLYMPUS CKX41 para observação da motilidade e danos no tegumento. As placas foram levadas a uma incubadora a 37°C e atmosfera com 5% de CO_2 . Após 24 horas, as placas foram retiradas da incubadora e observadas no microscópio. Em seguida, os vermes foram lavados com meio de cultura para a retirada do fármaco e foram novamente mantidos na mesma condição. O meio de cultura retirado foi levado ao cromatógrafo, conforme as condições descritas na seção 4.2.7.4. para verificação da concentração real de PZQ que foi dissolvido no meio.

Após sete dias, tempo final do experimento, as placas foram retiradas da incubadora e observadas novamente ao microscópio, com objetivo de verificar a motilidade e vivacidade dos vermes.

4.2.11.2. Estudos in vivo

Os estudos *in vivo* foram realizados em animais, camundongos Swiss, após 45 dias de infecção com 100 cercárias de *S. mansoni*. As doses de PZQ administradas foram 200 e 400 mg/Kg, tanto na forma de nanopartículas suspensas em água quanto de comprimidos de PZQ triturados e suspensos em água. O objetivo era administrar até 800 mg/Kg, mas, em função da grande quantidade de pó isso não foi possível, pois ocorria entupimento da cânula de administração. Além disso também foram administrados as nanopartículas sem o PZQ na dose de 400 mg/Kg, objetivando verificar a toxicidade e avaliar se as nanopartículas exerceriam algum efeito na doença. Tanto as nanopartículas quanto o pó dos comprimidos triturados foram pesados e suspensos em salina. A administração foi realizada por gavagem; ou seja, administração de substâncias por via intragástrica, conforme mostrado na Figura 9. O volume de administração foi definido de acordo com o peso de cada animal. A Figura 10 esquematiza o desenho do estudo.



Figura 9 - Administração por gavagem

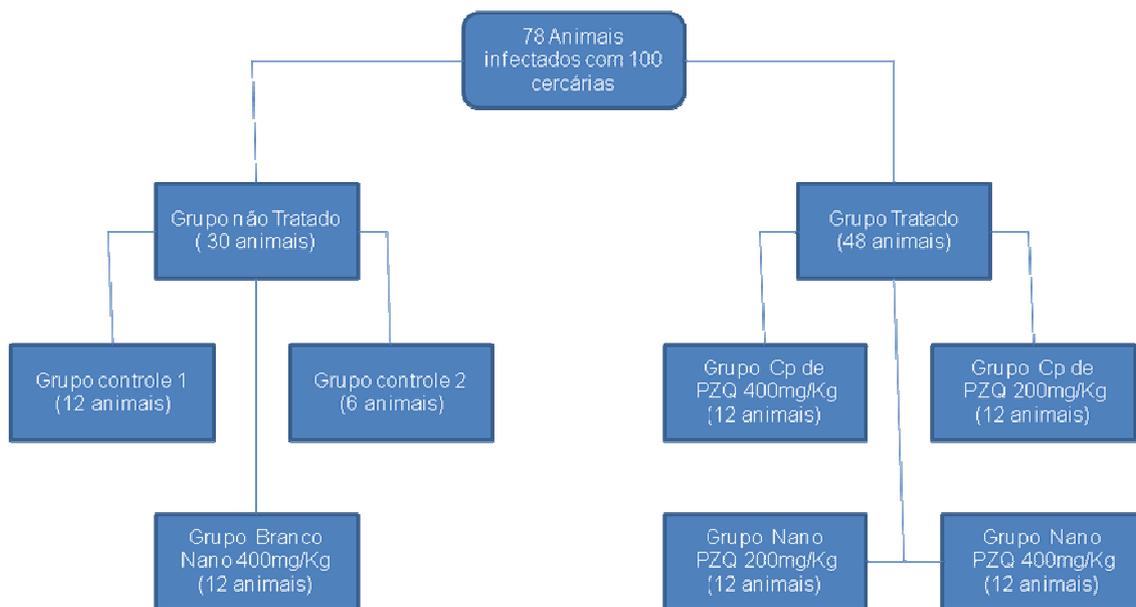


Figura 10 - Esquema de tratamento aos animais infectados

Após o tratamento, o grupo controle foi imediatamente sacrificado. Os demais grupos foram sacrificados após 30 dias. Os animais são sacrificados por deslocamento da cervical. Em seguida, o animal é aberto pelo abdomen, tendo a veia renal amarrada com uma linha. Nesse momento, a agulha de perfusão é inserida na aorta, passando solução salina na mesma. Um recipiente era colocado embaixo do animal para recolher o sangue com a solução de lavagem, sendo verificados os vermes presentes no mesentério, como mostrado na Figura 11. Essa solução recolhida é filtrada em malha fina, onde os vermes ficam retidos e são passados com ajuda de água a uma placa de Petri e posteriormente levados ao microscópio óptico comum (Nikon, modelo ALPHAPHOT-2/YS2), para ser realizada a contagem. O segundo passo é fazer a perfusão na veia cava, da mesma forma que foi realizada na aorta, visando contar os vermes vivos presentes no fígado. Nesse ensaio são analisados o número de fêmeas, machos e casais (par de vermes acasalados).



Figura 11 - Foto do processo de perfusão

Na segunda etapa é feita a retirada do fígado, o mesmo é macerado e levado ao microscópio, para ver a presença de vermes que não foram recolhidos no processo de perfusão e os que estão mortos. Na fase terminal de vida dos vermes, estes se alojam no fígado.

A última etapa é a retirada da porção final do intestino delgado, aproximadamente 1 cm, para avaliação do oograma. O segmento intestinal é colocado em uma lâmina, e é pressionado com o auxílio da lamínula e levado também ao microscópio óptico comum.

4.2.12. ESTUDOS DE TOXICIDADE

Os estudos de toxicidade realizados foram os de citotoxicidade e genotoxicidade, ambos realizados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade da Fiocruz (INCQS), empregando células sanguíneas.

4.2.12.1. Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade objetiva determinar a viabilidade de células sanguíneas humanas após tratameto com o PZQ, nanopartículas com PZQ e nanopartículas sem o fármaco em água ou dimetilsulfóxido (DMSO) 5% durante 2 horas a 37°C.

Primeiramente coletou-se sangue em volume apropriado. Para cada mL eram adicionados 80 µL de heparina 5.000 UI/mL. O sangue era acondicionado em eppendorfs.

Em seguida foi avaliada a solubilidade dos materias em água e DMSO 5% para estabelecer as concentrações a serem empregadas neste trabalho. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

As concentrações máximas testadas foram baseadas no estudo de solubilidade realizado previamente.

Tabela 4 - Concentrações utilizadas no ensaio de citotoxicidade

Materiais	Concentrações utilizadas (µg/mL)
Praziquantel	0,5; 1,0; 2,0; 5,5; 13,75; 35,0

Nanopartículas com PZQ	4,09; 8,18; 16,36; 45,0
Nanopartículas sem PZQ	3,59; 7,18; 14,36; 39,5

Após o tratamento das células sangüíneas, as mesmas ficam em estufa de CO₂ (Auto Zero - Heraeus) a 37°C por 2 horas. Em seguida, preparam-se as lâminas. As lâminas foram preparadas com 50 µL sangue tratado + 50 µL solução de FDA 30 µg/mL e de brometo de etídio 8 µg/mL. Dessa mistura sangue-corante, 50 µL foram adicionados às lâminas, que foram recobertas por lamínulas e levadas ao microscópio de fluorescência para a leitura. A viabilidade celular foi medida pelo diacetato de fluoresceína (30 µg/mL) e brometo de etídio (8 µg/mL), como descrito por HARTMANN e SPEIT (1997). Analisaram-se 200 células por lâmina, com aumento de 400x. As células viáveis mostram fluorescência verde, enquanto núcleos corados em laranja indicam células mortas, células perdendo viabilidade contêm grânulos citoplasmáticos verdes e um núcleo laranja. Os resultados são expressos em percentual de citotoxicidade ou células mortas. As células que perdem a viabilidade são contadas como células mortas.

4.2.12.2. Genotoxicidade

O ensaio de genotoxicidade tem por função verificar possíveis danos ao DNA das células.

A análise de citotoxicidade é realizada previamente ao ensaio Cometa, para estabelecer as faixas de concentrações a serem utilizadas. Deve-se evitar no ensaio Cometa concentrações que determinem valores superiores a 30% de decréscimo de viabilidade celular, quando comparadas com as culturas controles. No caso de um resultado ruim na citotoxicidade, a genotoxicidade não é realizada.

Foram realizados dois experimentos do ensaio Cometa empregando células de sangue total humano heparinizado obtido por punção venosa. As células sangüíneas humanas foram tratadas em duplicata durante 2 horas a 37°C com DMSO 5% (controle solvente) e com diversas concentrações dos materiais alvo do estudo. As concentrações são apresentadas na Tabela 4 e são as mesmas utilizadas no ensaio de citotoxicidade. O MMS, mutágeno de ação direta, na concentração de 160 µM foi empregado como controle positivo.

A preparação das lâminas ocorreu da seguinte maneira: 5 µl de sangue tratado foram aliqüotados para um eppendorf e em seguida foram adicionados 120 µl de agarose BPF 0,5%; 120 µl da mistura foram adicionados a lâminas pré-revestidas com agarose PFN 1,5% e as mesmas foram recobertas por lamínulas para levar a geladeira (4 a 10°C) por 3-5 minutos, para solidificar a agarose BPF. Após este processo, retiraram-se as lamínulas com cuidado para não remover a camada de agarose. As lâminas foram levadas a uma solução de lise (sarcosinato de lauroilo sódico 1%, p/v, NaCl 2,5 M, EDTA dissódico 100 mM, Tris 10 mM, pH 10 e Triton X -100% v/v), onde permaneceram de um dia para outro em geladeira para lisar as células e permitir o desdobramento do DNA. Após a lise das células, as lâminas foram levadas à cuba de eletroforese com fonte BIO-RAD (modelo 1000/500 - Power Supply) mantida em banho de gelo. Adicionou-se o tampão de eletroforese (EDTA sódico 1 mM e NaOH 300 mM) à cuba com as lâminas e aguardou-se 20 minutos para o desdobramento do DNA e expressão dos sítios álcali-lábeis antes da eletroforese. Após o banho em tampão alcalino, iniciou-se a eletroforese, também por 20 minutos a 25V / ~300 mA. Após a corrida, as lâminas foram escorridas e lavadas 3 vezes, durante 5 minutos, com tampão de neutralização Tris 0,4M (pH 7,5) Depois as lâminas foram coradas com brometo de etídio a 20 µg/mL e 50 células, selecionadas ao acaso foram analisadas por lâmina, usando-se um microscópio de fluorescência com aumento de 400x (NIKON), resultando um total de 100 células por cultura e 200 células por grupo experimental. A avaliação da extensão de migração do DNA em 100 células (2 lâminas) é feita de acordo com a intensidade da cauda dos cometas em 4 diferentes classes (0 a 3) (KOBAYASHI *et al.*, 1995).

- classe 0: ausência de cauda;
- classe 1: pequena cauda;
- classe 2: grande cauda;
- classe 3: totalmente danificado (cabeça do cometa muito pequena com praticamente todo o DNA na cauda).

O dano ao DNA é expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em unidades arbitrárias (UA). O cálculo em UA é realizado como descrito a seguir:

- Para cada grupo experimental, por suspensão ou cultura celular, calcula-se o dano ao DNA em unidades arbitrárias (UA) para 50 células de cada lâmina, de acordo com a seguinte fórmula:

$$UA = [(M_0 \times 0) + (M_1 \times 1) + (M_2 \times 2) + (M_3 \times 3)]$$

onde UA é o número de unidades arbitrárias e M0, M1, M2 e M3 são o número de células com classe de dano 0, 1, 2 e 3, respectivamente.

- O número total de UA é calculado por 100 células analisadas/cultura, somando os números de UA obtidos nas duas lâminas, procedendo da mesma forma para a segunda cultura ou suspensão celular referente à mesma concentração testada. Calcula-se o número total de UA (UAT) por 200 células analisadas/concentração nas duas culturas somando os números de UA obtidas em cada cultura.

4.2.12.2.1. Análise estatística

Foram realizadas as análises estatísticas, sendo observadas as eventuais diferenças existentes entre os valores médios de unidades arbitrárias totais (UAT) obtidos para os grupos controle negativo, DMSO 5%, e para cada concentração dos materiais testados além do controle positivo, MMS 160µM, nas duas culturas em replicata por grupo experimental, empregando o teste t de *Student* de dados agrupados monocaudal aos níveis de significância de 0,05 e 0,01.

CAPÍTULO 5

Resultados e Discussão

5.1. AVALIAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima foi aprovada em todos os testes a que foi submetida. Os resultados de identificação, doseamento e substâncias relacionadas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Caracterização da matéria-prima de praziquantel

Testes Realizados	Resultados	Especificação
Identificação por IR	Positiva	De acordo com PZQ SQR
Doseamento	100,01	98,5 – 101,0%
Substâncias Relacionadas	ND*	Máximo de 0,2%

* ND - não detectável

De acordo com os resultados, pode-se observar que todos os testes realizados estão de acordo com as especificações. A metodologia e as especificações foram retiradas da Farmacopéia Americana de 2008 (USP 31), um compêndio oficial reconhecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil e por outras agências regulatórias no mundo, como o FDA (*Food and Drug Administration*). Dessa forma, a matéria-prima foi aprovada para ser utilizada no trabalho aqui desenvolvido.

O teste de rotação específica apresentou os seguintes resultados; em etanol o desvio da luz polarizada (α) foi igual a zero, enquanto em clorofórmio α foi igual a -1° . Esses resultados confirmam que a matéria prima em questão é uma mistura racêmica. Se a amostra fosse apenas do R-(-) enantiômero PZQ, α seria igual a $-135,0^\circ$ em etanol e $-126,9^\circ$ ou $-146,9^\circ$ ou $-132,4^\circ$ em clorofórmio (ROSZKOWSKI *et al.*, 2006).

A análise da distribuição do tamanho de partícula resultou nos dados apresentados na Tabela 6 e na Figura 21.

Tabela 6 – Diâmetros de corte para diferentes frações mássicas acumuladas da matéria-prima

Amostras PZQ matéria- prima	Diâmetro (μm)		
	10%	50%	90%
A1	1,96	7,57	14,55
A2	2,23	9,42	16,88
A3	2,07	8,42	16,17
A4	2,05	8,16	15,43
A5	2,05	8,01	14,98
A6	2,05	7,96	14,78
	$2,07 \pm$	$8,26 \pm$	$15,46 \pm$
Média \pm dp*	0,09	0,64	0,90

*dp – desvio padrão

Conforme mostrado na Tabela 6 e na Figura 12, fica claro de que os tamanhos de partícula da matéria-prima são elevados, principalmente porque se deseja obter um material nanoparticulado. Dessa forma a produção de nanopartículas poliméricas contendo o PZQ requer a solubilização do fármaco, para ser possível a incorporação do mesmo nas nanopartículas.

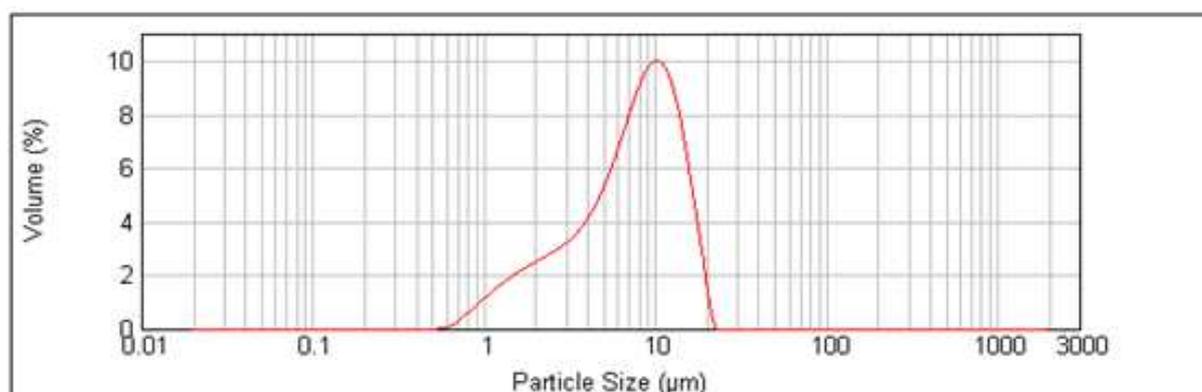


Figura 12 – Distribuição de tamanho de partícula da matéria-prima

De acordo com os resultados obtidos, observa-se uma distribuição de tamanhos unimodal (embora alongada e com um ombro posicionado nos diâmetros baixos) e

reprodutiva para as diferentes análises, demonstrando que a metodologia desenvolvida foi adequada para a avaliação de tamanho de partícula. É importante ressaltar que a matéria-prima empregada no trabalho foi processada em micronizadores. O procedimento teve a finalidade de reduzir o tamanho de partícula e evitar problemas na dissolução do praziquantel na formulação de comprimidos.

Ensaio de degradação térmica foram realizados, uma vez que a técnica escolhida para a produção das nanopartículas poliméricas foi a polimerização *in situ*, realizada a temperaturas relativamente altas, assim foi necessária uma avaliação prévia da estabilidade do PZQ nestas condições. Os resultados do teste em estufa estão apresentados na Tabela 6. De acordo com os resultados obtidos, não foi observada qualquer degradação significativa do PZQ, pois não houve queda relevante do teor do fármaco, nem o aparecimento de produtos de degradação, conforme mostrado no cromatograma (Figura 13). Para confirmar este resultado, foi feita a análise termogravimétrica, cujo termograma está apresentado na Figura 14.

Tabela 7 – Resultados do estudo de degradação térmica.

Matéria-prima de PZQ	Resultados (%) (média ± IC*)
Sem aquecimento	100,01 ± 1,96
3 horas; 85°C	99,25 ± 0,38
6 horas; 85°C	99,43 ± 1,74

*IC - Intervalo de Confiança

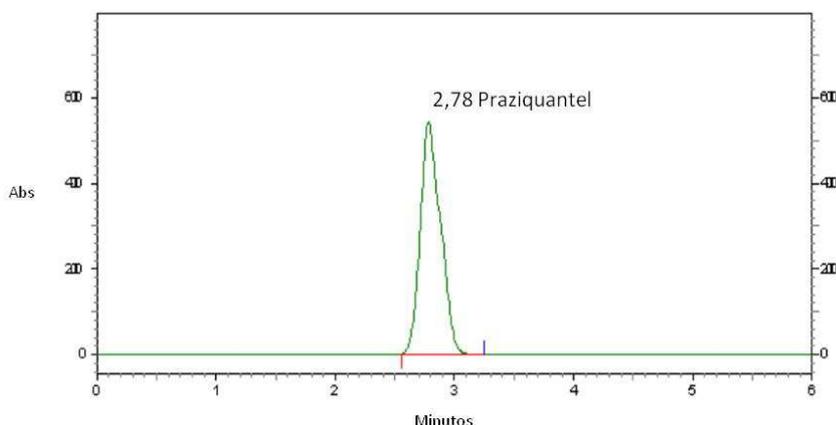


Figura 13 – Cromatograma referente a análise de PZQ submetido à degradação térmica em estufa por 6 horas a 85°C.

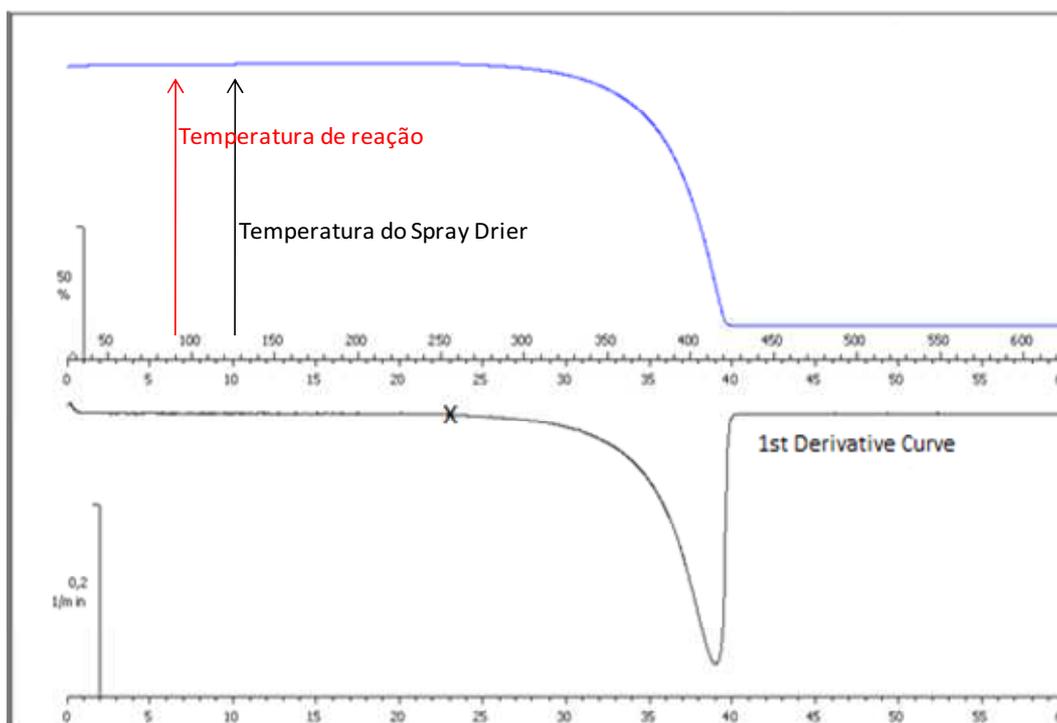


Figura 14 – Termograma do PZQ.

Conforme pode ser observado, o PZQ começa a sofrer degradação térmica somente a 258°C. De acordo com os resultados obtidos, fica evidente que o PZQ pode ser adicionado nas reações de polimerização sem risco de degradação térmica nas condições de reação. Os resultados também indicam que a secagem do material pode ser realizada de forma segura no *spray dryer*, que opera a cerca de 120°C.

Os testes de solubilidade foram realizados para avaliar as quantidades de fármaco que poderiam ser adicionadas às reações, sem haver precipitação do PZQ. Os monômeros selecionados para esse trabalho foram o metacrilato de metila (MMA), o acetato de vinila (AV) e o ácido acrílico (AA). Além disso, como esse ensaio foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, pode-se avaliar também uma possível interação entre o monômero e o fármaco. Os resultados estão apresentados na Tabela 8 e na Figura 15.

Tabela 8 – Solubilidade do PZQ nos monômeros selecionados.

Temperatura (°C)	Solubilidade do PZQ nos monômeros (mg/mL)		
	MMA ¹	AV ²	AA ³
25	42,8	45,0	231,3
37	54,1	95,6	358,9
55	89,9	185,1	452,3
75	254,8	235,7	521,9
90	258,7	325,3	-

¹ Metacrilato de metila; ² Acetato de vinila; ³ Ácido acrílico

Uma das metas perseguidas nesse trabalho é a obtenção de uma suspensão de PZQ na concentração de 120 mg/mL de PZQ no produto final. A Tabela 8 demonstra que a solubilidade no metacrilato de metila (MMA) a 75°C supera a concentração desejada de 120 mg/mL, enquanto que a solubilidade no acetato de vinila (AV) atinge o valor desejado em torno 55°C. No ácido acrílico (AA), a solubilidade na temperatura ambiente, já ultrapassa o valor desejado. Essa informação é importante, pois todos os monômeros selecionados são capazes de dissolver o PZQ nos valores adotados como meta e na faixa de temperatura reacional usual.

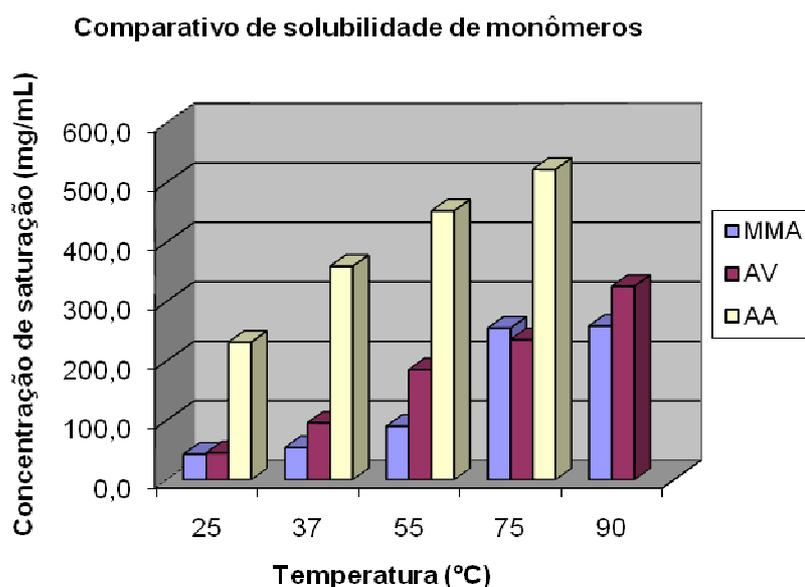


Figura 15 – Gráfico comparativo das concentrações de saturação de PZQ nos diferentes monômeros e temperaturas.

As análises cromatográficas realizadas como apoio para os testes de solubilidade, aplicaram-se inicialmente as mesmas condições empregadas no doseamento. Entretanto, observou-se que o monômero absorvia a 207 nm com tempo de retenção muito próximo ao do PZQ, conforme demonstrado nas Figuras 16 e 17. Dessa forma, alterou-se a polaridade da fase móvel, aumentando a proporção de água na solução. O aumento da polaridade fez com que o PZQ interagisse um pouco mais com a coluna, que é mais apolar que a fase móvel. É importante observar que o PZQ é mais apolar que o MMA e que todos os monômeros utilizados, baseado na estrutura dos compostos e na interação com a coluna. A coluna C₁₈ é mais apolar que a fase móvel e o PZQ interage mais com a coluna do que com a fase móvel, saindo depois do monômero. Dessa forma, conseguiu-se uma separação com resolução adequada entre os dois compostos, como mostrado na Figura 18.

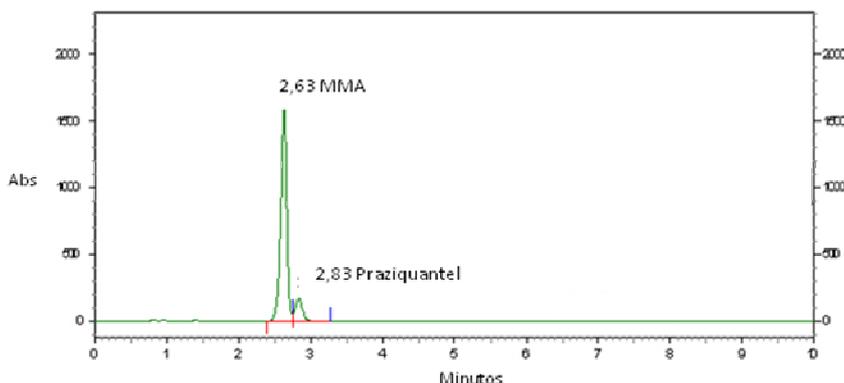


Figura 16 – Cromatograma de uma amostra obtido no teste de solubilidade nas condições cromatográficas do doseamento.

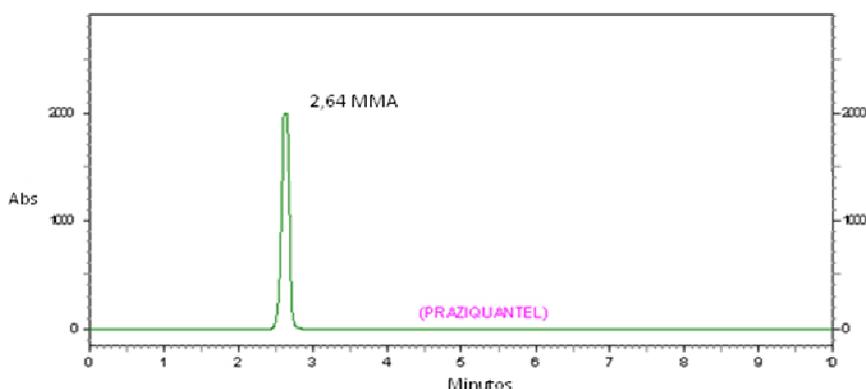


Figura 17 – Cromatograma do branco (solução de MMA) obtido no teste de solubilidade nas condições cromatográficas do doseamento.

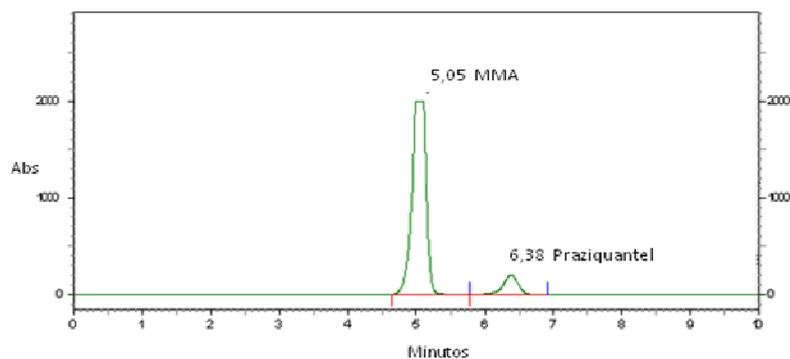


Figura 18 - Cromatograma da mesma amostra da Figura 16 obtido após o ajuste da fase móvel de 60:40 (Acetonitrila:água) para 50:50.

De acordo com os resultados apresentados, o ácido acrílico é o monômero em que o PZQ é mais solúvel, seguido do acetato de vinila e do metacrilato de metila, respectivamente. Observou-se a ausência de picos provenientes de alguma possível interação entre o monômero e o fármaco ou da possível degradação do PZQ no monômero. A metodologia, depois de ajustada, foi empregada em todas as análises cromatográficas, incluindo o doseamento de PZQ nas nanopartículas.

5.2. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO

As reações de polimerização foram realizadas em duas etapas, I e II, tendo como referência a seleção prévia do(s) monômero(s) que seriam empregados nesse trabalho. As reações iniciais objetivaram a preparação de nanopartículas e a avaliação dos parâmetros de reação, como temperatura, equipamentos e componentes reacionais. As reações preliminares estão apresentadas na Tabela 9. Foram realizadas reações com os três monômeros inicialmente selecionados, metacrilato de metila, acetato de vinila e ácido acrílico, avaliando-se o comportamento de cada sistema nas condições propostas.

Tabela 9 – Formulações usadas para polimerização em miniemulsão nos testes preliminares.

Reagentes	Massas (g)			
	Ultra-turrax	Homogeneizador	Ultra-turrax	Homogeneizador
Monômero	70	70	50	50
PZQ	3	3	3	3
Óleo mineral	30	30	50	50
LSS	5	5	5	5
NaHCO ₃	0,3	0,3	0,3	0,3
K ₂ S ₂ O ₈	0,3	0,3	0,3	0,3
Água	227	227	227	227
Temperatura	60°C	60°C	60°C	60°C

Inicialmente os produtos obtidos com diferentes tipos de equipamentos (ultra-turrax e homogeneizador de alta pressão) e com diferentes receitas empregadas na etapa de preparação da miniemulsão foram analisados. As primeiras reações foram realizadas a 60°C, pois a temperatura de ebulição do acetato de vinila é de 72°C. No primeiro momento foram empregadas as mesmas condições para os três monômeros selecionados e as eventuais diferenças no processo de polimerização foram observadas.

Todas as reações conduzidas na presença de ácido acrílico não deram certo. Em função da alta solubilidade do ácido acrílico na água, não se conseguiu a formação de um látex na presença desse monômero, apesar da presença de óleo e do PZQ. O produto final obtido foi sempre uma solução e não uma emulsão, devido à miscibilidade elevada do ácido acrílico com a água e com o PZQ. Assim, esse monômero foi descartado do trabalho.

Conforme mostrado na Tabela 9, as reações foram realizadas com e sem o uso do óleo mineral. A função do óleo é de atuar como um co-estabilizador hidrófobo. As reações de polimerização conduzidas com MMA prosseguiram normalmente, levando à formação de um látex estável que não perde a estabilidade ao longo de meses de estocagem, tanto na presença como na ausência de óleo. Entretanto, as reações com AV não levaram à formação de um látex estável em nenhum momento. Ao interromper a agitação para retirar o látex do reator, formavam-se duas fases imiscíveis na ausência de vaselina. Esse fato demonstra que nesse caso o óleo atua realmente como um co-estabilizador do processo. As reações com AV na presença de óleo levava à formação

de um látex, mas a estabilidade da emulsão era de cerca de 12 horas. Após esse período, começava-se a observar a separação de fases. Ainda em relação à presença do óleo, foi observado também que as amostras preparadas na proporção monômero:óleo de 50:50, após serem secas, apresentaram baixa resistência mecânica. Essas amostras, ao serem maceradas, formavam um filme, enquanto as amostras 70:30 não apresentaram esse comportamento. Isso parece indicar que existe um limite máximo de óleo que pode ser adicionado ao meio para que não ocorra degradação das propriedades mecânicas do material. Esse comportamento já poderia ser esperado, pois o óleo atua como um plastificante da fase polimérica.

Diante desses resultados foi estruturada a segunda etapa do estudo realizada apenas com o monômero metacrilato de metila, que levou aos melhores resultados. Nessa parte do trabalho, objetivou-se otimizar as condições de polimerização, conforme apresentado a seguir. A segunda etapa do projeto foi dividida em 2 partes, conforme comentado e apresentado na Tabela 10.

5.2.1. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO - PARTE I (RECEITA I)

Em trabalhos relacionados à síntese de nanopartículas poliméricas, com encapsulamento de fármacos ou não, é fundamental caracterizar de forma apropriada as condições de reação, e as propriedades do material obtido, permitindo conhecer bem o desenho das nanopartículas em sua totalidade (LANDFESTER *et al.*, 2010).

Esta seção descreve todos os testes realizados para a otimização das condições reacionais para encapsular o PZQ.

Tabela 10 - Reações realizadas com MMA na segunda etapa do trabalho.

Reações	Componentes e condição						Equipamento	
	MMA (g)	Óleo (g)	PZQ (g)	Eudragit (g)	EGDMA (g)	Temp. (°C)	Turrax	Homog.
R1 ^{*1}	100					60	x	
R2	50	50				60	x	
R3	50	50	3			60	x	
R4	70	30	3			60	x	
R5	50	50	3			60		x
R6	70	30	3			60		x
Parte I R7	100		3			80		x
R8	70	30	10			80		x
R9 ^{*2}	70	30	6			80		x
R10	70	30	6			90		x
R11	70	30				90		x
R12	100		15			90		x
R13	100		12			90		x
R14	70	30	6	7		90		x
R15	70	30		7		90		x
R16	100		12	10		90		x
R17	100		15	10		90		x
R18	100		12	10	5	90		x
R19	70	30	12	10	5	90		x
R20	100			10	5	90		x
Parte II R21	70	30		10	5	90		x
R22	100		12		5	90		x
R23	70	30	12		5	90		x
R24	100				5	90		x
R25	70	30			5	90		x
R26 ^{*3}	70	30	17		5	90		x
R27	77	23	17		5	90		x
R28 ^{*4}	77	23	17		5	90		x
R29	77	23			5	90		x

^{*1} R1 a R8 massa de iniciador de 0,3 g; ^{*2} R9 a R29 massa de iniciador de 0,6 g; ^{*3} R26 a R29 realizada toda a quente, 90°C; ^{*4} R28 e R29 massa de LSS de 2,5 g contra 5 g das demais.

5.2.1.1. Conversão

Nas reações realizadas inicialmente com metacrilato de metila a 60°C, calculou-se apenas a conversão final, por gravimetria, após 180 minutos de reação, como apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 - Conversão das reações de MMA a 60°C com 3 g de PZQ

Reação	Conversão (%)
R3* ¹	44,0
R4* ²	56,8
R5 ¹	52,7
R6 ²	50,0

* Reações realizadas no ultra-turrax; ¹ 50:50 (MMA:óleo); ² 70:30 (MMA:óleo)

Os resultados iniciais de conversão foram muito baixos e em torno de 50%, demonstrando que as condições empregadas nestas reações deviam ser revistas. A temperatura foi o primeiro parâmetro a ser alterado, passando para 80°C. O tempo de reação foi mantido em 180 minutos. Nas reações seguintes, a conversão foi calculada em vários pontos, em intervalos regulares de 30 minutos, começando imediatamente após a adição do iniciador. A evolução das conversões obtidas em diferentes reações com a temperatura de 80°C está apresentada na Figura 19.

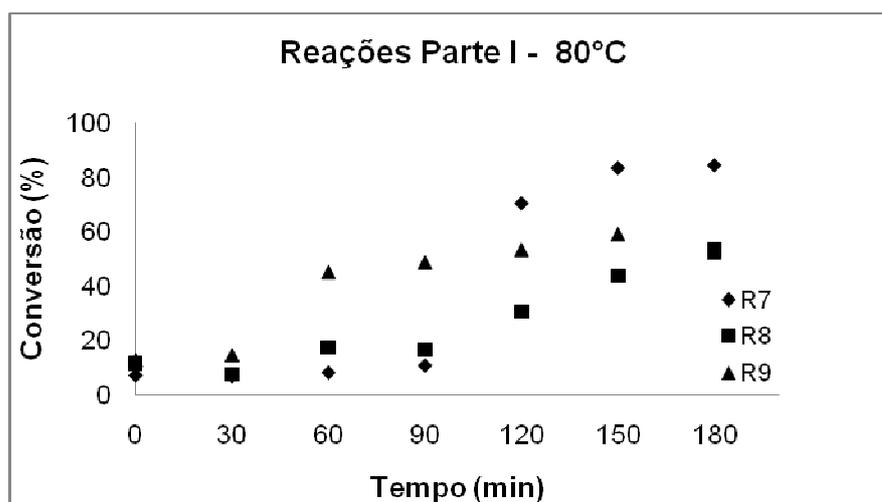


Figura 19 - Conversão das reações conduzidas a 80°C. (R7) MMA com 3 g de PZQ e 0,3 g de iniciador; (R8) MMA:óleo (70:30) com 10 g de PZQ e 0,3 g de iniciador; (R9) MMA:óleo (70:30) com 3 g de PZQ e 0,6 g de iniciador.

A reação R7 realizada na ausência de vaselina apresentou conversão bastante superior (90%) em relação às reações realizadas com óleo mineral a 60°C (50%). Parece clara a importância do efeito gel na reação R7 tendo em vista o salto de conversão observado entre 90 e 120 minutos de reação. Como bem documentado na literatura, as polimerizações com MMA são particularmente suscetíveis ao efeito gel (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003; BESTETI, 2009). Entretanto, a reação realizada na presença de óleo a 80°C levou a um incremento na conversão final de apenas 20%, de 50 para 70%. Esses resultados demonstram que o óleo exerce uma forte influência sobre a cinética de reação, seja por causa de um possível efeito inibidor ou por um efeito de diluição do monômero. Dessa forma, foi realizada mais uma reação, R9, dobrando-se a quantidade de iniciador, com o intuito de otimizar o rendimento das reações. A conversão final, conforme mostrado na Figura 19, foi de 70% logo, o aumento na concentração de iniciador não alterou de forma significativa a conversão final da reação. Esses resultados estão em perfeito acordo com a teoria clássica de polimerização em emulsão, considerando-se que o número médio de radicais por partículas permanece essencialmente constante ao longo da reação. Portanto, é provável que o principal efeito do óleo seja o de diluição da espécie reagente no meio reacional. Nesse caso, a diluição da carga monomérica em 30% resulta na queda aproximada de 30% das taxas de reação, o que é aproximadamente confirmado pelos dados apresentados na Tabela 10. TEO e colaboradores (2011) obtiveram resultados semelhantes: a conversão diminuiu quando hidrocarbonetos aromáticos líquidos eram adicionados às polimerizações em miniemulsão de n-butil metacrilato (BMA). Segundo os autores, os hidrocarbonetos aromáticos formam um complexo com os radicais poliméricos em crescimento, retardando a taxa de polimerização. Esse efeito também ajuda a explicar os resultados da Tabela 11 onde todas as reações ocorrem na presença de óleo. A reação R8 (contendo 10 g de PZQ) apresentou depois de 90 minutos uma cinética mais lenta do que R9 (contendo 3 g de PZQ). Provavelmente isso ocorreu em função da maior concentração de PZQ disperso no monômero, exercendo um efeito diluidor, similar ao do óleo, embora em menor proporção, em função da concentração do PZQ ser menor que a do óleo. Conforme mostrado anteriormente, a diferença na concentração do iniciador nas reações R8 e R9 não parece exercer influência sobre a conversão.

Nas reações seguintes, para um melhor mapeamento da conversão, foram coletadas amostras em intervalos de amostragem menores nos instantes de 5, 10, 15, 20

e 30 minutos. Em seguida, continuou-se coletando amostras de meia em meia hora. O tempo de reação foi aumentado para 300 minutos e a temperatura foi aumentada para 90°C, objetivando garantir a conversão próxima de 100%. Os resultados são apresentados na Figura 20.

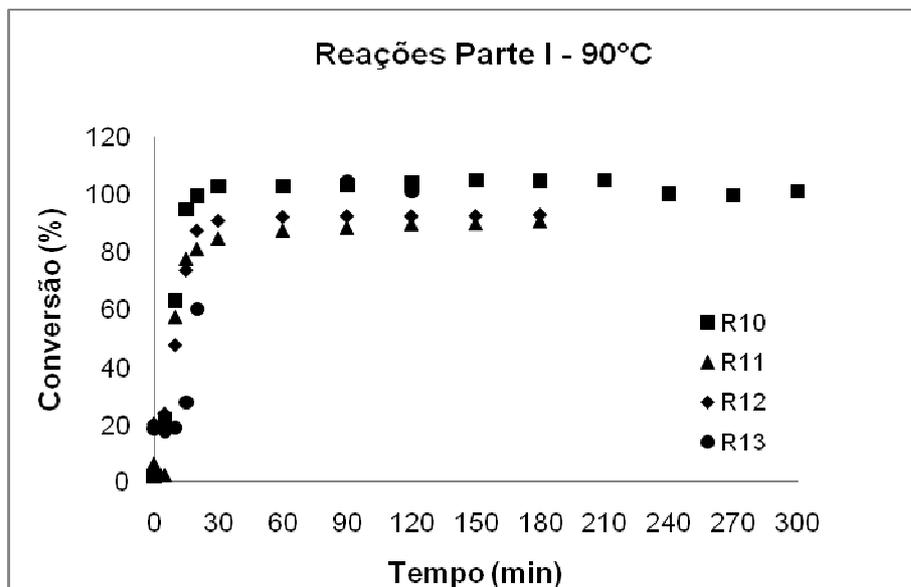


Figura 20 - Conversão das reações conduzidas a 90°C. (R10) MMA:óleo (70:30) com 6 g de PZQ; (R11) MMA:óleo (70:30) sem PZQ; (R12) MMA com 15 g de PZQ; (R13) MMA com 12 g de PZQ.

Nas reações conduzidas a 90°C não se observou a influência significativa do óleo sobre a cinética de polimerização. Isso pode ser confirmado quando se comparam as curvas de conversão das amostras R10, com óleo, e R13, sem óleo. A presença do PZQ também não acometeu nenhum impacto significativo, pois R11, que é um branco, apresenta comportamento similar ao das demais. Todas as reações atingiram o platô de conversão em 30 minutos de reação. Em função desse resultado, o tempo de reação foi reduzido novamente para 180 minutos e posteriormente para 120 minutos.

A carga de PZQ adicionada ao meio foi reduzida de 15 para 12 g porque nem todo o PZQ foi encapsulado, quando 15 g de fármaco foram adicionadas. Essa observação foi feita visualmente, muitos cristais ficaram espalhados na emulsão. Apesar da concentração de saturação de PZQ no MMA, a 80°C, ser de 255 mg/mL

(aproximadamente 17g), a dispersão inicial é feita a frio e não necessariamente consegue-se dissolver todo o fármaco durante o processo de polimerização.

5.2.1.2. Ultra-turrax e homogeneizador de alta pressão - Efeito do equipamento utilizado para a emulsificação

Os látices obtidos com o ultra-turrax, tanto para o MMA quanto para o AV, após 12 horas resultaram em separação de fases. Nas amostras de AV preparadas no homogeneizador, a divisão de fases foi iniciada por volta de dois dias. Entretanto, as reações com MMA apresentaram uma estabilidade de 8 meses; ou seja, matinham-se homogêneas para todas as condições e receitas testadas. As emulsões foram armazenadas em frasco de vidro âmbar, dentro de um armário ao abrigo de luz.

As emulsões obtidas foram posteriormente separadas e secas para obtenção das nanopartículas. Várias técnicas foram testadas. As emulsões de PMMA foram facilmente quebradas: com o uso de um não solvente, etanol, na proporção de 15% de álcool para 85% de emulsão, seguido de centrifugação direta a 5000 rpm e posterior secagem no liofilizador; por centrifugação direta a 20000 rpm; e secagem; por liofilização direta da emulsão e pela técnica de spray dryer. Os mesmos protocolos realizados para o látex de PMMA foram aplicados ao sistema de PAV, mas sem sucesso. Uma separação completa das fases não foi obtida e também não se conseguiu obter as nanopartículas secas com nenhum dos métodos empregados. Portanto, do ponto de vista de secagem, as emulsões de PMMA são mais fáceis de manipular.

5.2.2. ESTABILIDADE DAS GOTÍCULAS

Após a definição das condições de reação, foi verificada a estabilidade das gotículas formadas durante o processo de emulsificação. O objetivo foi verificar quanto tempo as gotículas formadas durante o processo de miniemulsão poderiam permanecer estáveis; ou seja, manter o tamanho, sem ocorrer coalescência de forma pronunciada, antes da introdução no reator e início da reação de polimerização.

Foram preparadas duas miniemulsões de MMA seguindo exatamente a mesma receita das reações R10 e R13, sendo que esta última usou apenas 6 g de PZQ. Essas reações foram escolhidas por apresentarem quantidades distintas de óleo. Dessa forma, a única diferença entre ambas era a presença do óleo. Os resultados estão apresentados abaixo na Figura 21.

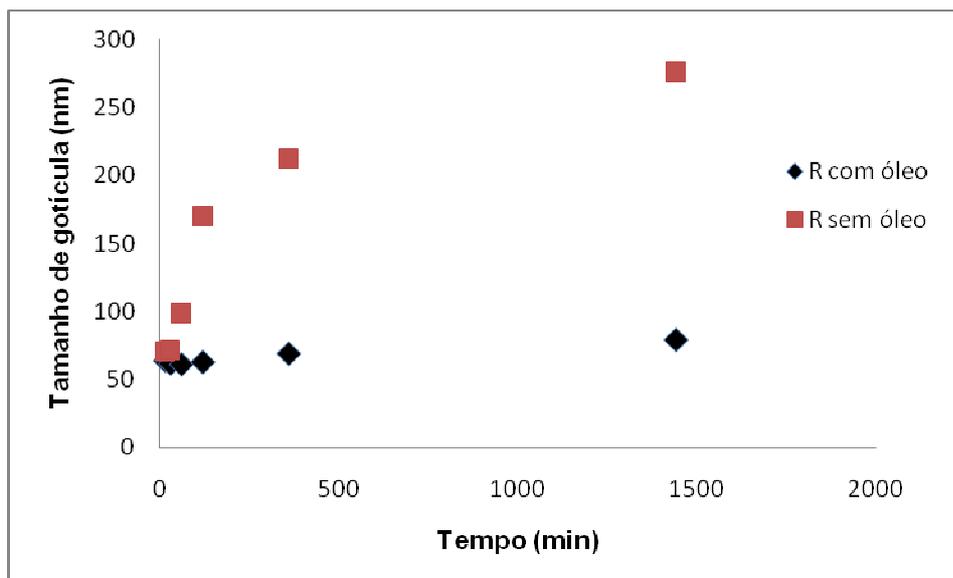


Figura 21 - Evolução do tamanho das gotículas das emulsões de MMA ao longo do tempo, na presença e ausência de óleo.

Como pode ser observado na Figura 21, a emulsão que continha óleo apresentou uma boa estabilidade por 24 horas. Em contrapartida, a emulsão que não possuía óleo não apresentou coalescência pronunciada até 30 minutos, mas apresentou crescimento contínuo de tamanhos nas 24 horas posteriores (embora sem causar separação de fases). Isso não chega a constituir um problema, uma vez que as emulsões obtidas do homogeneizador são colocadas imediatamente no reator após o preparo para a etapa de polimerização. Esses resultados garantem a manipulação das emulsões na unidade industrial.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS - PARTE I (RECEITA I)

5.3.1. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE PARTÍCULA

O estudo de sistemas particulados exige a caracterização da distribuição de tamanhos de partícula, pois esta propriedade é essencial para as operações de produção e processamento dos materiais. De forma geral, deseja-se que as nanopartículas obtidas apresentem distribuição unimodal, com baixo índice de polidispersão (LANGER *et al.*, 1996; GOVENDER *et al.*, 1999; AVGOUSTAKIS *et al.*, 2002). Entretanto, nem sempre isso é alcançado. As amostras obtidas no ultra-turrax, R3 e R4, apresentaram uma ampla faixa de tamanhos de partícula, com uma distribuição bimodal, como mostrado nas Figuras 22 e 23. A metodologia aplicada foi considerada satisfatória, pois as réplicas (análises em triplicata) foram reprodutíveis. As amostras do homogeneizador, R5 a R13, apresentaram uma distribuição unimodal com uma faixa de distribuição granulométrica mais estreita, ao contrário das amostras obtidas no ultra-turrax. Essas amostras também demonstraram um índice de polidispersão mais baixo que as amostras do ultra-turrax. Além disso, as partículas preparadas no homogeneizador apresentaram tamanhos significativamente menores. Todos os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultado da distribuição de tamanho das nanopartículas obtidas em diferentes reações

Amostras (n=3)	Tamanho médio (nm)	PdI*
R3 ^a	685,05	0,599
R4 ^a	557,47	0,619
R5 ^b	59,75	0,213
R6 ^a	67,63	0,250
R7 ^b	60,23	0,342
R8 ^b	67,95	0,197
R9 ^b	60,46	0,188
R12 ^b	55,47	0,243
R13 ^b	54,53	0,118

*PdI - Índice de polidispersão; ^aReações no ultra-turrax; ^bReações o homogeneizador .

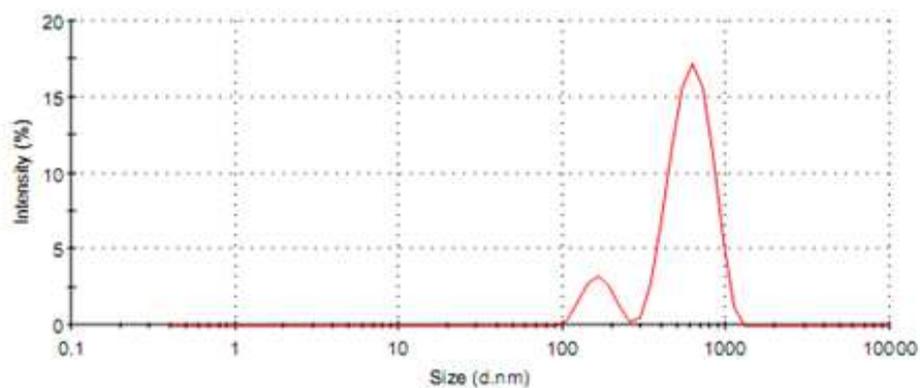


Figura 22 – Distribuição de tamanhos de partícula da amostra R3 (Ultra-turrax) medido por DLS.

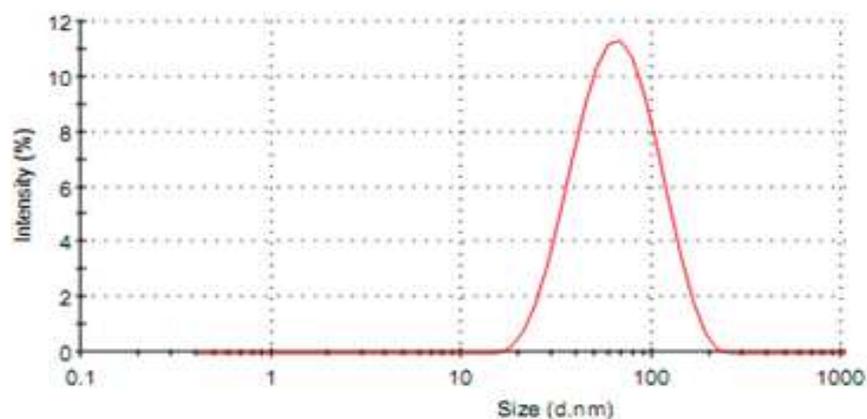


Figura 23 – Distribuição de tamanhos de partícula da amostra R5 (Homogeneizador) medido por DLS.

A Figura 23 apresenta um resíduo na faixa de aproximadamente 6 μm . Leituras da água pura apresentaram esse sinal.

De acordo com os resultados obtidos, o modo de preparo das nanopartículas interfere diretamente no diâmetro final das mesmas. Segundo a literatura, a natureza do óleo influencia o diâmetro das partículas devido às diferenças de viscosidade e tensão interfacial (YU *et al.*, 1993; MOSQUEIRA *et al.*, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Entretanto, as amostras preparadas no homogeneizador com ou sem óleo não apresentaram diferenças significativas na distribuição de tamanhos de partícula. O aumento da quantidade de PZQ de 3 g para 10 – 15 g inserida nas reações R8 a R13 (R8 -70:30 MMA:óleo com 10g de PZQ a 80°C; R9 - 70:30 MMA:óleo com 6g de PZQ a

80°C; R10 - 70:30 MMA:óleo com 6g de PZQ a 90°C; R11 - 70:30 MMA:óleo sem PZQ a 90°C; R12 - MMA com 15g de PZQ a 90°C; R13 - MMA com 12g de PZQ a 90°C) também não alterou a distribuição de tamanhos de partícula (68 e 55 nm), quando comparada com a reação R6 com 3 g de PZQ (68 nm). As reações R9 e R13, conduzidas com 0,6 g de iniciador, ou seja, com dobro da concentração em relação as demais, não apresentaram alteração de distribuição de tamanhos significativa. LANGER *et al.* (1996) demonstrou que o aumento de iniciador no meio reacional não deve alterar a distribuição granulométrica conforme observado também neste trabalho. Portanto as distribuições de tamanho são controladas pelo método de preparo da miniemulsão.

A análise de tamanhos de partícula também permite avaliar a tendência à agregação das nanopartículas dispersas em uma emulsão em função do tempo, sendo uma ferramenta importante para análise de estabilidade. As análises foram realizadas após o preparo e depois de 3 meses de armazenamento, sem que nenhuma alteração nos resultados pudesse ser detectada. Os látices foram armazenados em pequenos frascos de vidro âmbar. Assim, as emulsões preparadas podem ser consideradas estáveis.

O tamanho das nanopartículas obtido com o homogeneizador, a princípio, foi satisfatório para a proposta do trabalho, uma vez que era desejado partículas inferiores a 300 nm. Já as partículas formadas no ultra-turrax apresentaram uma distribuição granulométrica muito ampla, não sendo considerada adequada. Conforme demonstrado por DURRER E IRACHE (1994) e HUSSAIN *et al.* (2001), partículas com diâmetros diferenciados causam uma liberação / absorção não uniformes no trato gastro-intestinal, o que não é desejado.

5.3.2. pH

O acompanhamento do pH em função do tempo gera informações relevantes sobre a estabilidade das emulsões (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A alteração de pH pode também indicar a degradação do polímero. LOPES *et al.* (2000) demonstraram que a diminuição do pH em uma emulsão de nanocápsulas de poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila), após 45 dias de preparo, foi atribuída, dentre outros fatores, à dissociação dos grupos carboxílicos do polímero.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 13, observa-se um decaimento do pH em função do tempo nas emulsões R3 a R9, formadas nas temperaturas de 60 e 80°C. Como essas reações não resultaram em conversão de 100%, é possível que esteja ocorrendo a formação de espécies ácidas provenientes de degradação do MMA não reagido. Acredita-se que o monômero que não reagiu possa formar o ácido carboxílico em meio aquoso por hidrólise, conforme ilustrado na Figura 24. As reações R10 e R13, que foram realizadas a 90°C e resultaram em 100% de conversão, não apresentaram esse decaimento de pH, corroborando a hipótese proposta. No entanto é conveniente observar que os valores finais de pH são sempre muito próximos, de maneira que o pH baixo pode provavelmente ser relacionado à ausência de monômero residual.

Tabela 13 – Resultados de pH nos tempos zero, 1 e 3 meses.

Amostras (Látex)	pH		
	Inicial	1 mês	3 meses
R3	6,00	4,28	4,30
R4	6,58	4,57	4,59
R5	6,35	4,31	4,39
R6	6,58	4,81	4,81
R7	*	5,08	5,08
R8	*	4,68	4,64
R9	*	4,24	4,30
R10	4,50	4,32	4,35
R13	4,10	4,03	4,03

* Ausência de resultado

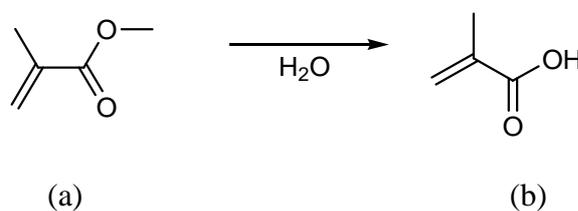


Figura 24 – Mecanismo proposto para o decaimento do pH. Hidrólise do metacrilato de metila (a) com formação de ácido metacrílico (b).

Para confirmar ocorrência de reação de hidrólise na fase aquosa, mediu-se o pH da água pura, pH 7,0. Em seguida, adicionou-se o monômero MMA e o pH passou de 7,0 a 4,4, em minutos, resultado esse que ajuda a confirmar a hipótese proposta.

5.3.3. ENCAPSULAMENTO DO PZQ

A quantidade de PZQ nas nanopartículas foi medida por cromatografia líquida, por padronização externa. Os resultados estão apresentados na Tabela 14. Nesta etapa, em todas as reações foram empregadas 3 g de PZQ por g de monômero.

Tabela 14 – Eficiência de encapsulamento (%) de PZQ nas nanopartículas em relação à quantidade adicionada.

Amostras (n=3)	Encapsulamento (%) (Média ± IC*)
R3	71,8 ± 1,6
R3 ¹	35,1 ± 1,8
R4	92,0 ± 3,0
R4 ¹	26,4 ± 2,8
R5	100,0 ± 1,6
R6	100,2 ± 5,4
R6 ¹	71,0 ± 3,8
R7	80,6 ± 0,6
R8	80,1 ± 7,8
R9	80,0 ± 0,4
R10	86,1 ± 7,6
R12	99,5 ± 1,8
R13	92,3 ± 1,6

¹ Amostras extraídas com etanol e secas posteriormente no liofilizador; *IC = intervalo de confiança.

Observa-se na Tabela 14 que a eficiência de encapsulamento oscila ao redor de 80% da quantidade inserida de PZQ nas reações. As amostras (R3¹, R4¹ e R6¹), obtidas após a quebra da emulsão com etanol, apresentaram um teor de encapsulamento mais baixo, quando comparadas com as amostras secas diretamente no liofilizador. Dessa forma, conclui-se que o etanol pode também promover a extração do PZQ presente nas nanopartículas. Por isso, essa opção de separação das partículas foi descartada. O efeito do etanol pode ser também percebido quando se comparam as amostras R6 e R6¹,

produzidas no homogeneizador. O resultado observado dentre as reações realizadas a 60°C é que as amostras obtidas no homogeneizador, R5 e R6, apresentaram uma taxa de encapsulamento do PZQ significativamente maior (ambas de 100%), quando comparadas com as obtidas no ultra-turrax, R3 e R4 (71 e 92% respectivamente). Isso sugere que há uma maior transferência de massa da fase apolar para a água, devido à turbulência do processo de emulsificação quando se utiliza o ultra-turrax.

Visando à preparação de uma suspensão ou pó para suspensão de 60 a 120 mg/mL de PZQ, é interessante aumentar a concentração do fármaco nas nanopartículas. Com esse objetivo, e baseando-se no estudo de solubilidade, foram realizadas reações com 10 e 6 g (R8 e R9) de PZQ a 80°C. As eficiências de encapsulamento encontradas estão apresentadas na Tabela 14. Em todas as reações realizadas a 80°C, independentemente da quantidade adicionada de fármaco, o teor encontrado, em valor percentual foi de 80%. Isso demonstra que um aumento do teor de PZQ na emulsão inicial resulta em aumento do teor de PZQ no produto final, com eficiência de 80%. A perda de PZQ parece que ocorre durante a reação, pois o aumento da temperatura de reação resulta em aumento da eficiência de encapsulamento.

As reações realizadas a 90°C apresentam uma maior eficiência na taxa de encapsulamento do fármaco, com resultados variando de 86 a 99%. R12 foi a que apresentou o melhor resultado, 99%, e foi a que recebeu maior quantidade de PZQ, 15 g, contra 6 e 12 g de R10 e R13. R13 que levou 12 g de PZQ apresentou teor maior (92%) que R10 com 6g de PZQ (86%). Esses resultados concordam com outros trabalhos da literatura, em que se tentou encapsular o PZQ em diferentes sistemas nano e microencapsulados, com eficiência de 70 a 88%. Em todos os trabalhos, a quantidade de PZQ adicionada variou de 7 a 30% em relação à massa do polímero (BECKET *et al.*, 1999; MAINARDES *et al.*, 2005; MAINARDES *et al.*, 2006; MARAGOS *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados apresentados conclui-se que o PZQ está sendo encapsulado. Entretanto, a eficiência nem sempre é muito alta. Em um primeiro momento, acreditou-se que, em função da baixa conversão, uma parte do PZQ dissolvido no monômero estava sendo retirada pelo processo de liofilização. Assim dissolveu-se uma massa conhecida de PZQ no MMA. Essa mistura foi congelada e levada ao liofilizador. A massa recuperada foi de 99,3% demonstrando que não há perda do fármaco no processo de secagem, como era esperado. Nas análises no HPLC também

não foi notada nenhuma alteração no cromatograma que indicasse a presença de algum produto de degradação do PZQ, que explicasse o fato de não encontrarmos 100% de fármaco no meio. Portanto parece razoável admitir que o PZQ não encapsulado é perdido na fase aquosa ou nos processos de separação e purificação do produto final.

5.3.4. INTERAÇÃO FÁRMACO-POLÍMERO

A interação fármaco-polímero foi avaliada por DSC, conforme apresentado em outros trabalhos na literatura (GAMISANS *et al.*, 1999; MAINARDES *et al.*, 2006). Os resultados estão expostos nas Figuras 25 e 26. De acordo com os resultados de DSC, pode-se evidenciar na curva do PZQ o pico característico da transição endotérmica (fusão) em aproximadamente 143°C, o que está de acordo com a literatura (DE LA TORRE *et al.*, 1999; PASSERINI *et al.*, 2006). Esse pico é observado tanto na amostra do fármaco livre (1) quanto nas amostras de misturas físicas entre o polímero e o PZQ (5) e polímero com vaselina e fármaco (as misturas físicas foram preparadas na proporção 1:1) (6). Nas misturas físicas, a menor intensidade do pico de fusão do PZQ ocorre devido a uma menor massa do ativo presente. O abaixamento da faixa de fusão (deslocamento para a esquerda) e o alargamento do pico de fusão do PZQ na mistura é esperado, pois nesse sistema o PMMA se comporta como um diluente. Esse fato é evidenciado quando se faz a comparação entre as entalpias de fusão, do PZQ puro ($\Delta H_f = 51,12$ J/g) com o resultado experimental obtido com a mistura física ($\Delta H_f = 52,00$ J/g), conforme apresentado na Figura 27. Esse resultado comprova que não há interação química do PZQ com o polímero PMMA na mistura física. Nas amostras PMMA (2), PMMA com vaselina (3) e na vaselina livre não se observou nenhum evento endotérmico na faixa do PZQ.

As nanopartículas derivadas das reações em miniemulsão não apresentam a transição endotérmica característica do PZQ, demonstrando que o fármaco não está presente como uma fase cristalina distinta, mas sim como uma solução diluída na matriz polimérica. Resultados semelhantes foram encontrados por GAMISANS *et al.* (1999) ao avaliar nanoesferas contendo flubiprofen, e PASSERINI *et al.* (2006) ao analisarem micropartículas de Gelucire50/13 com PZQ. Esse resultado confirma que o PZQ está incorporado na matriz polimérica como uma solução em nanoesferas, como desejado.

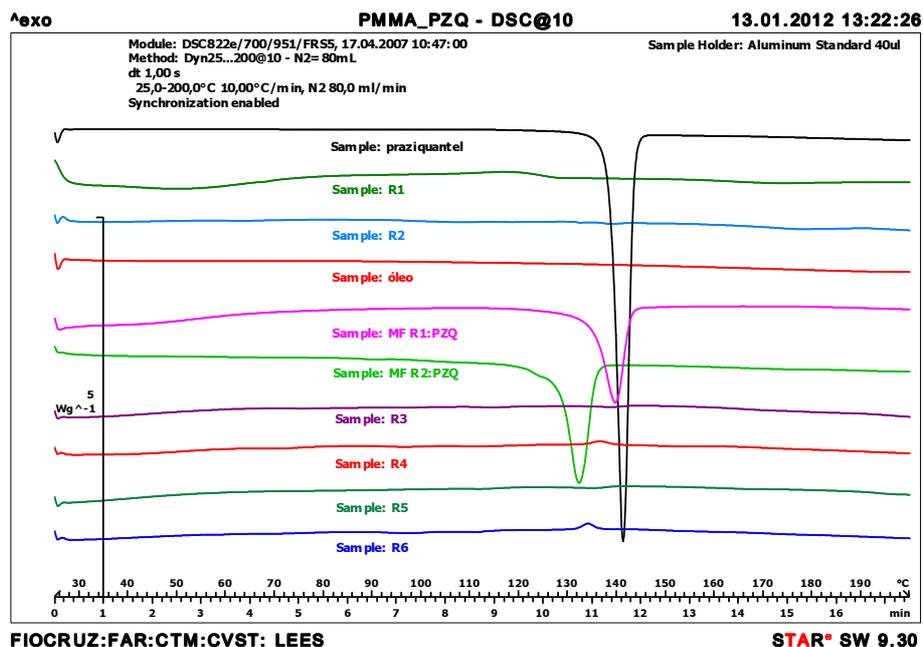


Figura 25 – Termogramas de calorimetria diferencial do PZQ, componentes isolados das nanopartículas, mistura física (MF) nanopartícula:fármaco e das nanopartículas obtidas (R1, R2, R3, R4, R5 e R6)

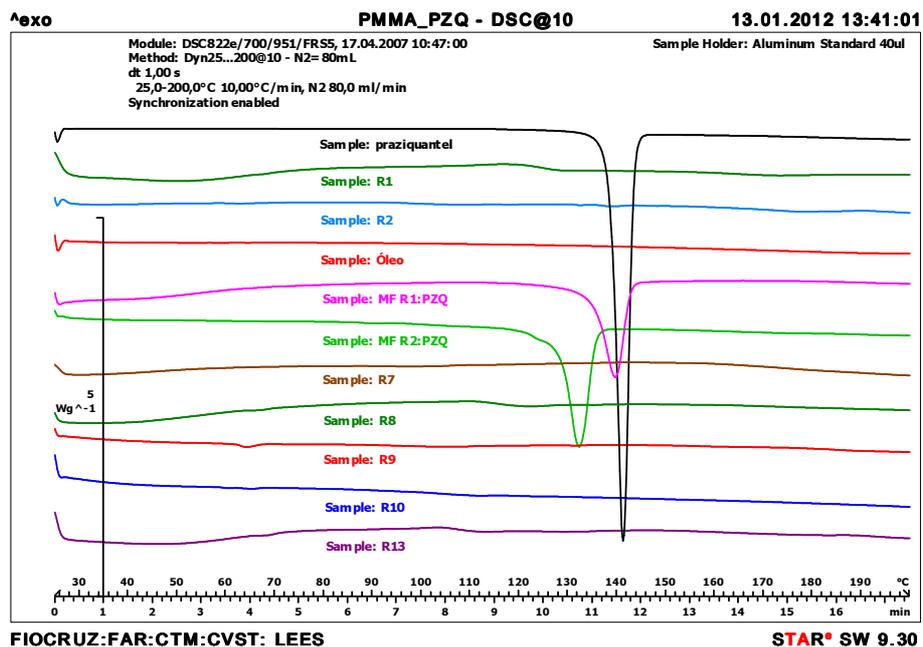


Figura 26 – Termogramas de calorimetria diferencial do PZQ, componentes isolados das nanopartículas, mistura física (MF) nanopartícula:fármaco e das nanopartículas obtidas (R7, R8, R9, R10 e R13)

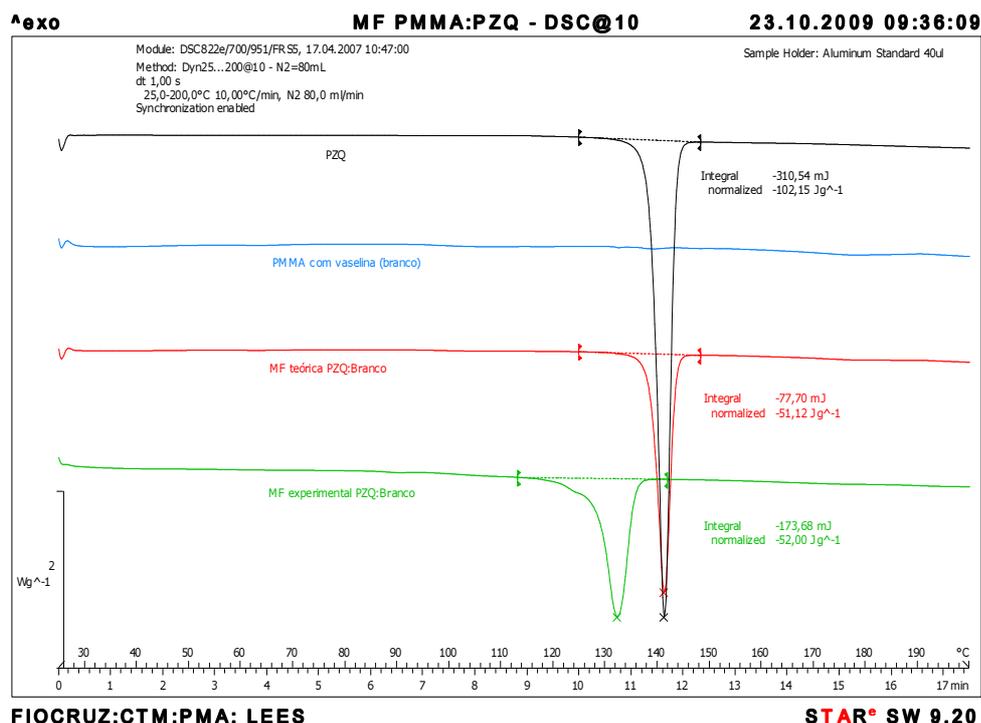


Figura 27 – Termogramas de calorimetria diferencial do PZQ, da mistura física (MF) teórica entre o PZQ e as nanopartículas sem o fármaco (R2) e da MF experimental entre o PZQ e as nanopartículas sem o ativo.

5.3.5. ESPECTROSCOPIA DE INFRA-VERMELHO

A espectrometria de infravermelho também permite avaliar a presença de interações químicas entre o fármaco e o polímero, constituindo mais uma ferramenta para a determinação da possibilidade de associação entre polímero e fármaco (GAMISANS *et al.*, 1999; KULKARNI *et al.*, 2000). As análises de infravermelho estão expostas na Figura 28.

As amostras foram preparadas com diluição em misturas com brometo de potássio, para a obtenção de um espectro adequado, com bandas bem definidas. A leitura direta das amostras ocasionava alargamento das bandas, não permitindo uma visualização apropriada do espectro. Dessa forma, foi realizada uma trituração prévia das amostras com KBr. As amostras foram inseridas e lidas na célula de reflectância difusa, sem a necessidade de se fazer pastilhas.

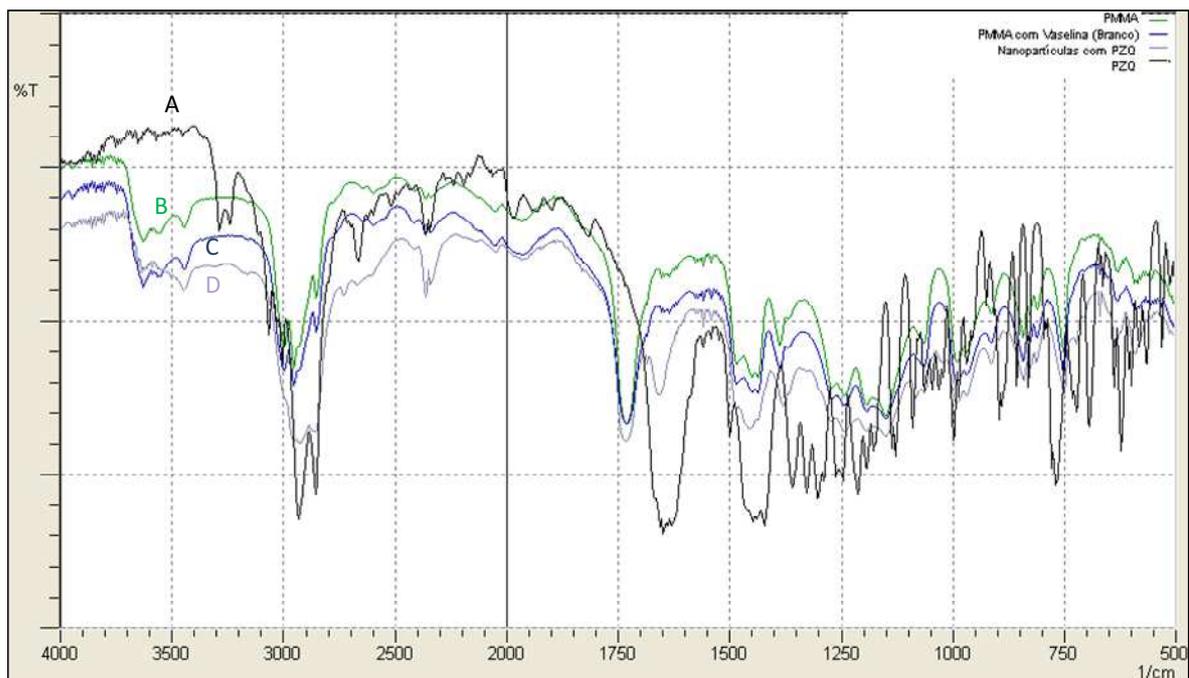


Figura 28 – Espectro de infravermelho para PZQ puro (A), PMMA puro (B); PMMA com óleo (C), nanopartículas com PZQ (D).

Conforme mostrado na Figura 28, o espectro da amostra do PZQ puro apresenta como picos principais os grupamentos funcionais da molécula: -C=O ($\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$); -C-N ($1000 - 1350 \text{ cm}^{-1}$); anel aromático ($\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$) e -CH , -CH_2 , -CH_3 ($2900\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$) (MAINARDES *et al.*, 2006). Tanto a amostra do PMMA puro quanto a do PMMA com óleo são idênticas, apresentando como picos principais: O-CH_3 ($2850\text{-}2815 \text{ cm}^{-1}$); -C=O ($1650\text{-}1790 \text{ cm}^{-1}$); -CH_3 ($1430\text{-}1470 \text{ cm}^{-1}$) (PRETSCH *et al.*, 1989). As nanopartículas com PZQ absorvem praticamente nas mesmas bandas que o polímero PMMA puro, demonstrando que a estrutura química da superfície das nanopartículas é semelhante à do PMMA. O espectro das nanopartículas de PMMA apresenta sinais do fármaco, mostrando mais uma vez a incorporação do PZQ na matriz polimérica. Assim como observado por MAINARDES *et al.* (2006), este estudo indica que não ocorreu interação molecular entre o polímero e o fármaco em questão. Junto com os resultados da análise de DSC, os espectros de IR demonstram que o fármaco está incorporado na matriz polimérica e que a incorporação não ocorre por interação química entre polímero e fármaco, o que é interessante, pois não há risco, a princípio, de perda de atividade do PZQ.

5.3.6. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma das técnicas de escolha empregadas para obtenção de informações relativas à forma, e ao tamanho de nanopartículas e micropartículas. (MOSQUEIRA *et al.*, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As micrografias obtidas pelo ensaio de MEV estão apresentadas abaixo na Figura 29.

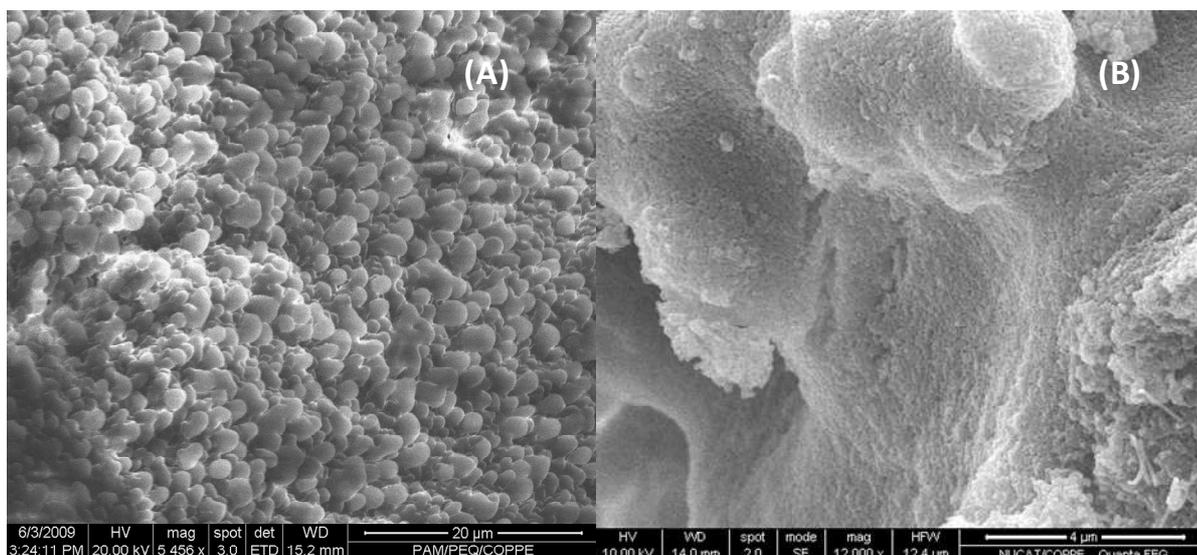


Figura 29 – Micrografia (MEV); (A) R4 (Ultra-turrax) com magnitude de aproximação de 5456 vezes; (B) R6 (Homogeneizador) com magnitude de aproximação de 12000 vezes.

Conforme pode ser observado na Figura 29, as partículas obtidas no ultra-turrax, como apresentam um diâmetro maior, foram facilmente visualizadas com uma régua de 20µm. Para as nanopartículas obtidas no homogeneizador, foi empregada uma régua de 4µm, e mesmo assim a visualização não foi boa. Isso mostra como as partículas são muito menores quando preparadas no homogeneizador.

5.3.7. PROCESSO DE SECAGEM

Conforme apresentado na seção 5.3.6., o processo de secagem por liofilização gera aglomeração das partículas, que pode afetar a liberação do fármaco e interferir em

outras propriedades de desempenho do material. Assim a técnica por spray dryer também foi empregada no trabalho para a secagem do material sólido final.

A técnica de spray dryer é bem simples e também permitiu a secagem da emulsão direta sem nenhuma etapa prévia de preparação. A aglomeração foi significativa, podendo ser visível a diferença a olho nu, conforme a Figura 30.



Figura 30 - (A) Amostra seca no liofilizador; (B) Amostra seca no spray dryer

O rendimento obtido no spray dryer (ou seja, a quantidade de nanopartículas recuperadas ao final do processo de secagem) foi muito baixo e em torno de 14%, contra 92% do liofilizador. É importante ressaltar que o baixo rendimento do spray foi em função do desenho do mesmo, que favorece a perda de grandes quantidades de material no tubo, conforme mostra a Figura 31. Contatos mantidos com fornecedores indicam problemas semelhantes em unidades industriais.

Foram realizados testes de liberação do fármaco para verificar até que ponto a aglomeração impacta na cedência do fármaco. Esses resultados estão expostos a seguir na seção 5.3.10.



Figura 31 - Foto do Spray Dryer. A seta indica o local onde há grande perda de material durante o processo de secagem.

5.3.8. MONÔMERO RESIDUAL

Os monômeros podem ser tóxicos à saúde. Como o alvo do trabalho é a produção de um medicamento, é importante quantificar o monômero residual nas nanopartículas. Os resultados obtidos por cromatografia a gás estão apresentados na Tabela 15. Um cromatograma típico da análise de monomêro residual está exposto na Figura 32.

Tabela 15 – Percentual de monômero residual encontrado nas nanopartículas

Método de Emulsificação	Amostras	Monômero Residual (ppb)
Ultra Turrax	R3	0,7
	R4	2,2
Homogeneizador	R5	0,0
	R6	0,0

De acordo com a Tabela 15 observa-se que o processo de secagem por liofilização é bastante eficaz para a retirada do monômero residual, uma vez que é praticamente observada a ausência de monômero. As amostras apresentadas possuem uma conversão de aproximadamente 50% conforme demonstrado anteriormente. Dessa forma, apesar de a quantidade de monômero que não reagiu ser grande, o monômero é removido quase que completamente durante o processo de secagem. As amostras que utilizaram o homogeneizador de alta pressão não apresentaram resíduos de monômero, ao contrário do ultra-turrax, demonstrando uma vez mais uma diferença entre as técnicas e a vantagem comparativa do uso do homogeneizador.

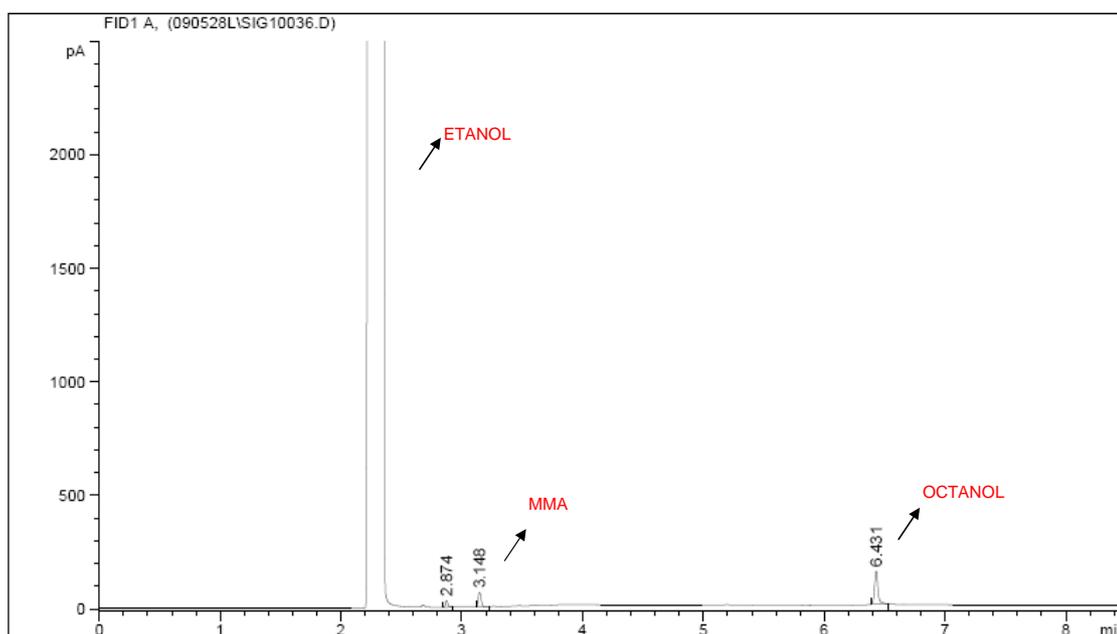


Figura 32 - Cromatograma do doseamento de monômero residual por CG.

Não há na literatura parâmetro algum estipulando a máxima quantidade de monômero residual admissível, no caso o MMA, que pode ser encontrado no PMMA para aplicações biomédicas. Dessa forma, foi empregada a especificação para solventes residuais que podem ser obtidos em fármacos e medicamentos. Os compêndios oficiais vigentes no Brasil classificam os solventes em três classes: 1, 2 e 3. A classe 1 é a mais maléfica à saúde, englobando solventes de alta toxicidade com elevado potencial carcinogênico, como o benzeno. A classe 2 contempla solventes de toxicidade média, mas que podem gerar danos irreversíveis ao organismo como o metanol. Por fim, a classe 3 é constituída por solventes que apresentam toxicidade baixa, como a acetona. Dentre os solventes classe 1, o benzeno é o mais crítico da lista, podendo estar presente

em até 2 ppm em fármacos. O menos crítico é o 1,1- dicloroetano, que pode existir em até 8 ppm. Na classe 2, o limite varia mais, de 50 ppm (metilbutilcetona) a 3880 ppm (cicloexano) (USP 31, 2008c). De acordo com os resultados e com as especificações vigentes, fica evidenciado que as concentrações de monômero residual encontradas são muito baixas, na ordem de ppb, não sendo assim críticas para a aplicação pretendida. Conclui-se, então, que em relação ao monômero residual, as nanopartículas podem ser empregadas em formulações farmacêuticas para uso em humanos.

5.3.9. DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES DO POLÍMERO

A determinação da distribuição de massas molares permite obter informações sobre o processo de polimerização, a ocorrência de reações químicas entre o polímero e o fármaco e a degradação do polímero ao longo do tempo (FRESTA *et al.*, 1995; SEIJO *et al.*; GUTERRES *et al.*, 1995; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os resultados estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados das massas molares médias do PMMA

Amostras	Massa Molar		IP*
	Mn x 10 ³ (g/mol)	Mw x 10 ³ (g/mol)	
R1	167,98	452,98	2,3
R2	161,73	418,75	2,5
R3	97,08	222,52	2,1
R4	129,47	329,1	2,1
R5	134,88	289,39	1,9
R6	140,28	302,42	2,2
R7	80,49	211,15	2,7
R8	47,28	89,98	2,6
R10	50,75	177,74	2,0
R13	57,74	134,61	2,2

Na Tabela 16 estão apresentados os valores médios de Mn (massa molar numérica média), o Mw (massa molar ponderal média) e o IP (índice de polidispersão), que está relacionado com a largura da curva de distribuição. O Mn está relacionado com as propriedades osmóticas do polímero, enquanto o Mw está relacionado com as propriedades mecânicas. Sistemas com estreito índice de polidispersão apresentam

moléculas com massas molares semelhantes (LUCAS *et al.*, 2001). A análise do GPC está representada na Figura 33.

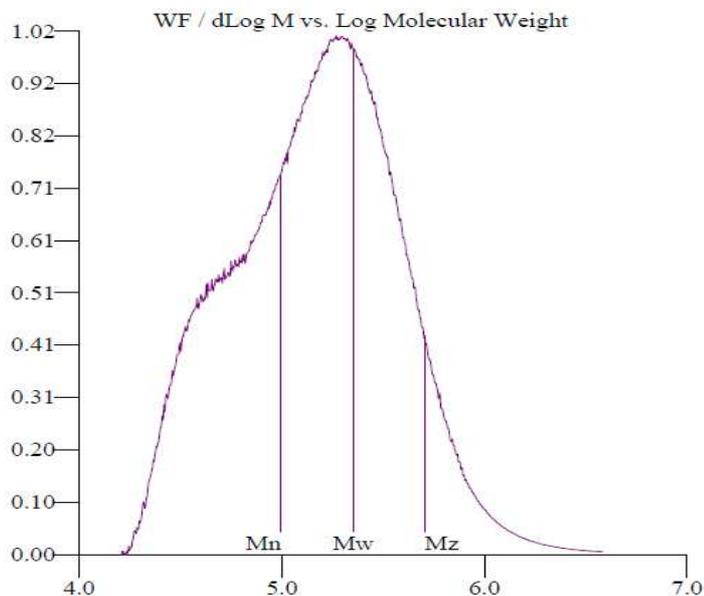


Figura 33 - Distribuição das massas molares do PMMA, reação R3

De acordo com a Tabela 16, pode-se observar que as reações realizadas a 80 e 90°C (R7, R8, R10 e R13) apresentam valores de Mn e Mw menores, quando comparados com os valores obtido nas reações realizadas a 60°C. Isso mostra que as maiores temperaturas favorecem as reações de transferência de cadeia. As amostras dos polímeros sem a presença do fármaco (R1 e R2) apresentaram valores maiores de Mw, demonstrando que o PZQ, componente externo, de alguma forma reduz o Mw, atuando possivelmente como um agente de transferência de cadeia (OLIVEIRA *et al.*, 2011). As amostras R10 e R13, produzidas com 0,6 g de iniciador (ou seja o dobro da concentração empregada nas demais reações apresentadas), causaram a redução da massa molar do polímero, conforme demonstrado por LANGER *et al.* (1996) e coperado pela teoria clássica de sistemas em emulsão. Todos os índices de polidispersão flutuaram em torno do valor teórico de 2,0, indicando que as distribuições de massas molares são do tipo Flory, como esperado pela teoria clássica (LENZI, 2002). Os resultados parecem indicar que as massas molares são controladas mais pelas condições de reação do que pela presença do PZQ.

5.3.10. LIBERAÇÃO DO FÁRMACO DA MATRIZ POLIMÉRICA - ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

Os ensaios de dissolução foram realizados apenas com alguns produtos das reações secas da primeira etapa: R7, R9, R10 e R13. Inicialmente, o teste de perfil de dissolução foi realizado apenas nas condições preconizadas nos compêndios oficiais ou seja com meio de dissolução pH 1,2, mimetizando as condições gástricas. As primeiras reações a serem comparadas foram R7 com R9, cuja a diferença principal é a presença de óleo na receita, as condições de reação foram as mesmas para ambas. Os resultados estão apresentados na Figura 34.

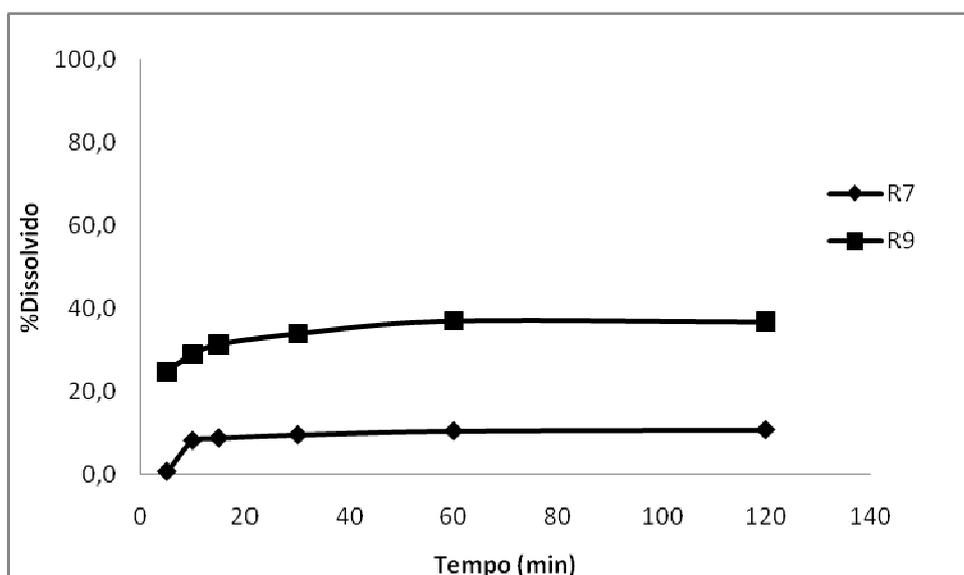


Figura 34 - Perfis de dissolução de R7 e R9 em meio pH1,2

Conforme apresentado na Figura 34, os resultados de dissolução são muito baixos, indicando a baixa liberação do fármaco. Entretanto, é notório que a presença do óleo auxilia a cedência do fármaco da nanosestrutura, provavelmente porque mantém a estrutura do polímero mais porosa. Mesmo com esse incremento, os resultados são considerados insatisfatórios, uma vez que a aplicação das nanopartículas deve resultar na liberação em torno de 70% do fármaco dissolvido em 60 minutos (Brasil, 2010). Como ainda não é sabido se vai ocorrer permeação na parede intestinal das nanopartículas com PZQ, ou não, é importante garantir uma boa liberação no trato gastrointestinal.

As reações R10 e R13 realizadas a 90°C foram também analisadas quanto à dissolução. Os resultados estão na Figura 35. A dissolução de comprimidos de PZQ, já existentes no mercado na dose de 600 mg, também foi realizada com o objetivo de ser uma referência para comparar com o desempenho das nanopartículas.

O aumento da temperatura no meio reacional proporcionou uma maior liberação do fármaco a partir da matriz polimérica, R10 apresentou 75% dissolvido em 60 minutos, enquanto R13 apresentou 61% contra 10% de R7 e 37% de R9. Os comprimidos de PZQ apresentaram uma taxa de dissolução bem superior à das nanopartículas, de 86% em 60 minutos, mostrando que a liberação do fármaco, a partir da matriz polimérica, deve ser otimizada.

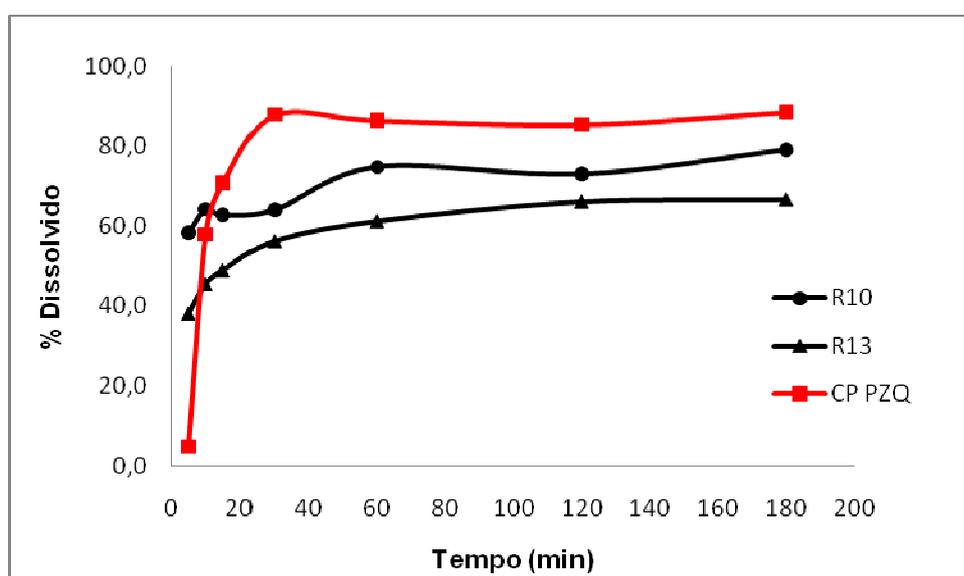


Figura 35 - Perfis de dissolução do PZQ dos produtos obtidos de R10 e R13 e dos comprimidos em meio pH 1,2.

Diante dos resultados, pode-se observar que há uma estagnação do processo de liberação do fármaco após 1 hora de ensaio. O aumento na taxa de dissolução, após esse tempo, é de no máximo 5%. Portanto, uma fração do PZQ permanece aprisionada no interior da partícula.

Foi verificado posteriormente que no pH equivalente às demais porções do trato gastrointestinal poderia haver uma maior taxa de dissolução. Assim, o ensaio de dissolução foi realizado também nos pHs de 4,5; 5,5 e 6,8, que são os pHs relevantes do

trato gastro intestinal. Verificou-se ainda a solubilidade do PZQ nesses meios de dissolução, como objetivo de verificar se uma eventual variação da taxa de dissolução seria em função da solubilidade do fármaco ou da interação da matriz polimérica com o pH. Conforme mostrado na Figura 36, é evidente que não há diferença significativa de solubilidade do PZQ nos meios propostos como função do pH.

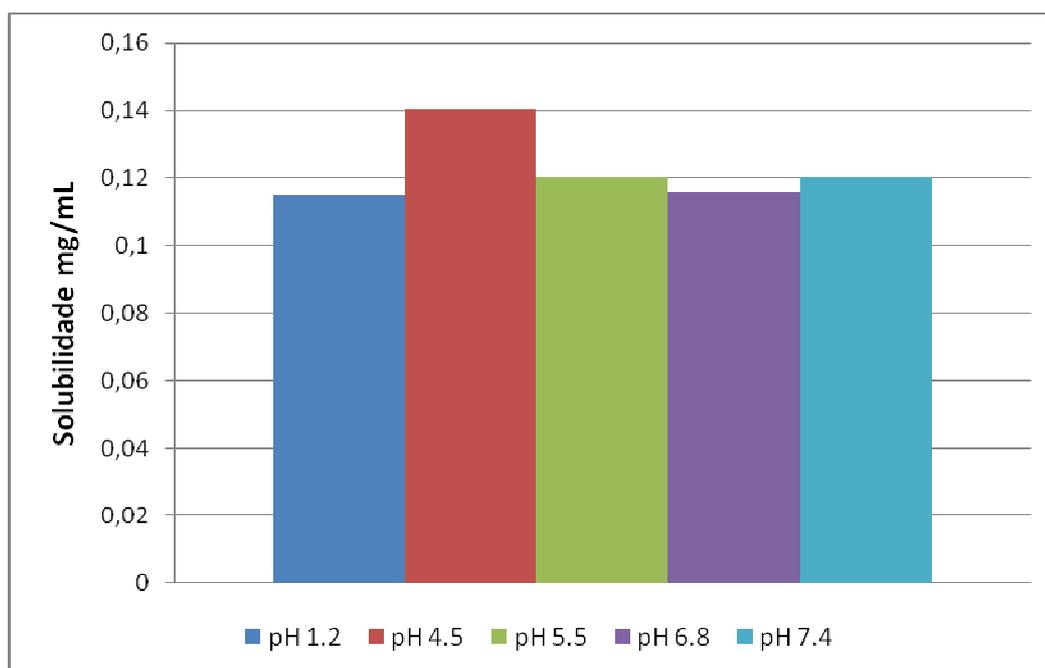


Figura 36 - Solubilidade do PZQ em meios de dissolução com diferentes pHs a 37°C.

As Figuras 37, 38 e 39, mostram os perfis de dissolução em diferentes condições de pH 4,5; 5,5 e 6,8.

Os resultados mostram que não há uma diferença significativa dos perfis de dissolução, por conta da mudança de pH do meio de dissolução para R13. R10, observou-se uma liberação de 74,8% em 60 minutos em pH 1,2, e queda pronunciada de liberação para 33,0% nos demais pHs. Para os comprimidos de PZQ a liberação passou de 86,5% em 60 minutos em pH1,2 para 100% nos demais pHs testados, mostrando que matrizes diferentes influenciam a liberação do ativo.

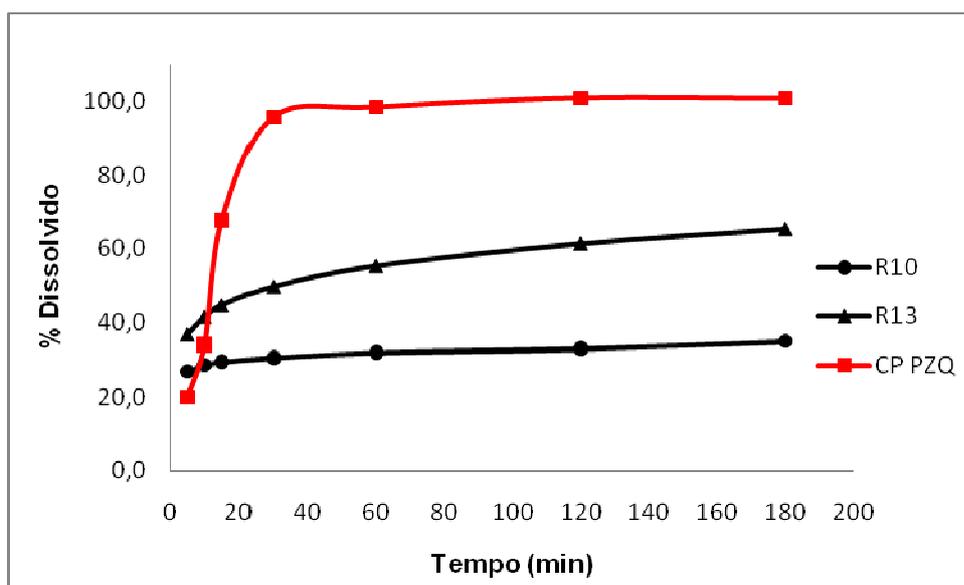


Figura 37 - Perfis de dissolução do PZQ de R10 e R13 e dos comprimidos em meio pH 4,5.

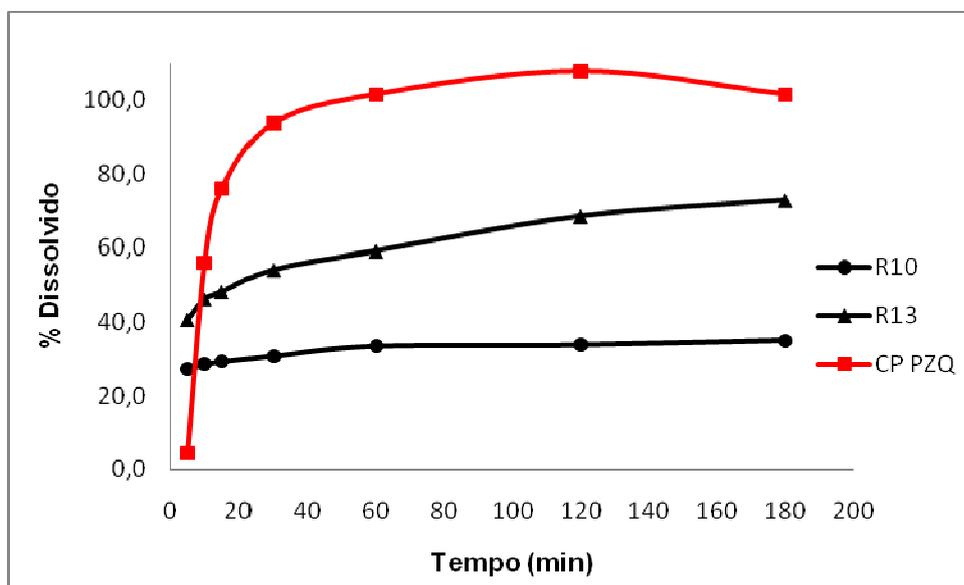


Figura 38 - Perfis de dissolução do PZQ de R10 e R13 e dos comprimidos em meio pH 5,5.

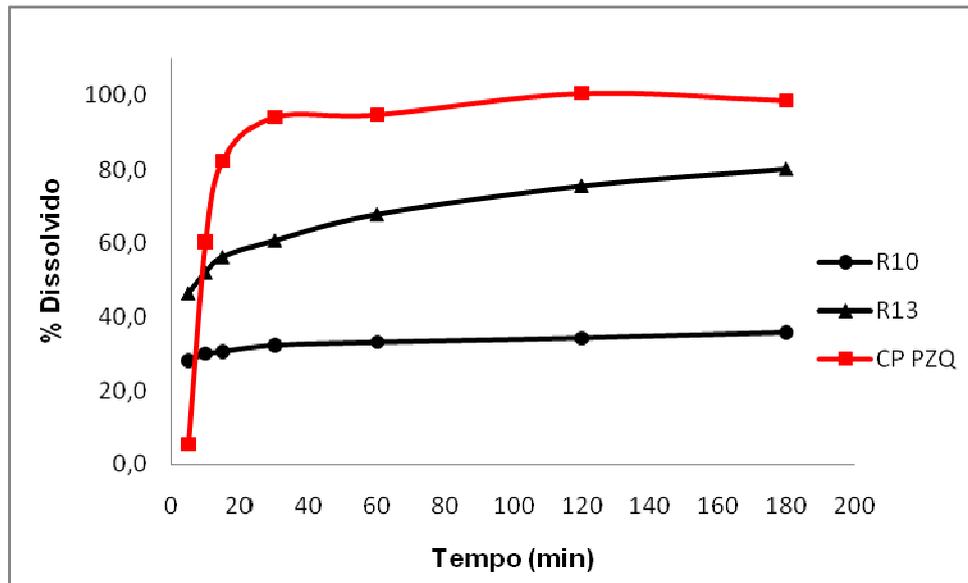


Figura 39 - Perfis de dissolução do PZQ de R10 e R13 e dos comprimidos em meio pH 6,8.

Conforme mencionado anteriormente, foram testadas técnicas de secagem por *sparry dryer* e por liofilização. Essa última gerava grande agregação nas partículas, que foi comprovada pelas análises de MEV. Para verificar o impacto da agregação na cinética de liberação do fármaco a partir da matriz polimérica, dividiu-se o volume do látex ao meio referente à reação R13, e cada porção foi seca por uma das técnicas. Em seguida, submeteu-se cada uma das partes ao processo de dissolução. Os resultados estão apresentados na Figura 40.

Observa-se alteração desprezível no resultado do teste de liberação, mostrando que a agregação gerada durante a liofilização não é crítica para o desempenho do material produzido.

A Figura 40 mostra também a formação do platô de liberação a partir de 15 minutos.

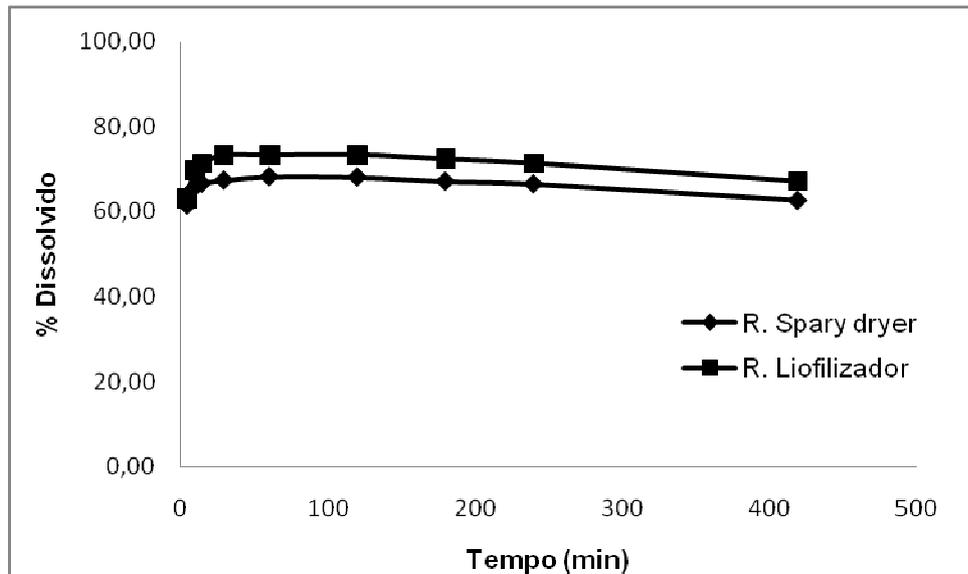


Figura 40 - Perfil de dissolução da amostra R13 seca pelas duas técnicas, *spray dryer* e liofilização.

5.3.11. RESULTADOS PRELIMINARES - PARTE I

A primeira parte do trabalho foi fundamental para caracterizar a viabilidade do projeto. Muitas oportunidades de otimizações foram identificadas. As principais conclusões da primeira parte do trabalho podem ser resumidas na forma:

- O praziquantel é solúvel nos monômeros e suporta altas temperaturas de polimerização, dessa forma, o mesmo é adequado à proposta do trabalho.
- No preparo das miniemulsões, foram empregados os equipamentos ultra-turrax e homogeneizador de alta pressão. O desempenho obtido nos ensaios com o homogeneizador de alta pressão pode ser considerado superior ao obtido no ultra-turrax, resultando em emulsões mais estáveis, formação de nanopartículas (diâmetro médio menor que 100 nm) com distribuição mais homogênea, maior incorporação do PZQ e ausência de monômeros residuais após a secagem.
- As reações que levaram óleo mostraram que a proporção de monômero : óleo (70:30) foi a mais adequada gerando partículas de maior resistência mecânica.
- As reações realizadas a 90°C apresentaram conversão de aproximadamente 100%, com pronunciado efeito gel.

- O processo de secagem para as emulsões de PMMA por liofilização foi eficaz. Mesmo para as reações com conversão de 50%, praticamente todo o monômero que não reagiu foi retirado. A secagem por Spary Dryer também foi eficaz; entretanto, apresentou baixíssimo rendimento. Mesmo apresentando uma menor agregação, não foi observada influência significativa sobre a taxa de liberação do PZQ.
- As emulsões de PMMA obtidas no homogeneizador são estáveis por seis meses, enquanto que as emulsões de PAV são estáveis por um período de tempo pequeno, de apenas 12 horas.
- Todas as técnicas de caracterização empregadas foram satisfatórias e adequadas na caracterização físico-química e morfológica das nanopartículas.
- A taxa de dissolução desejada não foi atingida na primeira etapa do trabalho, uma vez que, as nanopartículas não liberaram mais de 80% do PZQ incorporado em 60 minutos.

5.4. REAÇÕES PARTE IIa (RECEITA II)

Nas reações da Parte IIa, o objetivo principal foi a melhoria da taxa de dissolução. Dessa forma, procurou-se executar a reticulação do polímero como uma estratégia de controle das taxas de liberação do PZQ. Assim, realizaram-se reações na presença de Eudragit® E100, Eudragit® E100 e Etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) e de EGDMA.

O Eudragit®E100 é um copolímero catiônico formado por dimetilaminaetil metacrilato e ésteres metacrílicos neutros. O EGDMA é um agente reticulante usual na indústria de biopolímeros. Ambos os compostos já apresentam muitas aplicações biológicas (EVONIK, 2011; AJIKUMAR E DEVAKY, 2000; ESPOSITO *et al.*, 2002).

Entretanto, antes de avaliar a liberação do ativo, é preciso verificar as condições de reação.

5.4.1. CONVERSÃO

Os resultados da conversão na presença dos agentes reticulantes são mostrados estão nas Figuras 41 e 42. As reações realizadas na presença de Eudragit®, já começaram com valores elevados de conversão, 20% aproximadamente. Isso porque já há polímero no meio reacional.

As reações realizadas com Eudragit® também apresentaram um platô em 30 minutos, entretanto a reação R15, realizada sem PZQ, apresentou conversão final de aproximadamente 80%. Esse resultado pode ter sido observado apenas em função da variabilidade do ensaio.

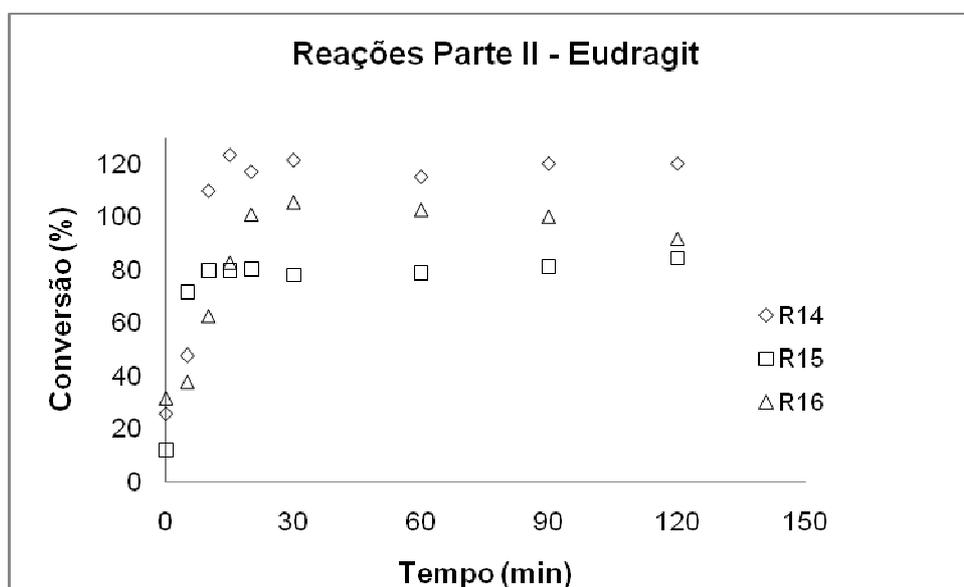


Figura 41 - Conversão das reações a 90°C com Eudragit. (R14) MMA:óleo com 6 g de PZQ e 7 g de Eudragit; (R15) MMA:óleo sem PZQ com 7 g de Eudragit; (R16) MMA com 12 g de PZQ e 10 g de Eudragit.

As reações com Eudragit® E100 e EGDMA estão apresentadas na Figura 42.

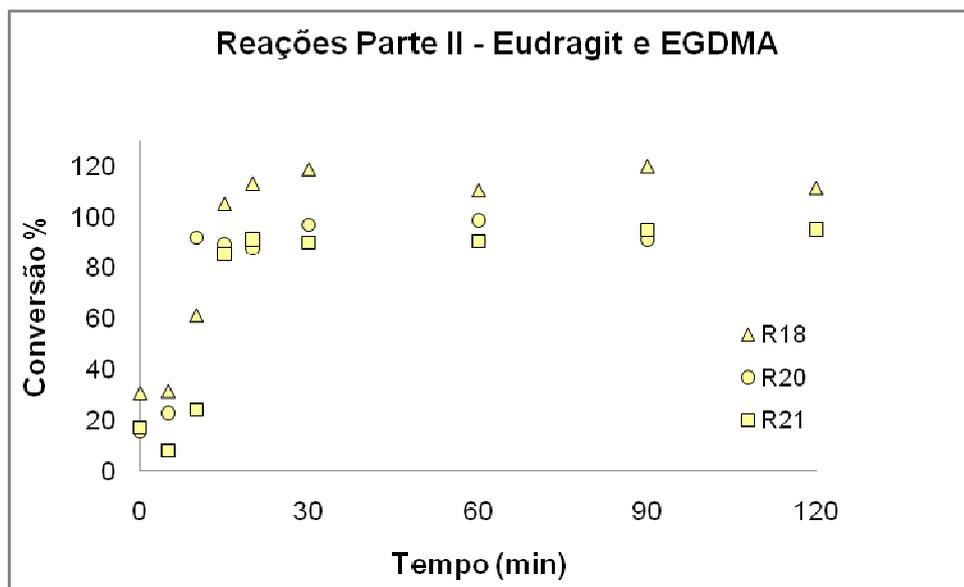


Figura 42 - Conversão das reações a 90°C com Eudragit e EGDMA. (R18) MMA com 12 g de PZQ, 10 g de Eudragit e 5 g EGDMA; (R20) MMA sem PZQ com 10 g de Eudragit e 5 g de EGDMA; (R21) MMA:óleo com 10 g de Eudragit e 5 g de EGDMA.

A reação R19, por possuir alto teor de sólidos, entupia a agulha de amostragem. Assim, não foi possível calcular a conversão dessa reação. Nas reações realizadas com Eudragit e EGDMA, os brancos (R20 e R21) apresentaram o tempo zero com valores mais baixos de conversão, conforme ocorreu também com as reações sem PZQ que levaram somente o Eudragit® E100 (R15) na figura 41.

As conversões das reações que levaram apenas o EGDMA como agente reticulante estão na Figura 43. Observa-se que as reações conduzidas sem PZQ e as reações R24 e R25, apresentaram no tempo zero valores mais baixos de conversão. Isso demonstra que de certa forma o PZQ influencia a conversão no início da reação.

A Tabela 17 apresenta todos os resultados finais de conversão de R14 a R25 para uma melhor visualização dos mesmos. Importante é perceber que as conversões são sempre muito altas. Como as conversões iniciais devem ser obviamente iguais a zero, a variabilidade inicial indica provável formação de polímero durante o processo de emulsificação. A influência negativa do PZQ sobre as conversões iniciais provavelmente reforçam o efeito levemente inibidor do PZQ sobre a reação, como também identificado com outros fármacos na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A

presença dos reticulantes deve acentuar o efeito de polimerização inicial por causa do aumento de viscosidade da solução de MMA e maior dissociação de calor no homogeneizador.

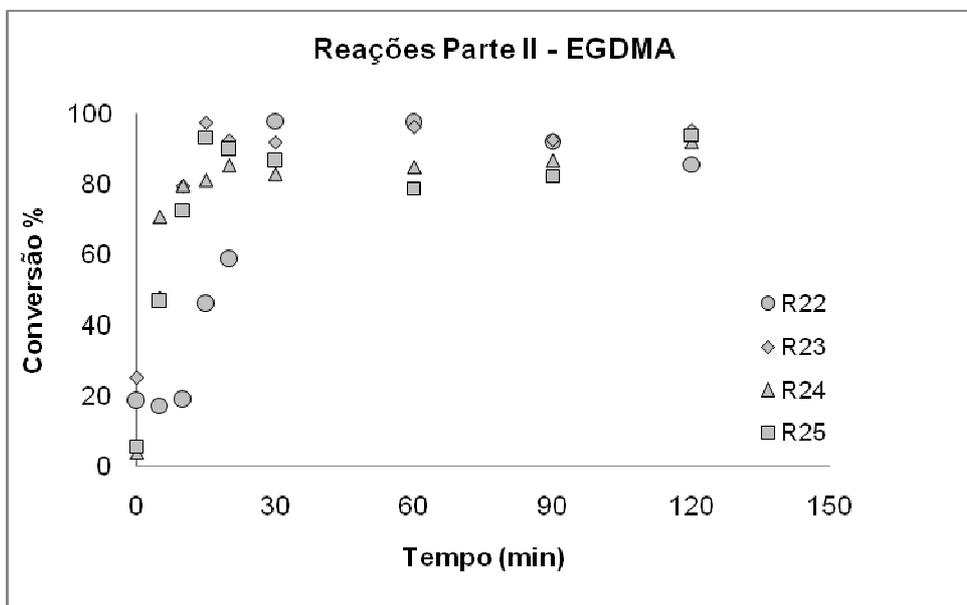


Figura 43 - Conversão das reações a 90°C com EGDMA. (R22) MMA com 12 g de PZQ e 5 g EGDMA; (R23) MMA:óleo com 12 g de PZQ e 5 g de EGDMA; (R24) MMA e 5 g de EGDMA; (R25) MMA:óleo e 5 g de EGDMA.

Tabela 17 - Resultados da conversão das reações R14 a R25

Reações	Conversão final (%)
R14	120
R15	84
R16	100
R18	111
R20	95
R21	95
R22	90
R23	95
R24	91
R25	93

5.5. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS - PARTE II

5.5.1. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA

A análise de tamanho de partícula foi realizada para algumas das reações, os resultados obtidos para o diâmetro médio são apresentados na Tabela 18.

Todas as reações apresentaram distribuição unimodal conforme mostrado na Figura 44. Em relação aos resultados da primeira parte, Tabela 11, observa-se um pequeno aumento no tamanho das partículas. Isso poderia ser explicado em função dessas reações possuírem um maior número de componentes na fase orgânica e maior viscosidade, por causa da reticulação e da presença do agente reticulante durante a preparação da miniemulsão. Apenas o produto da reação R22, formulado com monômero, PZQ e EGDMA apresentou tamanho de 48 nm, para todas as outras formulações os diâmetros ficaram acima de 65 nm. O produto da reação R19, formulado com monômero, PZQ, Eudragit®, óleo e EGDMA apresentou o maior tamanho médio de partículas, igual a 106 nm, por apresentar maior teor de sólidos.

Tabela 18 - Análise de distribuição granulométrica

Reações	Tamanho médio (nm)	PdI*
R14	68,0	0,184
R15	77,2	0,324
R18	84,7	0,195
R19	105,9	0,145
R22	48,5	0,082
R23	87,6	0,109
R24	98,2	0,210

*PdI - Índice de polidispersão

Conforme apresentado por TIARKS *et al.* (2001), o EGDMA (proporção de 10% nas reações) aumenta a estabilidade das nanopartículas e não afeta o tamanho médio das mesmas, resultado esse que também foi observado neste trabalho. As reações R23 e 24, que não continham Eudragit e foram formuladas apenas com EGDMA, resultaram em produtos com diâmetros médios similares aos anteriores.

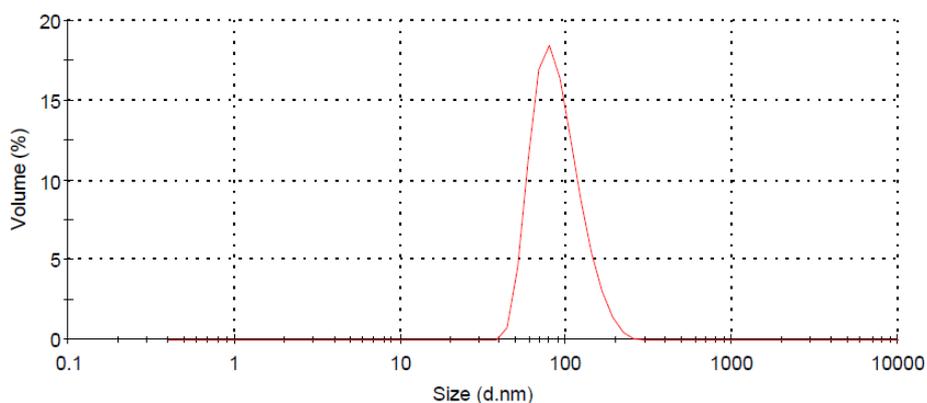


Figura 44 - Distribuição de tamanhos de partícula da amostra R23, medido por DLS.

5.5.2. TAXA DE ENCAPSULAMENTO DO PZQ

Os resultados das quantidades de PZQ que foram incorporadas às nanopartículas nessa segunda etapa do trabalho são apresentados na Tabela 19.

A Tabela 19 mostra que a taxa de encapsulamento média aumentou para pouco mais de 90%, 10% a mais do que as reações da primeira etapa realizadas a 80°C. O aumento da temperatura proporciona melhor solubilidade do PZQ no monômero, proporcionando uma maior incorporação de PZQ nas reações realizadas a 90°C. Nessas reações, a concentração de praziquantel média ficou em torno de 9,5 mg de PZQ para 100 mg de nanopartículas, enquanto que nas reações anteriores o valor médio obtido foi de 4,8 mg de PZQ por 100 mg de nanopartículas. Esses resultados contradizem os dados encontrados por SAIRAM *et al.* (2006) que na produção de micropartículas de poliacrilamida com 5-fluorouracil encapsulado, na presença de EGDMA, apresentaram redução na eficiência de encapsulação de 10% quando a concentração do agente reticulante foi aumentada de 2 para 6%.

Tabela 19 - Eficiência do encapsulamento de PZQ

Amostras (n=3)	Condições das Reações	Encapsulamento (%) (Média n=3)
R14	MMA:óleo (70:30) com 6g de PZQ e 7g de Eudragit - 90°C	88,4
R16	MMA com 12g de PZQ e 10g de Eudragit - 90°C	108,6
R17	MMA com 15g de PZQ e 10g de Eudragit - 90°C	90,6
R18	MMA com 12g de PZQ, 10g de Eudragit e 5g EGDMA - 90°C	92,3
R19	MMA:óleo (70:30) com 12g de PZQ, 10g de Eudragit e 5g EGDMA - 90°C	99,8
R23	MMA:óleo (70:30) com 12g de PZQ, e 5g EGDMA - 90°C	90,1

5.5.3. INTERAÇÃO FÁRMACO - POLÍMERO

A análise da interação entre o fármaco e o polímero levou a resultados similares aos encontrados na primeira parte do trabalho; ou seja, mesmo na presença de Eudragit® e EGDMA, o PZQ continuou a se apresentar na forma de uma solução com a matriz polimérica (Figura 45). As nanopartículas continuaram a não apresentar a transição endotérmica característica do PZQ. SAIRAM e colaboradores (2006) também obtiveram esses resultados ao realizarem análise de DSC de micropartículas de poliacrilamida com 5-fluorouracil.

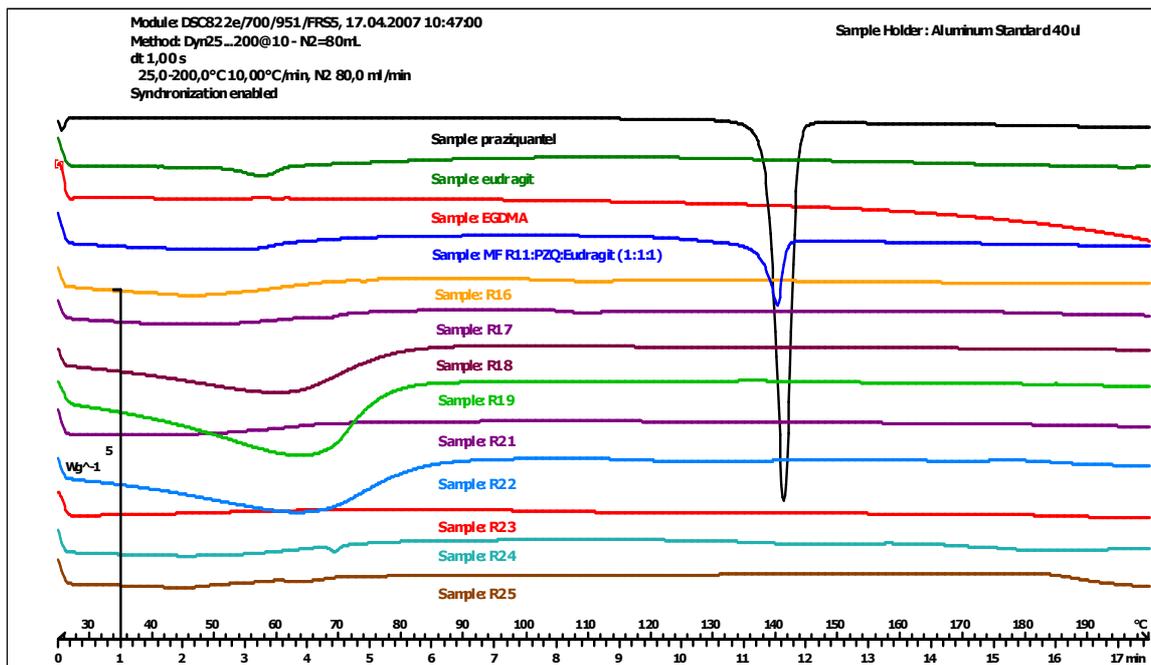


Figura 45 – Tremogramas de calorimetria diferencial do PZQ, componentes isolados das nanopartículas, mistura física de alguns componentes e das diferentes nanopartículas obtidas (R16 a R25).

5.5.4. DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES DO POLÍMERO

A determinação da distribuição de massas molares foi realizada para as reações R14, R15, R16 e R23 e os resultados estão apresentados nas Figuras 46 e 47. Antes de abordar os resultados, é importante enfatizar que as amostras formuladas com Eudragit® e/ou EGDMA são reticuladas, o que dificulta a análise, pois o polímero não é totalmente dissolvido no meio fluido (THF). Dessa forma, são avaliadas apenas as frações solúveis dos produtos obtidos. A análise do GPC do produto da reação R14 está mostrada na Figura 48.

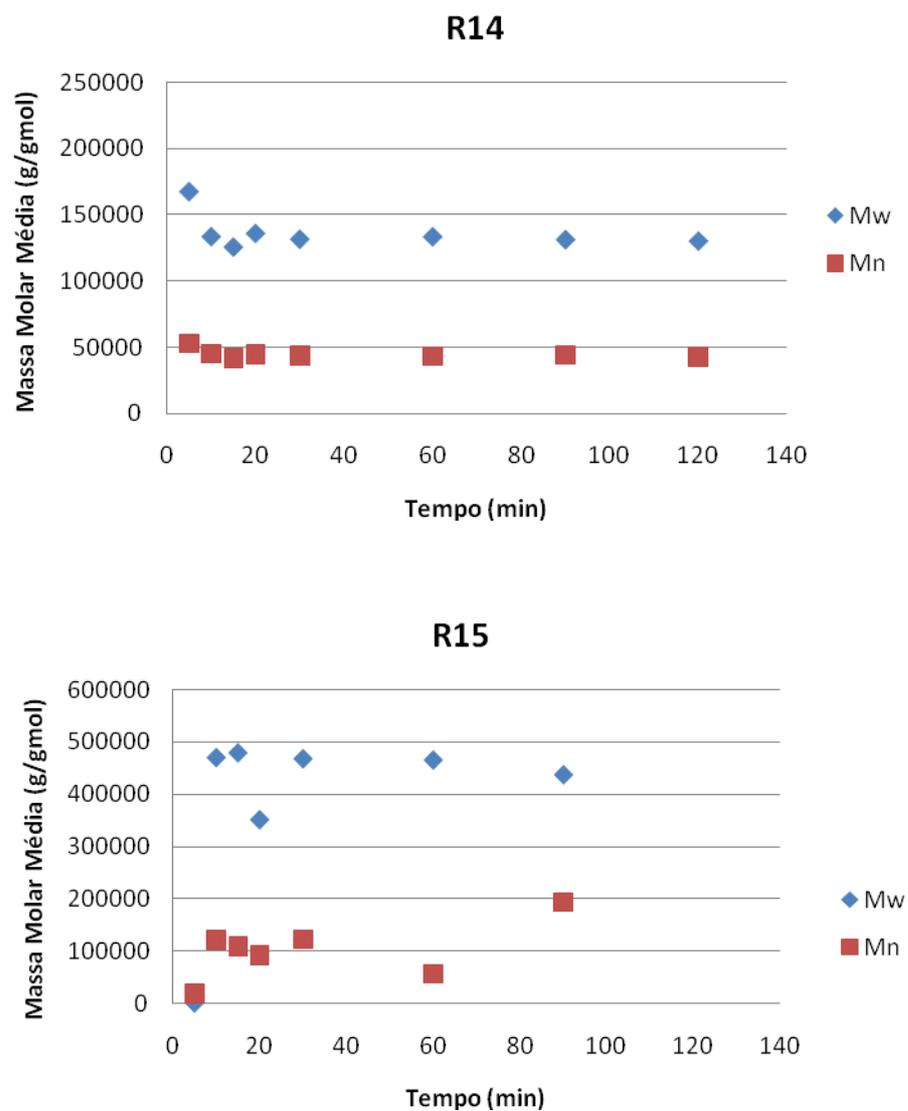


Figura 46 – Massas molares médias dos materiais produzidos ao decorrer das reações R14 e R15.

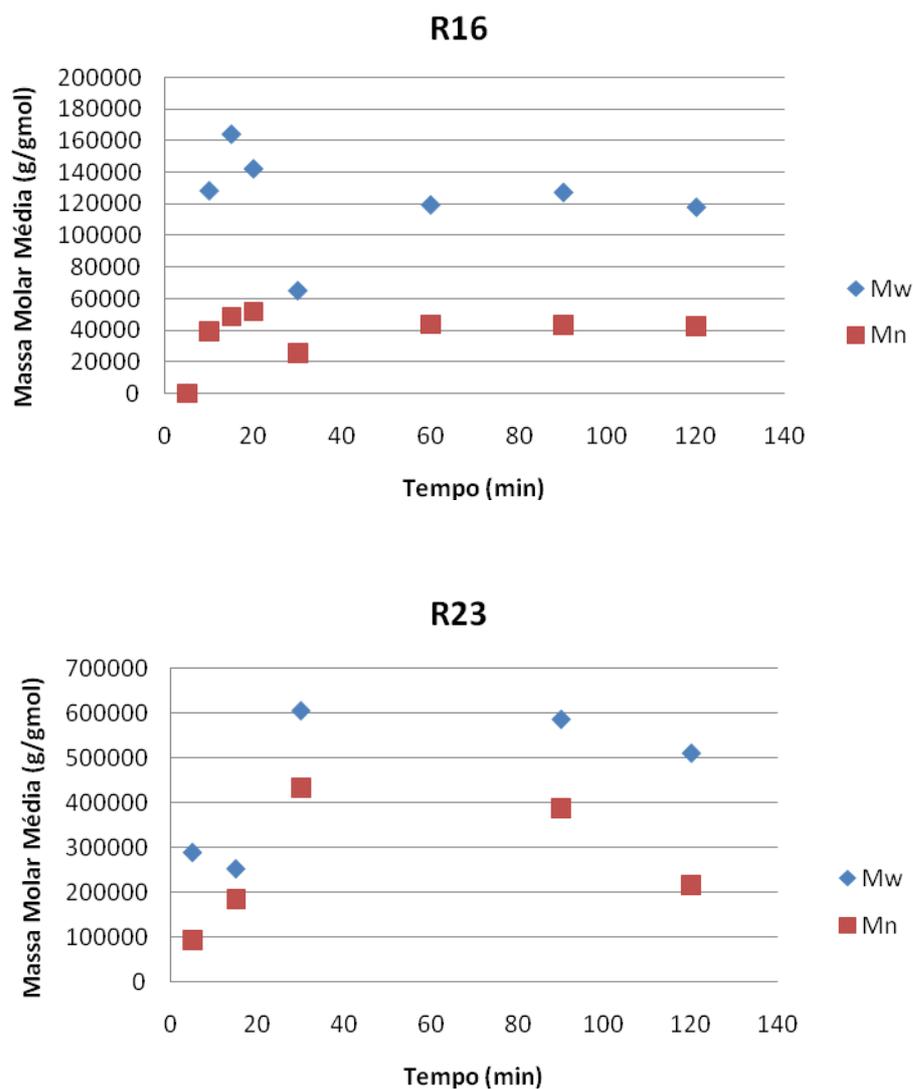


Figura 47 – Massas molares médias dos materiais produzidos ao decorrer das reações R16 e R23.

Com exceção da reação R23, as massas molares médias são essencialmente constantes ao longo da reação, em conformidade com os modelos clássicos de polimerização. A R23 foi feita na presença de EGDMA, e o aumento pronunciado das massas molares nos instantes iniciais de reação mostra que esse monômero é mais eficiente para promover a reticulação. A queda posterior das massas molares no final é resultado do aumento da fração de material insolúvel. Os resultados obtidos nas reações R14 e R16 estão em conformidade com aqueles encontrados nas reações R10 e R13, conforme Tabela 16. A R15 não foi formulada com PZQ, apresentando valores de Mw e Mn superiores aos obtidos nas reações R14 e R16. Esses dados também estão em

conformidade com os resultados achados anteriormente e parecem indicar que o PZQ pode exercer algum efeito de transferência de cadeia, como observado com outros fármacos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

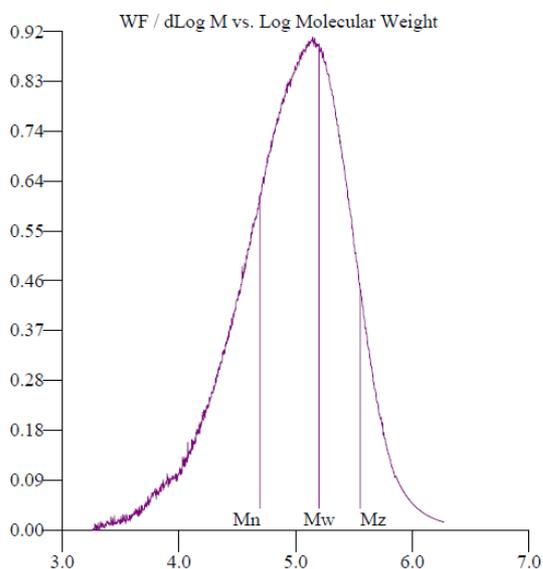


Figura 48 - Distribuição das massas molares do PMMA, reação R14.

5.5.5. LIBERAÇÃO DO FÁRMACO DA MATRIZ POLIMÉRICA

Os ensaios de liberação do PZQ em meio fisiológico, numa faixa de pH variando de 1,2 a 6,8, foram realizados para verificar se as novas propostas de condições de reação melhoravam o processo de dissolução do fármaco a partir da matriz polimérica. Os resultados estão apresentados nas Figuras 49 a 52.

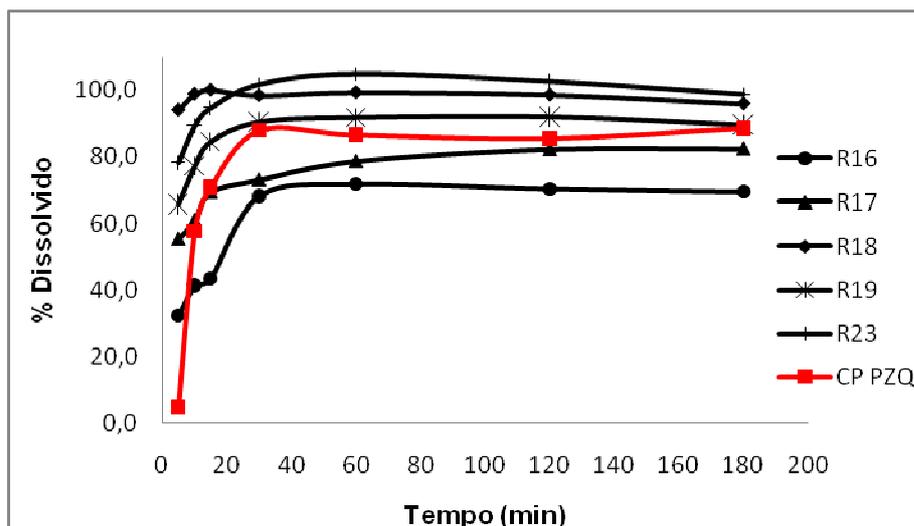


Figura 49 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R16, R17, R18, R19, R23 e dos comprimidos em meio pH 1,2.

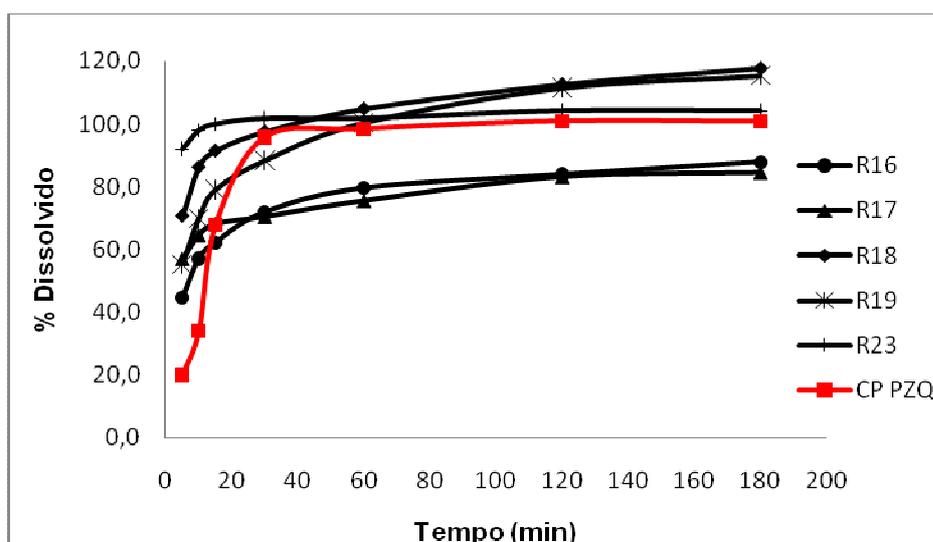


Figura 50 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R16, R17, R18, R19, R23 e dos comprimidos em meio pH 4,5.

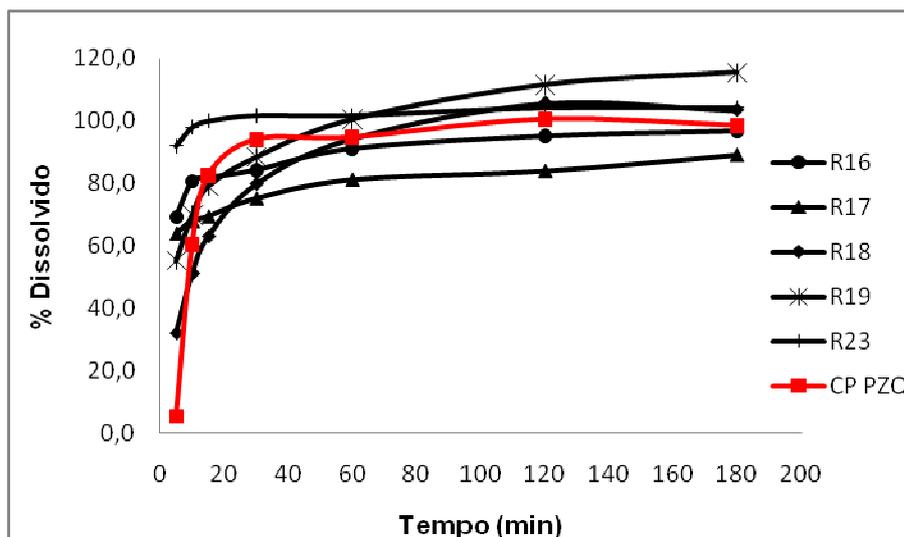


Figura 51 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R16, R17, R18, R19, R23 e dos comprimidos em meio pH 5,5.

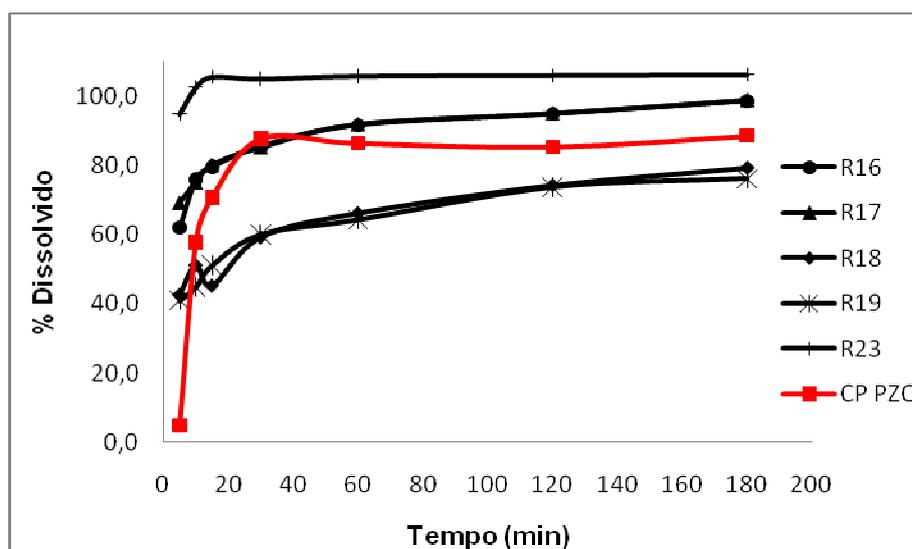


Figura 52 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R16, R17, R18, R19, R23 e dos comprimidos em meio pH 6,8.

No pH 1,2, os produtos das reações R16 e R17 apresentam uma liberação lenta, com estagnação do processo em torno de 30 minutos, com 70% de dissolução para R16 e 80% para R17. Ambos os polímeros possuem a mesma receita, sendo que R17 foi formulado com uma maior concentração de PZQ, 20 g contra 12 g de R16, o que pode explicar a diferença de aproximadamente 10% entre os resultados. Mais uma vez tentou-se incorporar uma maior quantidade do fármaco. R18, 19 e 23 apresentaram uma

cinética de dissolução muito rápida em pH 1,2 (Figura 49). Esses polímeros possuem EGDMA na receita, que apresenta uma contribuição a taxa de dissolução maior do que o Eudragit® E100 utilizado em R16 e R18. Esse efeito possivelmente é devido à reticulação promovida pelo EGDMA que pode promover o aparecimento de poros no polímero.

No pH 4,5 (Figura 50) os resultados foram semelhantes. Nessa condição, não foi notada a estagnação do processo de dissolução para R16 e R17; entretanto, o processo de dissolução foi lento, não chegando a sua totalidade em 180 minutos. R18, 19 e 23 apresentaram comportamentos similares aos observados em pH 1,2, com uma cinética de liberação do PZQ bem rápida.

No pH 5,5 (Figura 51) houve um incremento na taxa de dissolução de R16 e 17 e ambas chegaram a praticamente 100% de liberação em até 180 minutos. Nessa condição, R18 e 19 apresentaram um início de dissolução lento, sendo que a dissolução total só foi atingida após 120 minutos, anteriormente a dissolução total era atingido entre 30 e 60 minutos, como mostrado nas Figuras 48 e 49. Esse resultado era, de certa forma esperado, pois o Eudragit® E100 é gastro-solúvel e enterorresistente, apresentando maior solubilidade em pH abaixo de 5,5 (EVONIK, 2011). R23 não foi influenciada pela alteração do pH e manteve o mesmo comportamento apresentado em outros meios .

No pH 6,8 ocorreu um incremento ainda maior na liberação de PZQ dos produtos R16 e 17 formulados com Eudragit. R18 e R19 reduziram ainda mais a cinética de liberação, provavelmente pela baixa solubilidade do Eudragit® E100 em pHs acima de 5,0. O produto da reação R23 manteve o mesmo comportamento, não tendo a sua cinética de liberação alterada pelo pH.

Os comprimidos de 600 mg de PZQ empregados no estudo não revelaram grandes alterações na cinética de dissolução em diferentes pHs. Dentre as reações analisadas, o produto de reação R23 foi que apresentou comportamento mais semelhante e constante, quando comparado aos comprimidos. Os desempenhos nos tempos iniciais sempre apresentaram diferenças, uma vez que o comprimido precisa ser desintegrado e desagregado, enquanto as nanopartículas já se encontram dispersas no meio de dissolução.

O uso do agente reticulante, EGDMA, acelerou significativamente o processo de liberação do fármaco da matriz polimérica em toda a faixa de pH fisiológico do trato gastro-intestinal. Isso ocorreu porque o MMA co-polimerizado com EGDMA forma partículas mais hidrofílicas, que inclusive afeta a distribuição das mesmas no corpo humano (REIS *et al.*, 2006). SAIRAM *et al.* (2006), observaram que o aumento de 2 para 6% na concentração de EGDMA em nanopartículas de poliacrilamida com 5-fluorouracil desacelera a cinética de liberação do ativo, alegando que o agente reticulante torna a cadeia polimérica mais rígida. A existência de reticulação provavelmente torna a estrutura mais porosa e suscetível a liberação do fármaco.

O Eudragit®E100 melhora o processo de dissolução apenas em pH ácido, mesmo na presença de EGDMA (Figura 49). Dessa forma, no caso de uma absorção das nanopartículas, à corrente sanguínea, as partículas de PMMA-Eudragit não iriam permitir uma liberação rápida do PZQ, pois o pH do sangue é em torno de 7,4, já as partículas de PMMA-EGDMA permitiriam a liberação mais eficaz nessas condições.

Os resultados aqui apresentados são melhores que os apresentados por outros autores, cujo objetivo também era aumentar a cinética de liberação do PZQ por encapsulação em ciclodextrinas, lipossomas, micropartículas de PLGA e Gelucire 50/13 e misturas físicas PVP:PZQ (AKBARIEH *et al.*, 1992; EL ARINI *et al.*, 1998; BECKET *et al.*, 1999; MAINARDES *et al.*, 2005; PASSERINI *et al.*, 2006).

5.5.6. FORMULAÇÃO

Com a aceleração da cinética de liberação do PZQ dos materiais obtidos, propôs-se a realização de testes formulativos. A primeira característica avaliada foi o pH resultante das nanopartículas em água. Formulações de uso oral devem apresentar um pH levemente ácido, em torno de 4,5 a 5,5. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 20.

De acordo com os resultados da Tabela 20, as reações que usaram Eudragit® na sua composição apresentam um pH bem alcalino, acima de 9,0. Por conta desses resultados, somado à questão da dissolução lenta em pHs básicos, as nanopartículas formuladas com Eudragit®E100 foram excluídas da continuidade do trabalho.

Tabela 20 - Valores de pH das nanopartículas dispersas em água

Polímeros	Valores de pH
R9	4,43
R10	4,32
R11	4,90
R13	4,03
R15	9,47
R17	9,63
R18	9,05
R20	9,34
R21	9,25
R23	4,82
R24	4,06
R25	4,05

Verificaram-se em seguida as quantidades de nanopartículas necessárias para atingir uma concentração de PZQ de 120 a 200 mg/mL de emulsão com base nos resultados anteriores, verificou-se que a quantidade de pó seria extremamente elevada para uma formulação de suspensão oral, pois seriam necessários aproximadamente 1g de pó em 1mL de água, o que resultaria em uma pasta. Diante desses resultados, foram feitas tentativas de incorporar uma quantidade maior de fármaco nas nanopartículas. A concentração final estipulada para o PZQ na suspensão passou a ser de 30 mg/mL, que também atenderia ao programa do governo brasileiro. Formas farmacêuticas com teor de sólidos maior que 25 % são classificadas como pastas e não são adequadas para uso oral e sim tópico (PRISTA *et al.*, 1995).

Nessa etapa do trabalho a suspensão do pó em água foi também avaliada quanto ao sabor. Importante salientar que a solução não foi deglutida e que, em seguida a boca foi lavada com água abundante após a definição do gosto. Esta avaliação preliminar foi importante para inserir o material em uma formulação e elaborar um protocolo para os ensaios de sabor. Os resultados não foram satisfatórios: as nanopartículas que continham o PZQ apresentavam um sabor amargo característico do fármaco, principalmente as que possuíam maior quantidade do fármaco. Por sua vez, as nanopartículas sem o fármaco não apresentavam sabor algum.

Paralelamente, verificou-se que as emulsões que foram guardadas por mais de 45 dias em vidro âmbar em sala com temperatura de 18 a 23°C, apresentaram uma quantidade pequena de partículas brancas no fundo do vidro, sedimentadas ao longo do

tempo, e que até então não haviam sido observadas. Em algumas fotografias de MEV foram detectados cristais na forma de bastão, como mostrado na Figura 53. Para confirmar que se tratava de PZQ dissolveu-se o fármaco no monômero e em seguida secou-se a solução por liofilização, levando a amostra posteriormente ao MEV. Filtrou-se a emulsão em papel de filtro com porosidade de 8 μm e o material retido no papel foi seco analisado no MEV. As análises de MEV mostraram que realmente havia PZQ não encapsulado, conforme mostra a Figura 53.

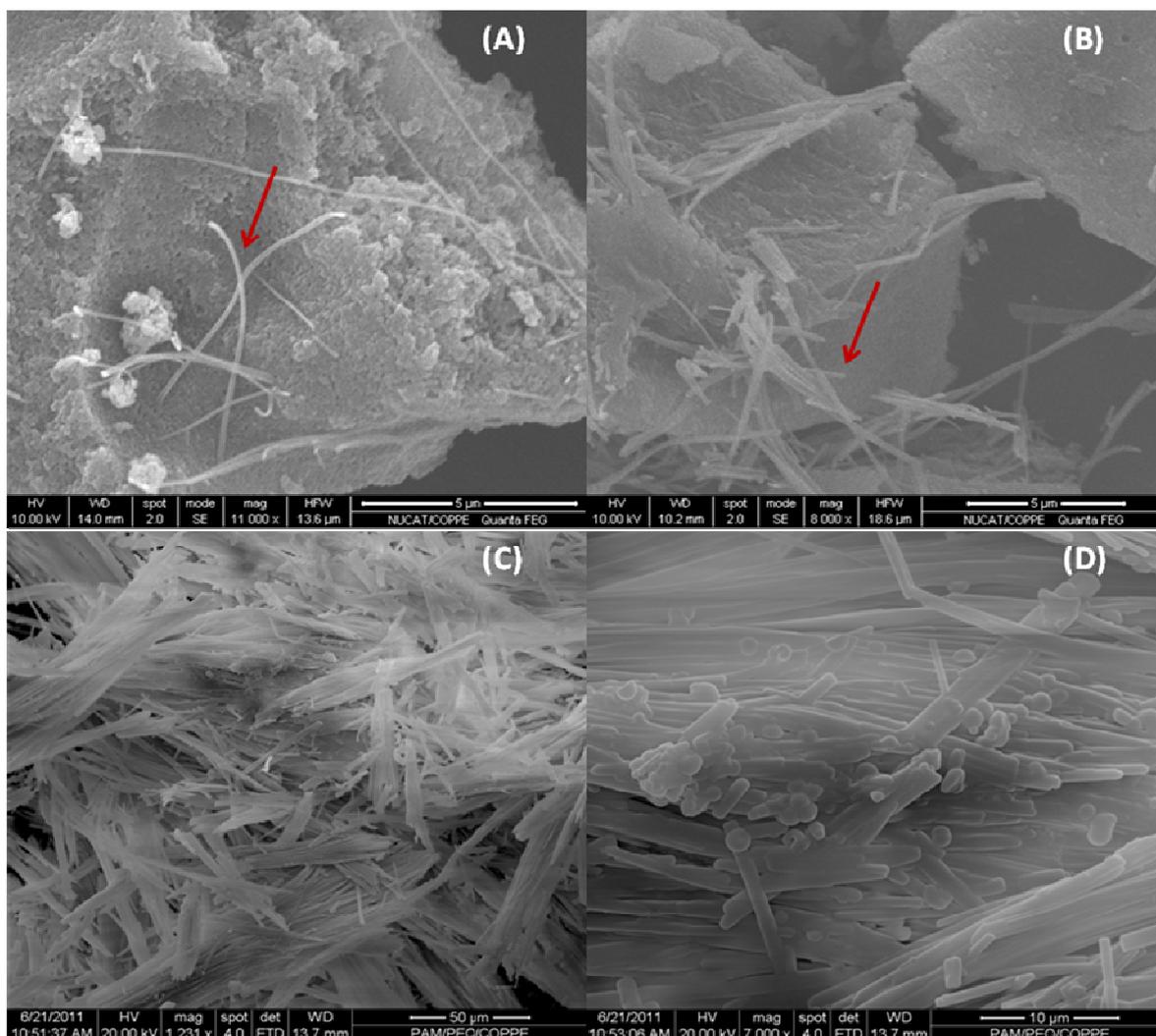


Figura 53- Micrografias de MEV. (A) R19; (B) R22; (C) PZQ após ser dissolvido no monômero e seco no liofilizador; (D) PZQ filtrado da emulsão e seco posteriormente.

Assim, houve necessidade de readequar a concentração e a incorporação de PZQ nas nanopartículas, aumentando a relação fármaco / partícula (p/p), pois a dose

requerida de PZQ implicava em elevada quantidade de sólidos e concentração apreciável de PZQ na fase aquosa prejudicando as propriedades sensoriais do produto final.

Conforme observado na Figura 53, a existência de PZQ não encapsulado gera o gosto ruim na suspensão das nanopartículas em água. Isso demonstra que, apesar de maior afinidade do PZQ pelo monômero e da baixa solubilidade do fármaco em água, há uma pequena quantidade que fica na água e prejudica as propriedades sensoriais. Um ponto importante a ser abordado diz respeito ao fato de que a fase aquosa apresenta lauril sulfato de sódio (LSS), que faz com que a solubilidade do PZQ em água aumente, como mostrado na Figura 54, discutida adiante.

Diante da situação descrita, algumas barreiras precisaram ser superadas para aumentar a concentração de PZQ nas partículas e separar o fármaco que não é incorporado do meio em emulsão. As próximas seções mostram o que foi feito para propor soluções para essas questões.

5.6. REAÇÕES PARTE IIB (RECEITAII)

Diante das dificuldades encontradas, tentou-se incorporar mais PZQ às nanopartículas. Como a solubilidade do fármaco aumenta com a temperatura, resolveu-se fazer todo o processo de miniemulsão à quente. Assim, na fase de pré-emulsão ambas as fases eram aquecidas a 75-80°C e em seguida eram misturadas na placa de agitação. Ao passar a pré emulsão para o homogeneizador, o equipamento já estava ligado a um banho que o mantinha operando a 80°C. Após o processo de homogeneização, a miniemulsão era inserida no reator pré aquecido a 90°C. Em função dos resultados obtidos nos testes de solubilidade do PZQ no MMA, 255 mg/mL a 90°C, aumentou-se a quantidade de PZQ de 12 para 17 g por reação, aproximando-se do teor máximo de fármaco que poderia ser inserido. A quantidade de óleo foi reduzida de 30% em relação a fase orgânica para 23%, pois o PZQ apresenta solubilidade quase nula no óleo mineral. Entretanto, o óleo é importante para a formulação de emulsões estáveis, bem como para o processo de dissolução. As reações submetidas a esse novo processo foram as reações R26, R27, R28 e R29.

Para tentar resolver a questão do fármaco não encapsulado, reduziu-se à metade a quantidade de LSS no meio reacional. Como mostrado a seguir, quanto mais tensoativo

maior a solubilidade do PZQ no meio. As reações realizadas com menor concentração de LSS foram as R28 e R29.

5.6.1. SOLUBILIDADE DO PZQ EM SOLUÇÃO AQUOSA DE LSS

Foram realizados testes de solubilidade do PZQ em soluções aquosas contendo LSS. O objetivo foi verificar as quantidades de fármaco que poderiam não ser incorporados por serem mantidos em solução na fase aquosa. Testaram-se duas concentrações de LSS propostas, 11 e 22 mg/mL, nas temperaturas ambiente e a 90°C. Os resultados estão na Figura 54.

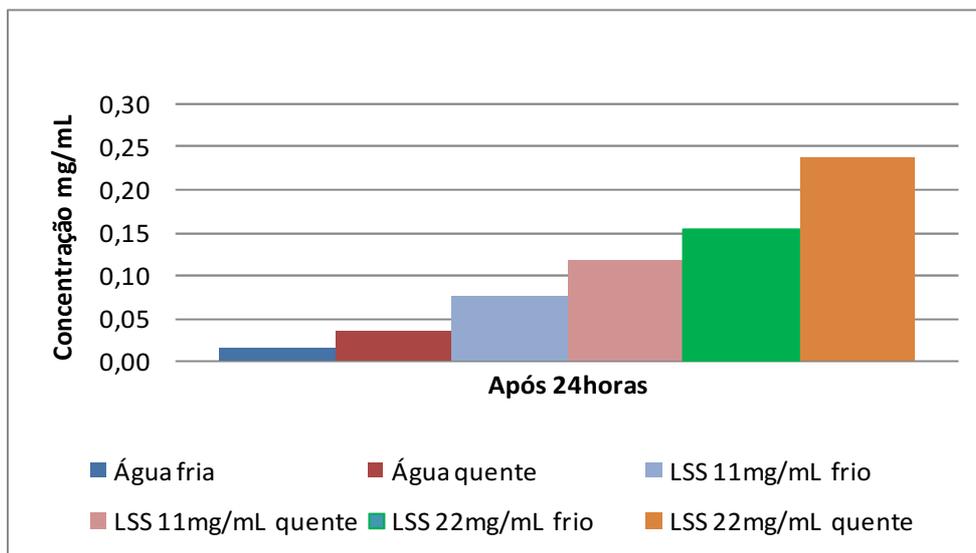


Figura 54 - Solubilidade do PZQ em água e soluções aquosas de LSS em diferentes concentrações e em duas temperaturas, 25 e 90°C.

A Figura 54 mostra que a solubilidade do PZQ aumenta de forma pronunciada com o aumento da concentração de LSS e da temperatura. Dessa forma, observa-se que a quantidade máxima de PZQ adicionado às reações e que não é incorporada é de aproximadamente 110 mg. Mesmo sendo essa uma baixa quantidade de PZQ não encapsulado, corresponde a cerca de 0,65% do PZQ adicionado, a quantidade é suficiente para conferir o sabor desagradável ao produto.

5.6.2. CONVERSÃO

A Figura 55 apresenta os resultados das conversões nas reações que foram realizadas com a preparação da miniemulsão à quente.

Conforme apresentado, todas as reações começaram com uma conversão inicial de pelo menos 25%. Esse resultado parece confirmar a hipótese de que a etapa de emulsificação promove a reação de polimerização. Esses resultados foram confirmados por amostras formadas ao final da etapa de homogeneização, em diferentes reações. Esse aspecto do problema ainda não foi abordado de forma apropriada na literatura.

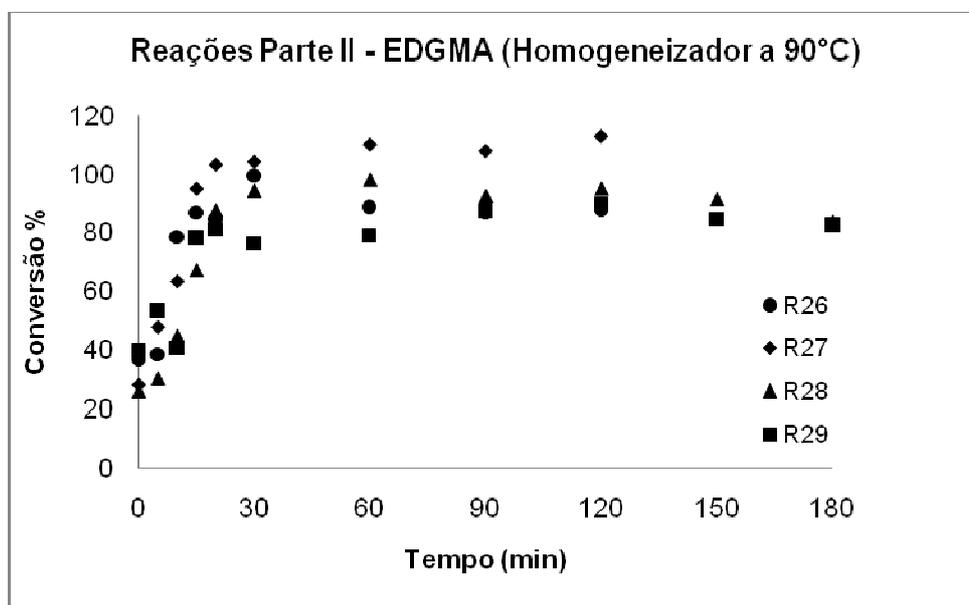


Figura 55 - Conversão das reações realizadas a 90°C com EGDMA. (R26) MMA:óleo com 17 g de PZQ e 5 g EGDMA; (R27) MMA:óleo com 17 g de PZQ e 5 g de EGDMA; (R28) MMA:óleo com 17 g de PZQ e 5 g de EGDMA; (R29) MMA:óleo e 5 g de EGDMA.

A redução da quantidade de tensoativo no meio reacional não impactou o andamento das reações, nem a estabilidade das emulsões finais, confirmando dados obtidos por FONSECA e colaboradores (2010).

5.6.3. DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES DO POLÍMERO

A determinação das distribuições de massas molares foi realizada para as amostras dos produtos obtidos nas reações R26 e R27. Os resultados estão apresentados na Figura 56.

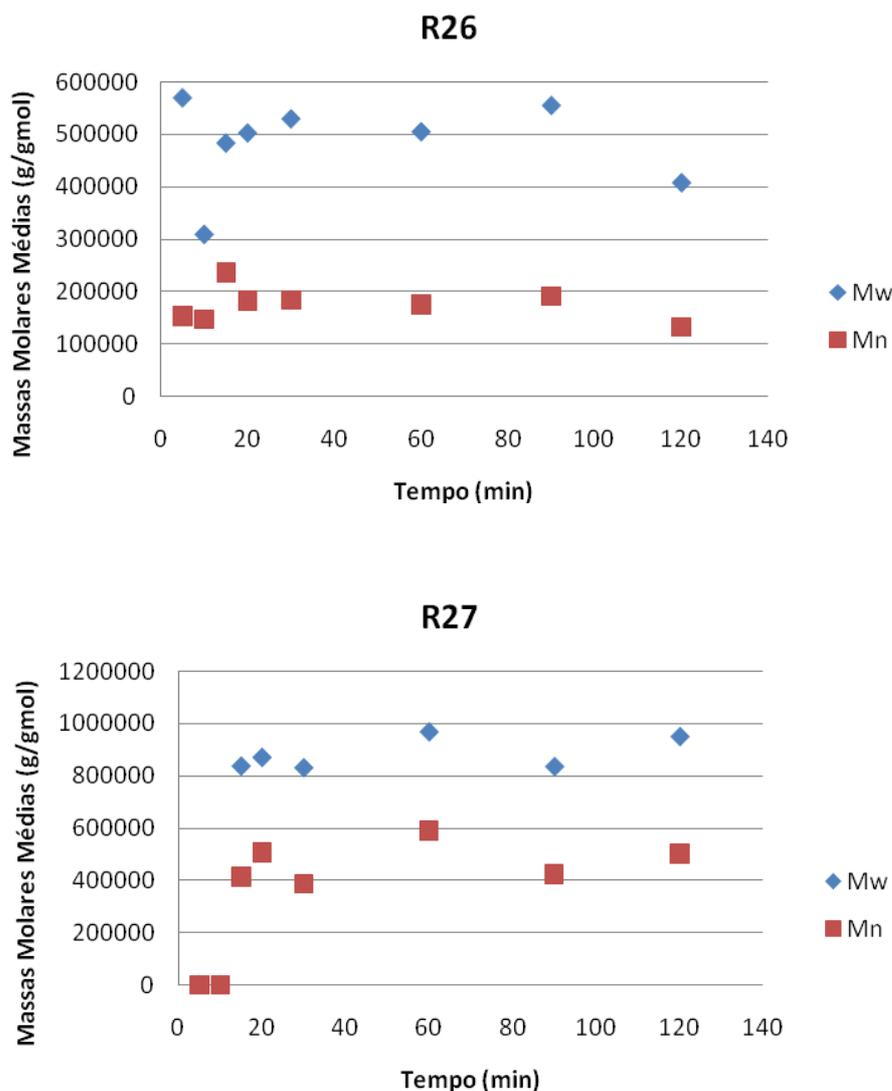


Figura 56 – Massas molares médias dos produtos das reações R26 e R27.

As amostras R26 e R27 apresentaram valores de Mw e Mn bem superiores aos das reações da primeira etapa do trabalho; entretanto, os resultados são coerentes com aqueles reportados para a reação R23. Isso mostra que o EGDMA é um agente reticulante muito eficiente e influencia a massa molar através da reticulação do

polímero. A realização das emulsões a quente, provocou ligeiro aumento das massas molares médias. O produto de reação R29 apresentou massas molares médias M_w igual a 1286×10^3 g/mol e M_n igual a 689×10^3 g/mol, demonstrando mais uma vez que o PZQ atua como provável agente de transferência de cadeia, pois as reações que continham PZQ sempre apresentaram valores inferiores de M_w e M_n . Esse efeito foi analisado para outros fármacos por OLIVEIRA *et al*, 2012.

5.6.4. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE PARTÍCULA

Os resultados das distribuições de tamanhos de partículas estão resumidos na Tabela 21.

Tabela 21 - Média principais das distribuições de tamanhos de partículas dos polímeros R26 a R29

Reações	Tamanho médio	
	(nm)	PdI*
R26	117,4	0,201
R27	81,5	0,130
R28	98,7	0,058
R29	75,2	0,120

*PdI - Índice de polidispersão

TOMAR *et al* (2011) e EL-JABY e colaboradores (2009) mostraram que o aumento da concentração de tensoativo, LSS, reduzia o tamanho da gotícula do monômero emulsificado, por causa da menor tensão interfacial. Entretanto, esse resultado não foi observado neste trabalho, uma vez que os produtos das reações R28 e R29, realizadas com metade da concentração de LSS, apresentaram tamanhos médios semelhantes aos produtos das reações R26 e R27. TIARKS *et al*. (2001) mostraram que a diminuição de LSS de 22 mg/mL a 11 mg/mL não interferiu no tamanho das partículas de poli(metacrilato de metila) com hexadecano. FONSECA *et al*. (2010) também reportaram resultados semelhantes na síntese por miniemulsão do copolímero EHA/MMA, onde se reduziu a concentração de tensoativo de 4,5 phm para 1,0 phm. Isso indica que a superfície das gotas está provavelmente saturada de tensoativos nas concentrações utilizadas. A medida de saturação é completa por causa do grande número de componentes da receita.

Comparando-se o produto da reação R26 com os demais, que foram formulados com uma maior quantidade de monômero (23% a mais), observa-se a obtenção de um tamanho médio maior. Esse resultado está de acordo com o encontrado por TIARKS *et al.* (2001). Segundo esses autores, quanto menor a concentração de monômero e maior a do hidrófobo, maior o tamanho de partícula e menor as massas molares médias. Entretanto, LOPEZ *et al.* (2008) e SHAH *et al.* (2010) reportaram que o aumento da fração orgânica promove um aumento no tamanho de partícula, por causa do maior número de colisões e maiores taxas de coalescência, em função da maior concentração de gotas.

5.6.5. RMN

Foram realizadas análises de ^1H RMN e ^{13}C RMN com o objetivo de avaliar a estrutura do polímero puro e do polímero produzido na presença do PZQ encapsulado. Os resultados estão mostrados nas Figuras de 57 a 60.

O espectro de ^1H RMN do PZQ puro, mostrado na Figura 56, apresenta as regiões características do PZQ, conforme apresentado na Tabela 22 e discutido na literatura (SULEIMAN *et al.*, 2004).

Tabela 22 - Deslocamento dos prótons do PZQ em espectros de ^1H RMN

Hidrogênios	Região δ (ppm)
9-12	7,19 a 7,27
2 ^o , 3 ^o , 5 ^o e 6 ^o	1,26 a 1,81
1 ^o , 4 ^o , 1, 6 e 7	2,47 a 3,03
1, 3, 6 e 14	4,04 a 5,17

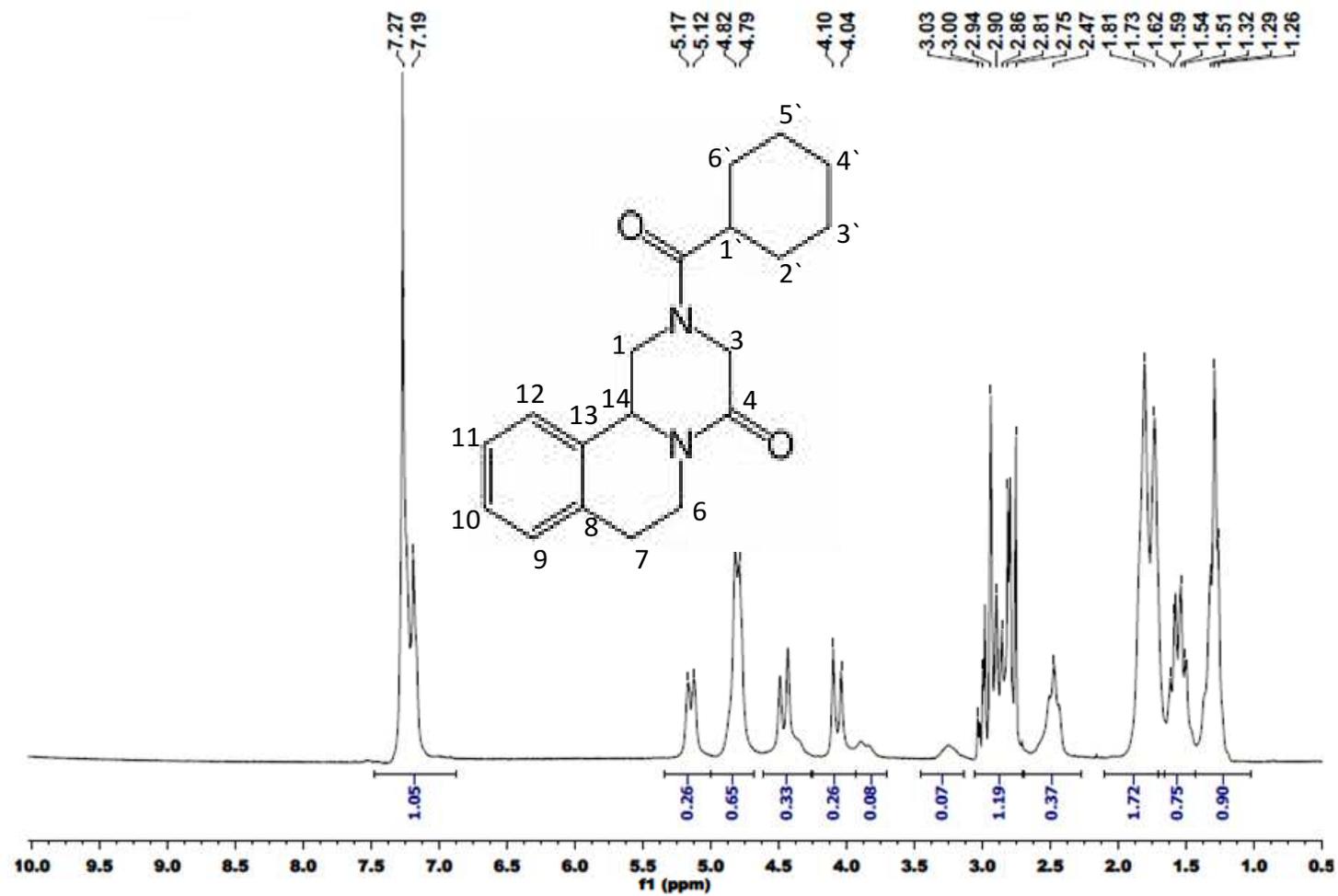


Figura 57 - Espectro ^1H RMN do PZQ puro.

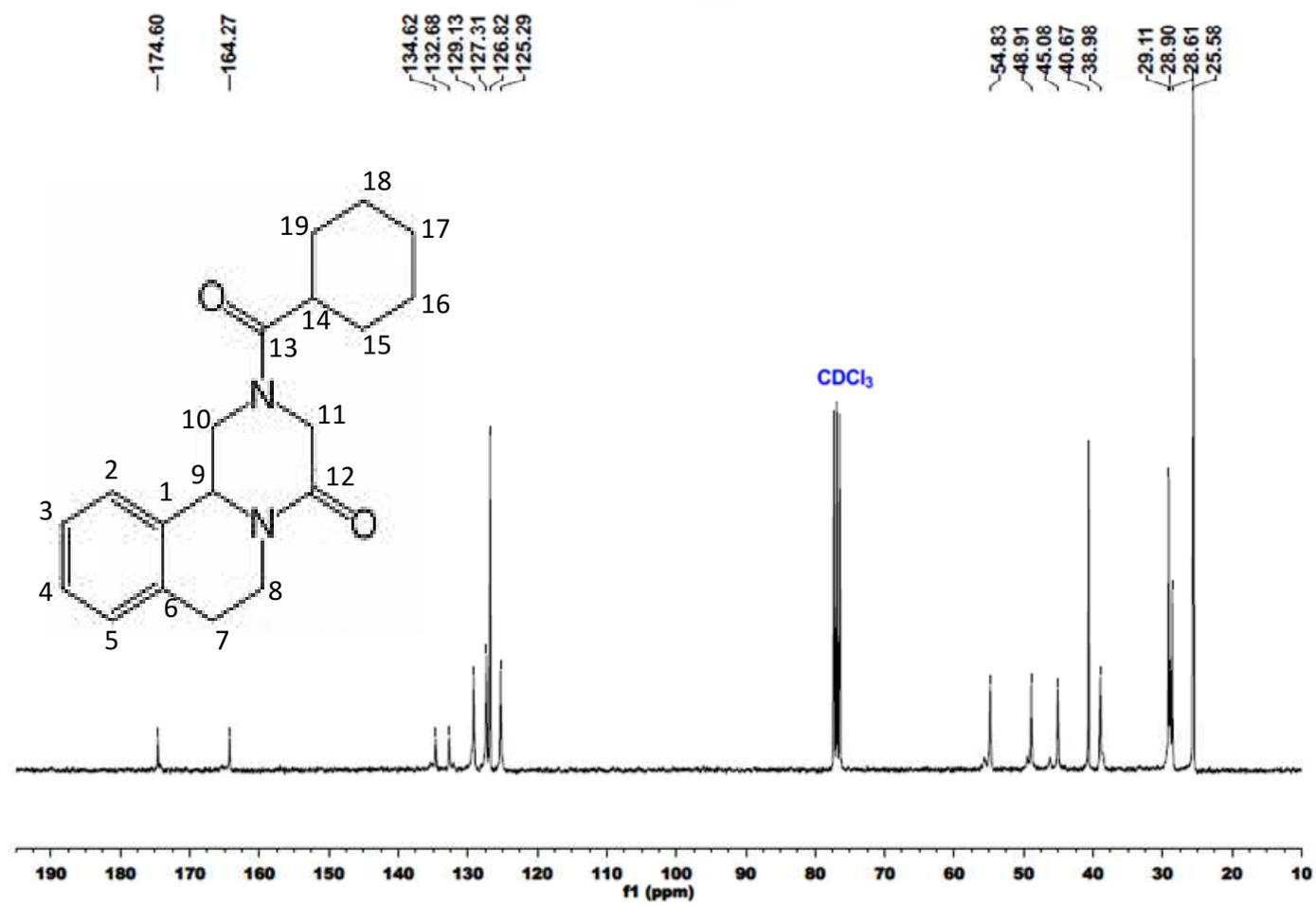


Figura 58 - Espectro ¹³C RMN do PZQ puro.

O espectro de ^{13}C RMN também apresenta as regiões características do PZQ, conforme discutido na literatura (SULEIMAN *et al.*, 2004), a Tabela 23 mostra os sinais encontrados. Os resultados mostram que o PZQ é conforme e apresenta bom grau de pureza.

Tabela 23 - Deslocamento químico do PZQ em espectros de ^{13}C RMN

Carbonos	Região δ (ppm)
C ₁ a C ₆	125,29 a 134,62
C ₇ a C ₁₁	38,98 a 48,91
C ₉	54,83
C ₁₂	164,27
C ₁₃	174,60
C ₁₄ a C ₁₉	25,58 a 29,11

As Figuras 59 e 60 apresentam os espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN do produto da reação R29. As ressonâncias observadas estão de acordo com as reportadas na literatura, para o PMMA: $\delta=0,86$ a $1,02$ ppm, que correspondem aos hidrogênios das metilas; $\delta=3,6$ ppm que corresponde ao hidrogênio do grupo O-CH₃; $\delta=1,8$ a $1,9$ ppm, que correspondem aos hidrogênios do grupo metileno (CÉSAR-OLIVEIRA *et al.*, 1999). Como o EGDMA foi adicionado em uma concentração bem baixa, os sinais do EGDMA não apresentam intensidades fortes, estando compreendidos na região $\delta=1,90$ a $2,07$ ppm (CÉSAR-OLIVEIRA *et al.*, 1999; SHAH *et al.*, 2010).

Os espectros de ^{13}C RMN do produto de reação R29 também estão de acordo com os reportados na literatura para o PMMA, $\sim\text{C}=\text{O}$ ($\delta = 178,2$); $-\text{CH}_2-$ ($\delta = 52,56$); $\sim\text{OCH}_3$ ($\delta = 52,56$); $\sim\text{C}\sim$ ($\delta = 44,89$), $\sim\alpha\text{-CH}_3$ ($\delta = 16,57$) (SOUTO-MAIOR *et al.*, 2005).

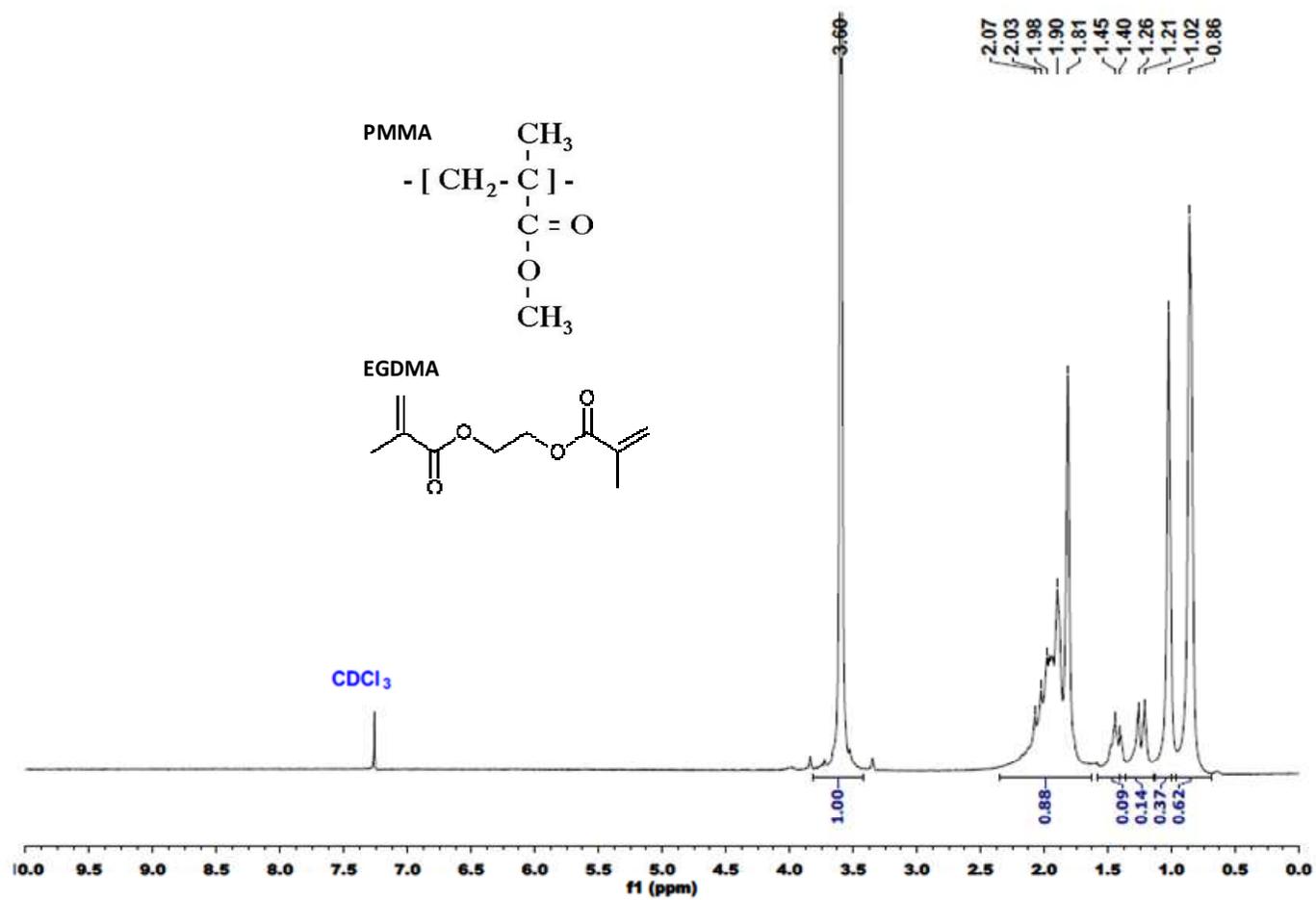


Figura 59 - Espectro ¹H RMN da reação R29 (PMMA).

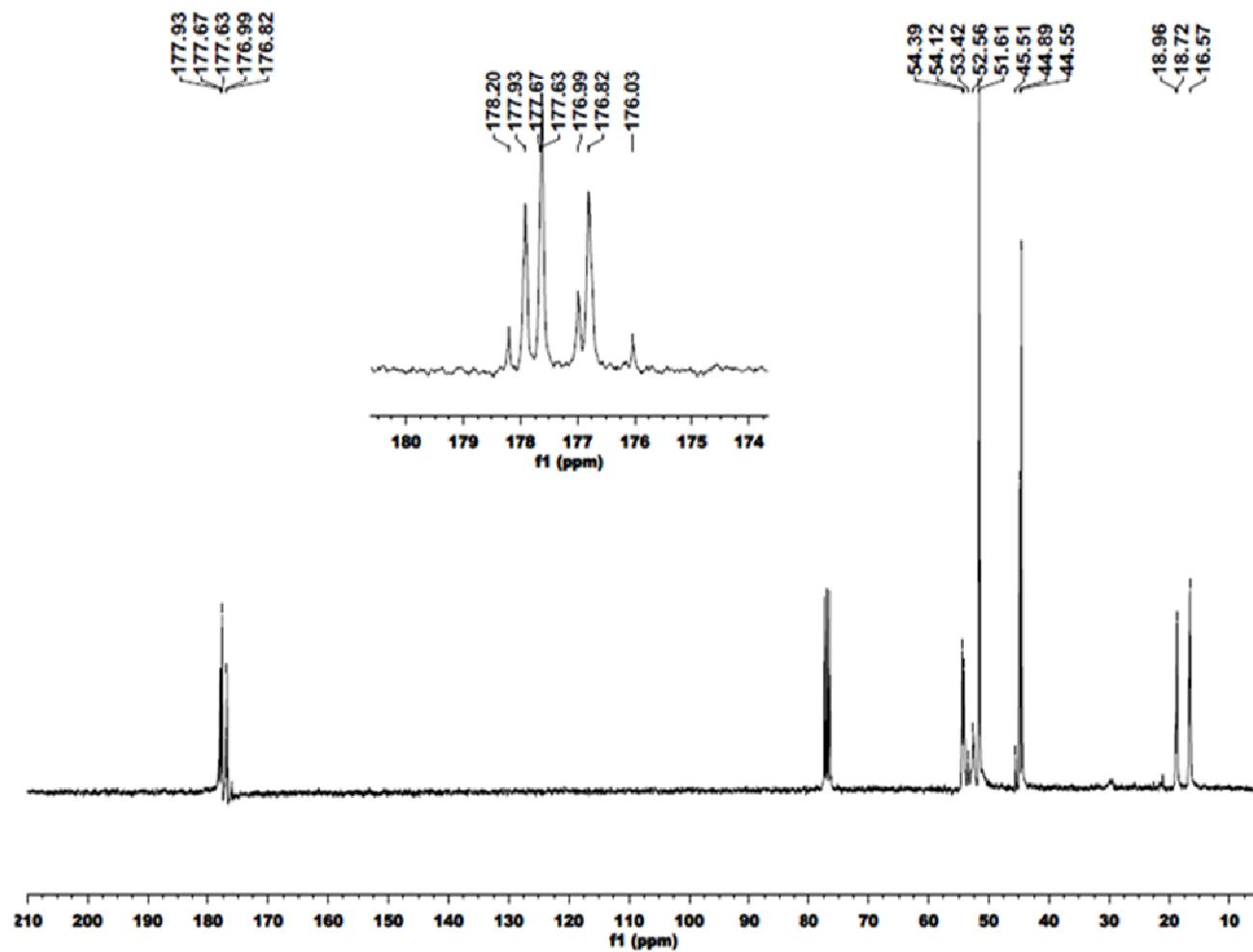


Figura 60 - Espectro ^{13}C RMN da reação R29 (PMMA).

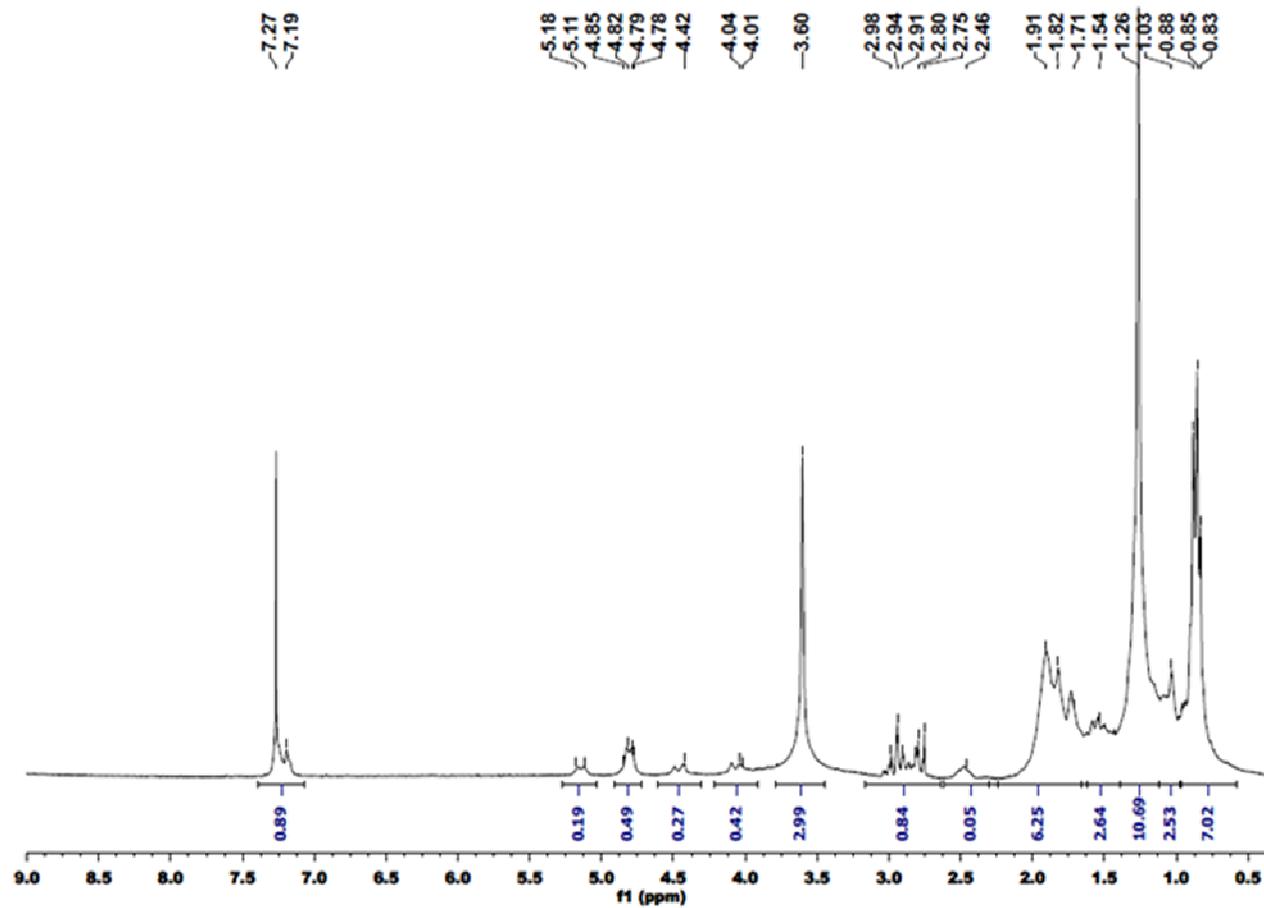


Figura 61 - Espectro ^1H RMN das nanopartículas PMMA-PZQ produzidas na reação R27.

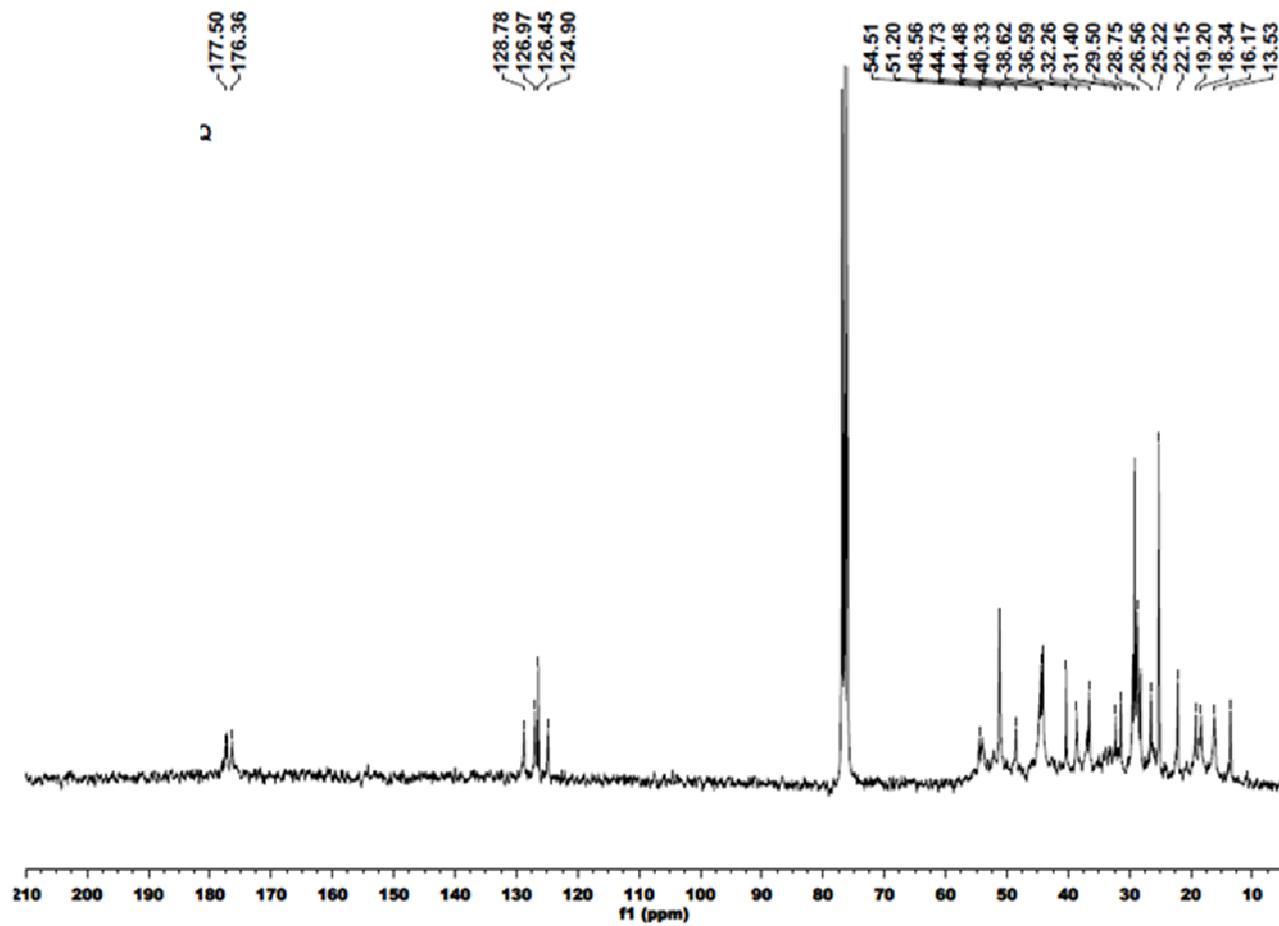


Figura 62 - Espectro ^{13}C RMN das nanopartículas PMMA-PZQ, produzidas na reação R27.

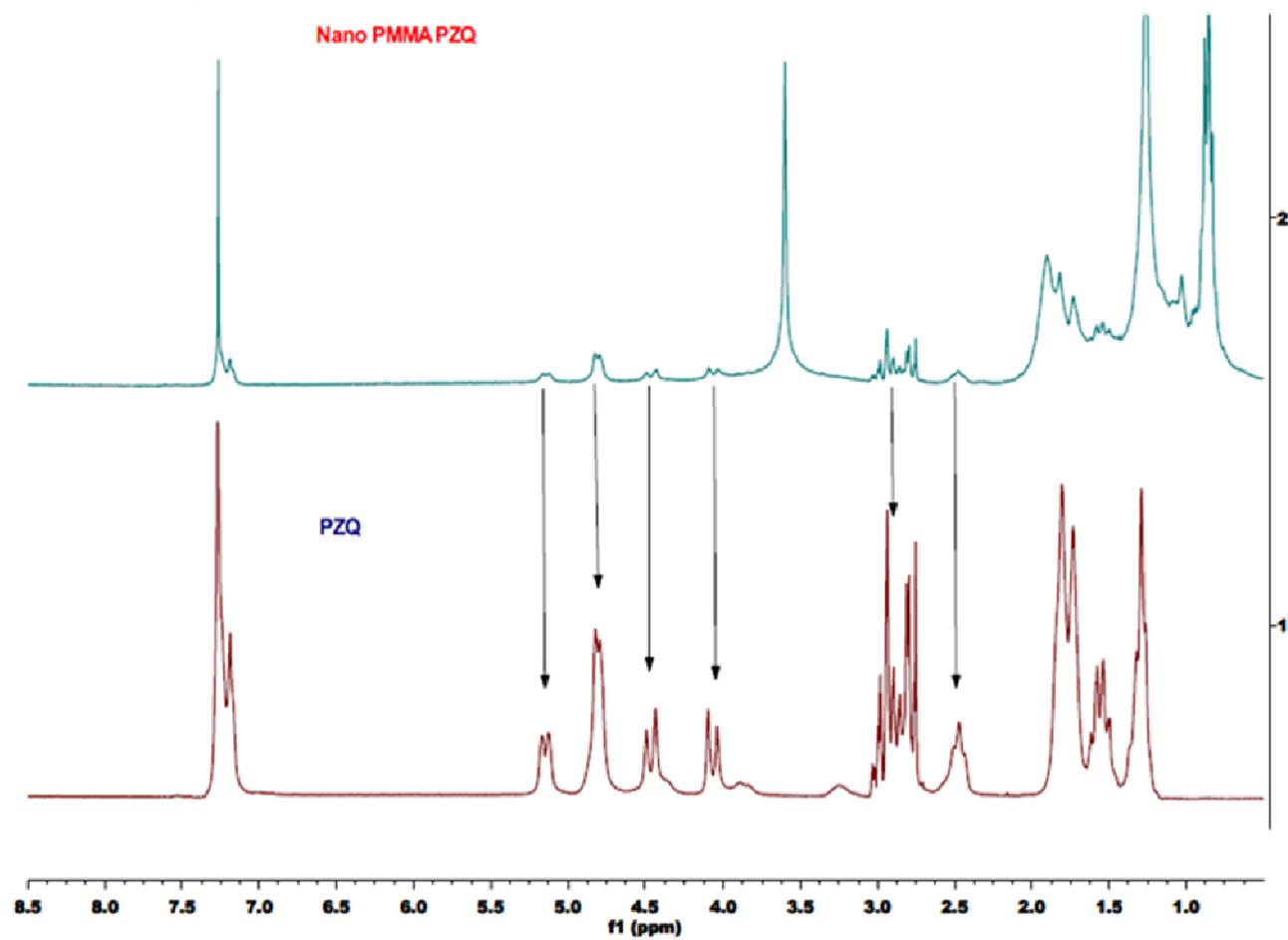


Figura 63 - Sobreposição dos espectros ¹H RMN do PZQ e das nanopartículas (PMMA-PZQ) produzidas na presença de PZQ na reação R27.

Os últimos espectros apresentados nas Figuras 61, 62 e 63 foram referentes as análises das nanopartículas contendo o PZQ produzidas na reação R27. Pode-se observar que os espectros das nanopartículas produzidas na presença do PZQ possuem as bandas referente ao polímero e ao fármaco bem definidas. Assim, foi feita uma sobreposição dos espectros de ^1H RMN para amostras de nanopartículas produzidas na presença do fármaco e para o PZQ puro, mostrado na Figura 63

Conforme mostra a Figura 63, a variação do deslocamento químico é extremamente baixa. Dessa forma, provavelmente não há qualquer interação química significativa entre o fármaco e o polímero, como também foi sugerido pelos ensaios de DSC e IR. No caso de haver interações químicas, algum padrão de acoplamento e/ou deslocamento químico deveria ter sido observado. Comparando esses resultados com os já apresentados anteriormente, fica evidente que não há qualquer interação química significativa entre o PZQ e o PMMA.

O ensaio de RMN de baixo campo permite a avaliação morfológica do material analisado, através da caracterização da distribuição de domínios e do tempo de relaxação. A Tabela 24 abaixo apresenta os tempos de relaxação característicos (T_1^H) das estruturas analisadas.

Tabela 24 - T_1^H das amostras analisadas

Amostras	T_1^H (ms)
PMMA sem PZQ (R29)	83,84
PZQ	741,06
Nano PMMA-PZQ (R27)	95,05

Conforme apresentado na Tabela 24, observa-se que o fármaco puro resulta em maior tempo de relaxação. O resultado já poderia ser esperado por se tratar de uma molécula pequena com ligações de hidrogênio muito mais fortes, levando assim mais tempo para relaxar. Nessa molécula só há interações primárias. Quando se comparam esses resultados com os resultados obtidos para o polímero puro, observa-se um tempo

de relaxação bem menor para o polímero, uma vez que esse apresenta diversas interações secundárias. Ao observar as nanopartículas com o fármaco encapsulado, nota-se um pequeno aumento do tempo de relaxação em relação ao polímero puro, mas que não chega nem perto do tempo do PZQ. O resultado é facilmente compreendido, já que, o fármaco está presente em uma concentração bem baixa nas nanopartículas em torno de 12% (p/p).

A Figura 64 apresenta as curvas de distribuição de domínios, sendo possível verificar que há uma distribuição homogênea do fármaco no polímero, como também sugerido pelas análises de DSC.

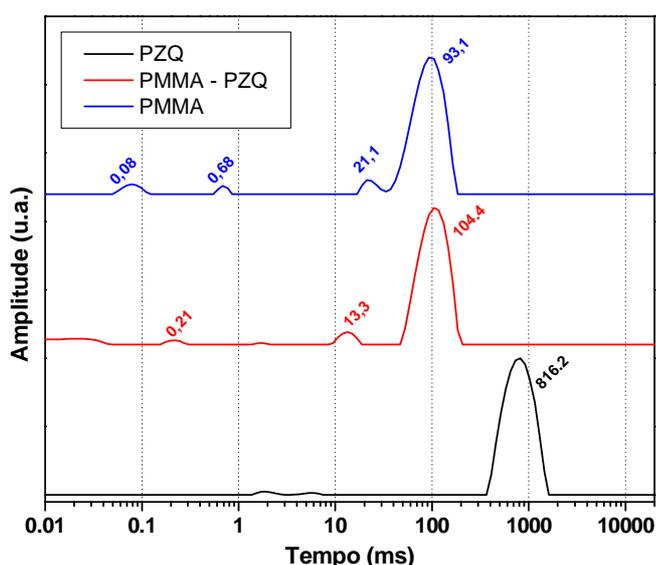


Figura 64 - Curvas de distribuição de domínios obtidas por RMN e baixo campo

De acordo com as curvas apresentadas na Figura 64, observa-se na curva do PZQ uma região bem definida, mostrando que este é um material rígido. Na curva do polímero puro nota-se uma área de domínio rígida, bem definida, onde está localizada a grande população de hidrogênios (em torno de $90 \times 10^3 \mu\text{s}$), e outras três áreas mais flexíveis. Avaliando as nanopartículas carregadas com o fármaco, vê-se que há alguma interação entre o PZQ e a parte rígida do polímero, embora essa interação não seja muito forte e resulte em deslocamento pouco significativo dos picos que se assemelham aos picos de PMMA. Em relação à parte mais flexível do polímero, observa-se algum deslocamento dos picos indicando que o fármaco interage com a fase amorfa.

Diante dos resultados apresentados, parece claro que o praziquantel está distribuído de forma homogênea no polímero. Não parece haver formação de novos domínios no material induzida pela presença do PZQ.

5.6.6. LIBERAÇÃO DO FÁRMACO DA MATRIZ POLIMÉRICA

Ensaio de dissolução foram realizados para verificar se as alterações de receita propostas impactariam no desempenho dos materiais obtidos em relação à liberação do fármaco. Nessa etapa, as nanopartículas foram ensaiadas nos 2 extremos de pH testados: pH 1,2 e 6,8. Os resultados estão apresentados nas Figuras 65 e 66.

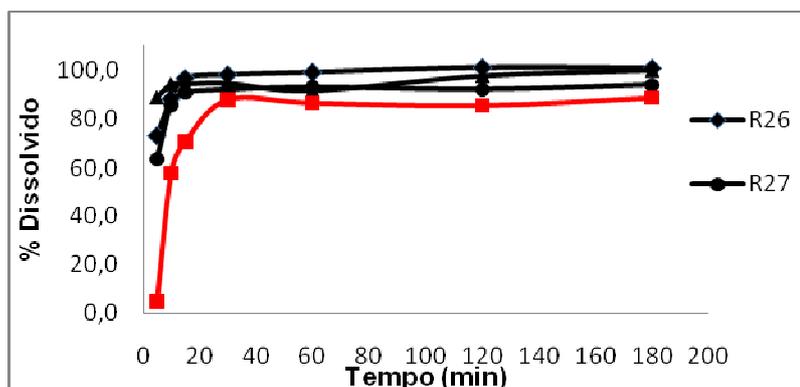


Figura 65 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R26, R27, R28 e dos comprimidos em pH1,2.

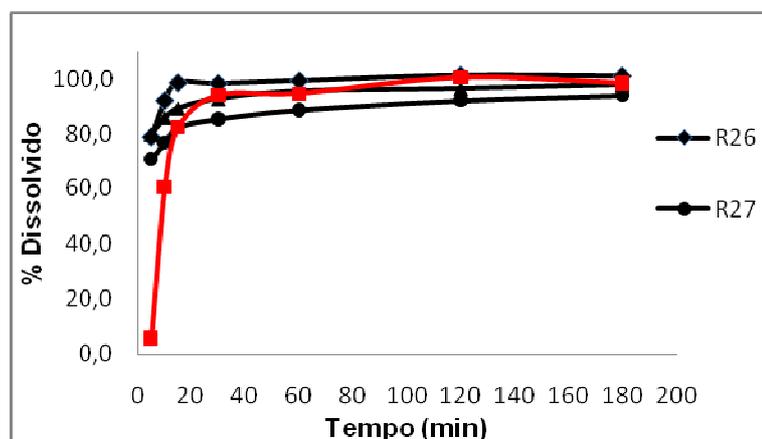


Figura 66 - Perfil de dissolução de PZQ dos produtos R26, R27, R28 e dos comprimidos em pH6,8.

Conforme pode ser observado, não houve alterações significativas nas taxas de liberação, que são altas e similares as do PZQ puro. Nem mesmo a redução da concentração de lauril sulfato de sódio na reação R28 influenciou de maneira significativa a cinética de liberação. Esses resultados estão em concordância com os apresentados anteriormente, mostrando que a cinética de liberação de PZQ das nanopartículas pode ser controlada adequadamente com a manipulação da receita da reação.

5.6.7. SEPARAÇÃO DO PZQ

Um dos desafios fundamentais do trabalho, em particular à remoção do gosto, é a separação do PZQ não encapsulado do meio aquoso. Testaram-se alguns procedimentos de purificação, como filtração, separação em coluna cromatográfica e centrifugação. De todos os testes realizados, o que apresentou melhor resultado foi a centrifugação.

Observou-se que, com o passar do tempo, ocorria a sedimentação de um material cristalino no fundo do frasco, em que ficava armazenada a emulsão. Sabe-se que, quanto menor é a temperatura, menor é a solubilidade do PZQ na fase aquosa. Dessa forma, colocou-se a emulsão na geladeira a 6°C e depois de 24 horas centrifugou-se a mesma a 10.000 rpm por 8 minutos a 10°C. A operação levou a uma perda de 25% da emulsão original. A perda é alta se comparada com a massa de PZQ que não é encapsulada, demonstrando que o processo também resulta em perda de nanopartículas. Entretanto, o processo de centrifugação pode ser otimizado. Ambas as frações, sobrenadante e precipitado, foram levadas ao liofilizador para secagem e posterior caracterização. Após a secagem, os materiais sólidos foram novamente suspensos em água e caracterizados quanto ao sabor. O sobrenadante não apresentou o gosto amargo característico do PZQ, mostrando que o PZQ presente na água é responsável pelo gosto ruim das amostras originais.

5.6.8. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS CENTRÍFUGADAS - PRECIPITADO E SOBRENADANTE

5.6.8.1. Análises de DSC

As análises de DSC realizadas anteriormente não foram capazes de detectar a quantidade de PZQ que havia fora das nanopartículas, provavelmente por causa das pequenas quantidades. Apesar disso a análise foi realizada novamente para as duas frações resultantes da centrifugação, com o intuito de observar eventuais diferenças entre essas reações. Os resultados estão mostrados nas Figuras 67 e 68.

As reações R27 e R28 foram denominadas por .1 e .2, uma vez que, como comentado anteriormente, cada reação foi preparada em duplicata. A principal diferença existente entre as reações R27 e R28 foi a quantidade de LSS empregada na formulação (R27 apresentou 5% de LSS em relação a concentração de monômero e R28 2,5%). Diante dos resultados observa-se que os precipitados obtidos das emulsão após o processo de centrifugação apresentam a transição endotérmica característica do PZQ, ao contrário dos sobrenadantes. Esse é um bom indicativo de que o PZQ está presente no material precipitado, como proposto anteriormente.

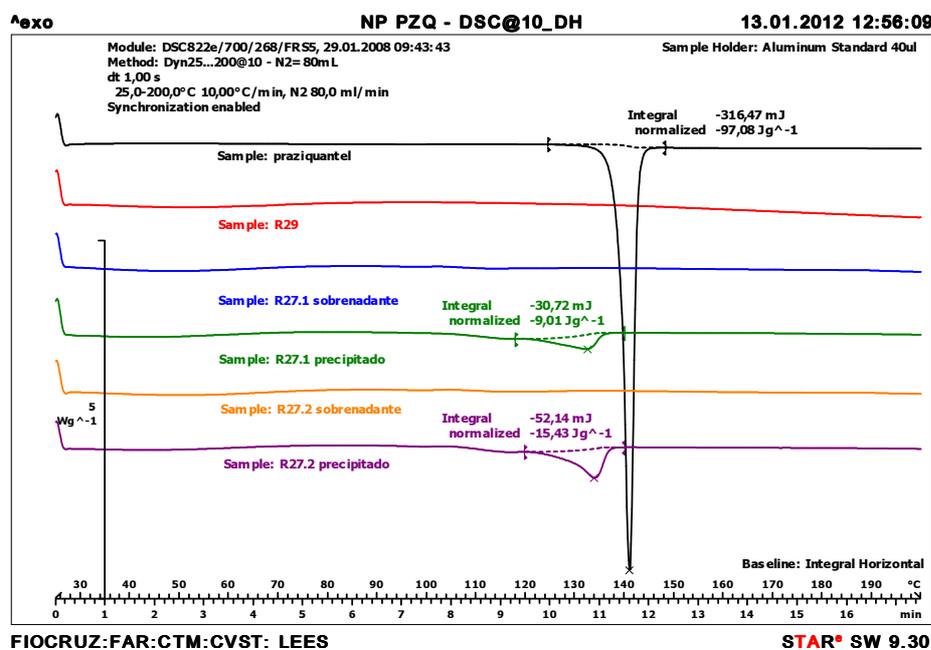


Figura 67 - Termogramas obtidos para amostra de PZQ; de produtos das reações R27 e R29.

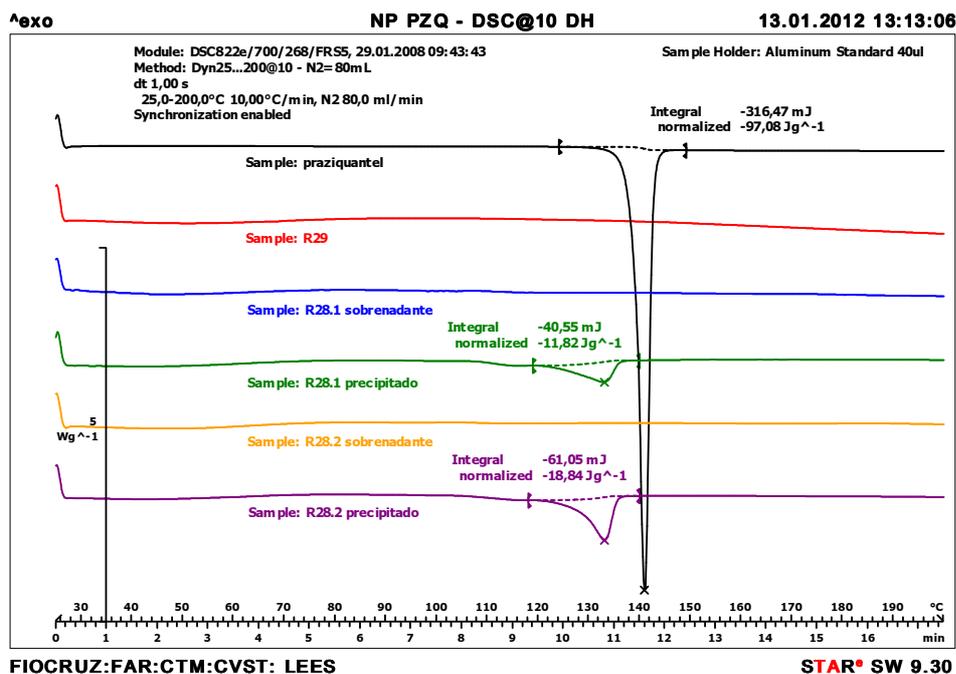


Figura 68 - Termogramas obtidos para as amostras de PZQ; do produto das reações R27 e R29.

Com base nos resultados apresentados, estimou-se a quantidade de PZQ que não foi encapsulado, comparando-se as entalpias de fusão medidas. Considerou-se o PZQ puro com valor de 100%. Os resultados obtidos sugerem perda de PZQ de 12,6% para R27 e 15,7% para R28 como sugerido pelas medidas independentes de encapsulamento.

5.6.8.2. Doseamento de PZQ

A quantificação de PZQ por cromatografia líquida também foi realizada para as emulsões tratadas e não tratadas por centrifugação. Os resultados estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Teor de PZQ obtido para as amostras centrifugadas e não centrifugadas.

Amostra	Teor (%)		
	Sem tratamento	Sobrenadante	Precipitado*
R26	98,0	70,1	27,9
R27	100,9	68,7	32,2
R28	102,4	70,7	31,7

*Obtido por diferença.

Conforme observado, há uma perda estimada em torno de 30%, quando se comparam os teores das amostras sem tratamento e após a centrifugação. Esses resultados estão em conformidade com os encontrados com a perda em massa após a centrifugação, que foi de 25%.

5.6.9. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

Foram planejadas as formulações apresentadas na Tabela 25, usando as nanopartículas obtidas na reação R28 após a centrifugação. A lista das formulações sugeridas e seus objetivos estão descritos nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 26 – Natureza e objetivos das formulações propostas.

Código	Natureza da formulação	Objetivos
AM1	Material nanoestruturado puro suspenso em água	Verificação da suspensibilidade, aspecto e sabor.
AM2	Placebo agente suspensor	Verificação de aspecto e sabor.
AM3	Placebo não aromatizado	Verificação de aspecto e sabor.
AM4	Placebo aromatizado	Verificação de aspecto e sabor.
AM5	Formulação completa diet	Verificação da suspensibilidade, aspecto e sabor.
AM6	Formulação completa com frutose	Verificação da suspensibilidade, aspecto e sabor.

Tabela 27 – Formulações testadas quali-quantitativamente.

Formulação	AM1 ^{a, c} (%)	AM3 ^b (%)	AM4 ^b (%)	AM5 ^b (%)	AM5 ^c (%)	AM6 ^c (%)	Função
Praziquantel 12% nanoestruturado moído	25	-	-	-	25	25	IFA
Tabulose SC 611 (CMC + MCC) – Fab. Blanver	-	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	Agente suspensor
Sacarina sódica	-	-	0,1	0,1	0,1	-	Edulcorante
Ciclamato de sódio moído	-	-	0,2	0,2	0,2	-	Edulcorante
Frutose	-	-	-	-	-	25	Edulcorante
Aroma de banana em pó (Fab. Novo aroma)	-	-	-	0,06	0,06	0,06	Aromatizante

^a Ensaio controle

^b Formulações placebo

^c Concentração de final PZQ na suspensão de 30 mg/ml

Nestes ensaios preliminares não foi utilizado conservante, uma vez que o principal objetivo foi estudar a estabilidade física da formulação. Na etapa posterior de avaliação da estabilidade microbiológica, sugere-se adição na formulação de benzoato de sódio na concentração de 0,3%. No caso das formulações sugeridas, as quantidades de sólidos foram definidas no limite máximo admissível para a formulação de suspensão, com o objetivo de reduzir ao máximo o volume final a ser administrado para a criança. Porém, a avaliação sensorial é importante para avaliar se um teor alto de sólidos causa algum incômodo na administração.

Sugeriu-se inicialmente o uso de aroma de banana na formulação para associação a um produto de característica organoléptica nacional; porém, outros sabores podem ser testados em fases mais avançadas do projeto no futuro.

5.6.9.1. Avaliação física

As formulações AM1, AM5 e AM6 foram submetidas a ensaios de sedimentação em proveta graduada por um período de 4 horas. As observações registradas a cada 15 minutos até o final da primeira hora e depois a cada 1 hora até completar 4 horas de observação. Os aspectos visuais inicial e final após 4 horas de ensaio estão apresentados nas Figuras 69 e 70. Os resultados de sedimentação estão apresentados na Figura 71.

AM1 AM5 AM6



Figura 69 – Aspecto visual inicial dos ensaios de sedimentação.

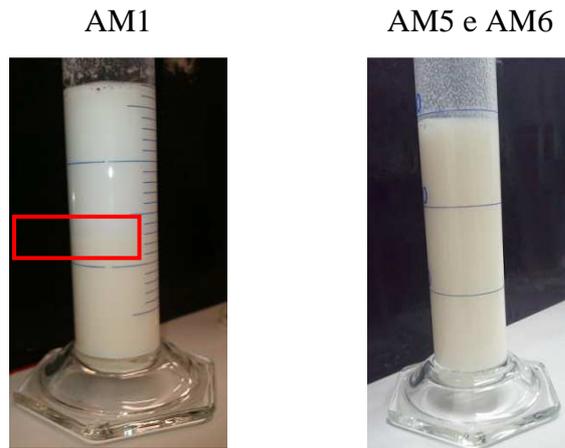


Figura 70 – Aspecto visual final dos ensaios de sedimentação.

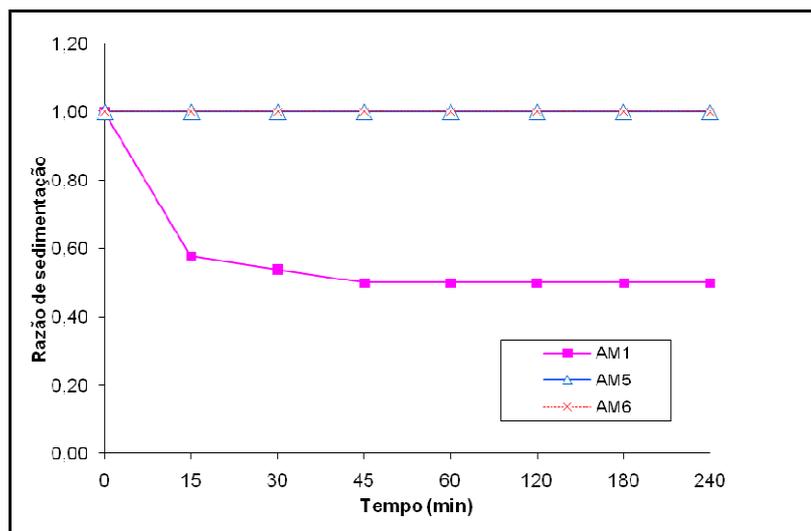


Figura 71 – Gráfico razão de sedimentação em função do tempo para as formulações testadas

A formulação AM1 apresentou uma sedimentação rápida que se manteve durante o tempo de teste. Apesar disso, o material se redispersa facilmente após nova agitação. Não se observou formação de sedimento nas formulações AM5 e AM6. Portanto, a viscosidade fornecida ao meio pelo agente suspensor mostrou-se eficiente para garantir a estabilidade da suspensão por período prolongado. Estudos de viscosidade e reologia devem ser feitos no futuro para complementar o estudo proposto. De qualquer forma, parece claro concluir que a manutenção da estabilidade do meio não constitui desafio expressivo para o projeto.

5.6.9.2. Avaliação Química

O pH das formulações sugeridas é apresentado na Tabela 28.

Tabela 28 - pH das formulações propostas.

Código	pH
AM1	4,42
AM2	6,87
AM3	6,51
AM4	6,33
AM5	5,13
AM6	5,15

O controle de pH desempenha um papel fundamental para obtenção de formas farmacêuticas líquidas eficazes e com características adequadas para os fins a que se destinam. Na realidade, a fixação de um determinado valor de pH se impõe muitas vezes por muitas razões:

- A dissolução do fármaco na concentração pretendida pode depender do pH;
- A manutenção da estabilidade química e farmacodinâmica da preparação pode depender do pH;
- A prevenção do desencadeamento de fenômenos irritativos provocados por certos fármacos está muitas vezes associado ao pH;
- A obtenção de um efeito terapêutico adequado depende do pH do meio.

O pH adequado para uma formulação corresponde ao valor que resulta na máxima estabilidade do fármaco, no uso terapêutico adequado da preparação e na compatibilidade da preparação com os tecidos sobre os quais deve ser aplicada. Tratando-se de soluções destinadas à administração oral, não há necessidade de acertar o pH da formulação por razões de ordem fisiológica. Em tais casos, apenas deve ser considerada a influência do pH sobre a estabilidade dos fármacos dissolvidos. Assim, a solução deve apresentar pH conveniente para a boa conservação dos fármacos nela contidas (PRISTA *et al.*, 1995).

Para a formulação em estudo, sugere-se uma faixa de trabalho de pH entre 4,5 – 5,5 , pois atende tanto ao pH natural do material nanoestruturado puro disperso em água quanto da formulação. Além disso, esta faixa de pH permite uma ação sinérgica mais eficaz dos futuros agentes conservadores (PRISTA *et al.*, 1995). Esta faixa de pH sugerida deve ser comprovada como eficaz posteriormente, por meio de ensaios de estabilidade.

5.6.9.3. Avaliação Sensorial da Formulação Sugerida

Todas as amostras foram "provadas" novamente para as nanopartículas com o fármaco e não foi sentido o gosto amargo característico do PZQ mostrando a princípio o sucesso do trabalho. Entretanto ocorreu uma sensação de areosidade na língua, possivelmente em função do teor de sólidos presente na formulação (25%). Assim, as partículas foram colocadas na formulação proposta, com alto conteúdo de edulcorantes,

e também não foi detectado o gosto amargo do PZQ. No entanto após 10 minutos de preparo, o gosto começa a aparecer para todas as formulações AM1, AM5 e AM6. Esse dado é compatível com os dados apresentados nas Figuras 65 e 66, e mostra que o tempo de liberação pode ser controlado para dar estabilidade ao gosto por tempo especificado. Por exemplo, pode ser modificado o teor do agente reticulante, que exerce efeito significativo sobre a cinética de liberação.

5.7. TESTE IN VITRO

Os ensaios *in vitro* foram realizados no Centro de Pesquisa René Rachou, Unidade da Fiocruz, em Belo Horizonte. Os testes *in vitro* foram realizados em vermes recém retirados de camundongos, após 45 dias de infecção. Os vermes foram plaqueados e divididos em 2 grandes grupos: um contendo meio de cultura RPMI 1640 e outro contendo metanol. O metanol foi empregado porque ele proporciona uma maior liberação do PZQ das nanopartículas. O primeiro grupo era composto do controle, que recebeu apenas o meio de cultura RPMI 1640; nanopartículas de PMMA sem a presença de PZQ nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL, PZQ comprimidos 600 mg, triturados, a 1,0 µg/mL e nanopartículas de PMMA com PZQ, obtida da reação R28, nas mesmas concentrações das nanopartículas sem o fármaco. O segundo grupo possuía as mesmas amostras entretanto no controle havia além de RPMI 1640, metanol, pois as nanopartículas haviam sido suspensas em metanol, para esse grupamento não se realizou a amostra PZQ comprimidos triturados. Após 1 hora do recebimento do tratamento, os vermes foram observados em microscópio invertido. Após 24h, os meios em que os vermes se encontravam foram trocados por meios novos, sem a presença das nanopartículas ou do PZQ. Aguardaram-se mais 24 h e observaram-se novamente as placas. Por fim, ao completar 7 dias, observaram-se as lâminas mais uma vez. Os meios contendo nanopartículas com PZQ e com o pó comprimidos de PZQ foram recolhidos e a concentração de PZQ foi dosada. Esse é o procedimento usual para avaliação da atividade esquistomicida *in vitro*, descritos em alguns trabalhos na literatura (MOURÃO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; ARAUJO *et al.*, 2008a; ARAUJO *et al.*, 2008b; PICA-MATTOCCIA *et al.*, 2009; COUTO *et al.*, 2011)

O resultado do doseamento dos meios mostrou que as concentrações de teste eram inferiores às concentrações nominais, ou seja, nem todo PZQ contido nas nanopartículas e nos comprimidos foi dissolvido. A Tabela 29 mostra as reais concentrações de PZQ usadas nos testes. Conforme apresentado, ficou evidente que as doses livres administradas nos vermes foi bem inferior às doses estipuladas, provavelmente por causa da solubilidade baixa do próprio fármaco nos meios. Os resultados do ensaio *in vitro* estão descritos nas Tabelas 30 e 31 a seguir.

Tabela 29 - Concentrações reais de PZQ administradas nos ensaio *in vitro*

Condições do experimento	Concentração teórica de PZQ (µg/mL)	Concentração real de PZQ (µg/mL)
CP PZQ*	1,00	0,04
Meio RPMI	Nano 0,5	0,50
	Nano 1,0	1,00
	Nano 2,0	2,00
	Nano 0,5	0,50
Meio Metanol	Nano 1,0	1,00
	Nano 2,0	2,00
	Nano 0,5	0,06

Tabela 30 - Resultados obtidos com experimento *in vitro* usando vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos a nanopartículas

PMMA-PZQ - Meio de cultura RPMI 1640.

Grupos / Período de observação	Controle Meio	Controle PZQ-CP	Nano PMMA (0,5µg/mL)	Nano PMMA (1,0µg/mL)	Nano PMMA (2,0µg/mL)	Nano PMMA-PZQ (0,5µg/mL)	Nano PMMA-PZQ (1,0µg/mL)	Nano PMMA-PZQ (2,0µg/mL)
1h de contato	7 vermes com mobilidade e com ovos de 1º estágio.	6 vermes sem movimentos e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	9 vermes com motilidade com ovos de 1º estágio.	7 vermes com motilidade com ovos de 1º estágio.	6 vermes com motilidade com ovos de 1º estágio.	9 vermes sem movimentos e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	7 vermes sem movimento e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	5 vermes sem movimento e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.
24h após contato	6 vermes com motilidade e ovos de 1º, 2º e 3º estágio.	7 vermes sem movimentos e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	7 vermes com motilidade com ovos de 1º e 2º estágio.	6 vermes com motilidade com ovos de 1º e 2º estágio.	6 vermes com motilidade com ovos de 1º e 2º estágio.	8 vermes sem movimentos, 1 com movimentos leves e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	7 vermes sem movimento e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	5 vermes sem movimento e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.
7 dias após contato	3 vermes com motilidade, muitos ovos 1º, 2º estágio e maduros.	3 vermes com movimento, 3 sem movimentos e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	5 vermes com motilidade, muitos ovos mortos, 1º, 2º estágio e maduros.	*Contaminação	4 vermes com motilidade, muitos ovos mortos, 1º, 2º estágio e maduros.	4 vermes sem movimentos e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	4 vermes sem movimentos e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	2 vermes sem movimentos e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.

* Contaminação, refere-se a contaminação microbiana.

Tabela 31 - Resultados obtidos com experimento *in vitro* usando vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos a nanopartículas

PMMA-PZQ - Meio de cultura RPMI 1640 e metanol.

Grupos / Período de observação	Controle Meio	Nano PMMA (0,5µg/mL)	Nano PMMA (1,0µg/mL)	Nano PMMA (2,0µg/mL)	Nano PMMA-PZQ (0,5µg/mL)	Nano PMMA-PZQ (1,0µg/mL)	Nano PMMA-PZQ (2,0µg/mL)
1h de contato	7 vermes com mobilidade e com ovos de 1º estágio.	7 vermes com motilidade e sem ovos.	4 vermes com motilidade com ovos de 1º estágio.	7 vermes com motilidade com ovos de 1º estágio.	8 vermes sem movimentos, 1 com movimentos leves e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	7 vermes sem movimento, 1 com movimentos leves e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	7 vermes sem movimento e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.
24h após contato	5 vermes com motilidade e ovos de 1º, 2º e 3º estágio.	6 vermes com motilidade e com ovos de 1º estágio.	5 vermes com motilidade com ovos de 1º e 2º estágio.	6 vermes com motilidade com ovos de 1º, 2º e 3º estágio.	6 vermes sem movimentos, 1 com movimentos leves e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	8 vermes sem movimento e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	7 vermes sem movimento, 1 com movimentos leves e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.
7 dias após contato	6 vermes com motilidade, muitos ovos mortos, 1º estágio e maduros.	* ¹ Contaminação	* ¹ Contaminação	* ¹ Contaminação	6 vermes sem movimentos, 1 com movimento leves e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	4 vermes sem movimentos, 2 com movimentos leves e sem ovos. Muitas bolhas no tegumento.	*Contaminação

*¹ Os poços de Nano PMMA em metanol contaminaram todos, porém em todas as concentrações os vermes estavam com movimento e apresentavam ovos nos poços.

Quando se comparam as amostras preparadas com comprimidos de PZQ a 1 $\mu\text{g/mL}$ e com as nanopartículas PMMA-PZQ, os resultados diferem após 7 dias. Para a primeira amostra, 3 vermes que não apresentavam movimento voltaram a tê-lo enquanto que para as nano PMMA-PZQ, independente da concentração, isso não ocorreu. Para essas amostras, não houve ovoposição em nenhum dos casos. É observado também que os danos causados no tegumento, as bolhas, não regeneram conforme mostrado nas Figuras 72, 73 e 74. Quando se observam as amostras preparadas com nanopartículas de PMMA sem PZQ, vê-se que após 1 hora da administração os resultados foram semelhantes aos do controle. Mas após 24 horas sem contato mais com as nanopartículas, a quantidade de ovos era menor e após 7 dias havia ovos mortos, o que não foi visto no controle.

Na Tabela 31, observou-se que alguns vermes que foram expostos as nanopartículas PMMA-PZQ voltaram a ter pequenos movimentos após 7 dias, o que não foi observado na condições da Tabela 30. A ovoposição nessas amostras também não ocorreu. Quando comparado os controles, nota-se que o que recebeu apenas o meio RPMI 1640, sem metanol, apresentou uma maior quantidade de ovos e não apresentou ovos mortos após 7 dias. Nesse caso, a mortalidade dos ovos pode ter sido causada pela presença de metanol. Os vermes que foram expostos as nanopartículas de PMMA sem PZQ apresentaram os mesmos resultados da Tabela 30; entretanto, a quantidade de ovos observada foi menor também, provavelmente por conta do metanol presente no meio.

É importante ressaltar que os vermes que voltaram a ter motilidade, apresentaram movimentos extremamente sutis, e que os mesmos continuaram contraídos, conforme mostram as Figuras 72 a 76. Os danos no tegumento também não foram revertidos, como apresentado a seguir. Os números de vermes observados não foram constantes pois em muitos casos os vermes estavam acasalados, só permitindo a observação dos machos.

Conforme pode ser observado, o grupo controle (Fig. 72-A) e o grupo exposto as nanopartículas de PMMA (Fig. 72-B) apresentam movimentos normais, sem alterações, como era de se esperar (ARAUJO *et al.*, 2007). O contrário ocorreu com os vermes expostos ao PZQ comprimido e às nanopartículas de PMMA-PZQ, onde é evidente a contratura dos vermes. Na Figura 74-E é evidente a formação de bolhas no tegumento do verme além da paralização do mesmo após apenas 1 hora do tratamento.

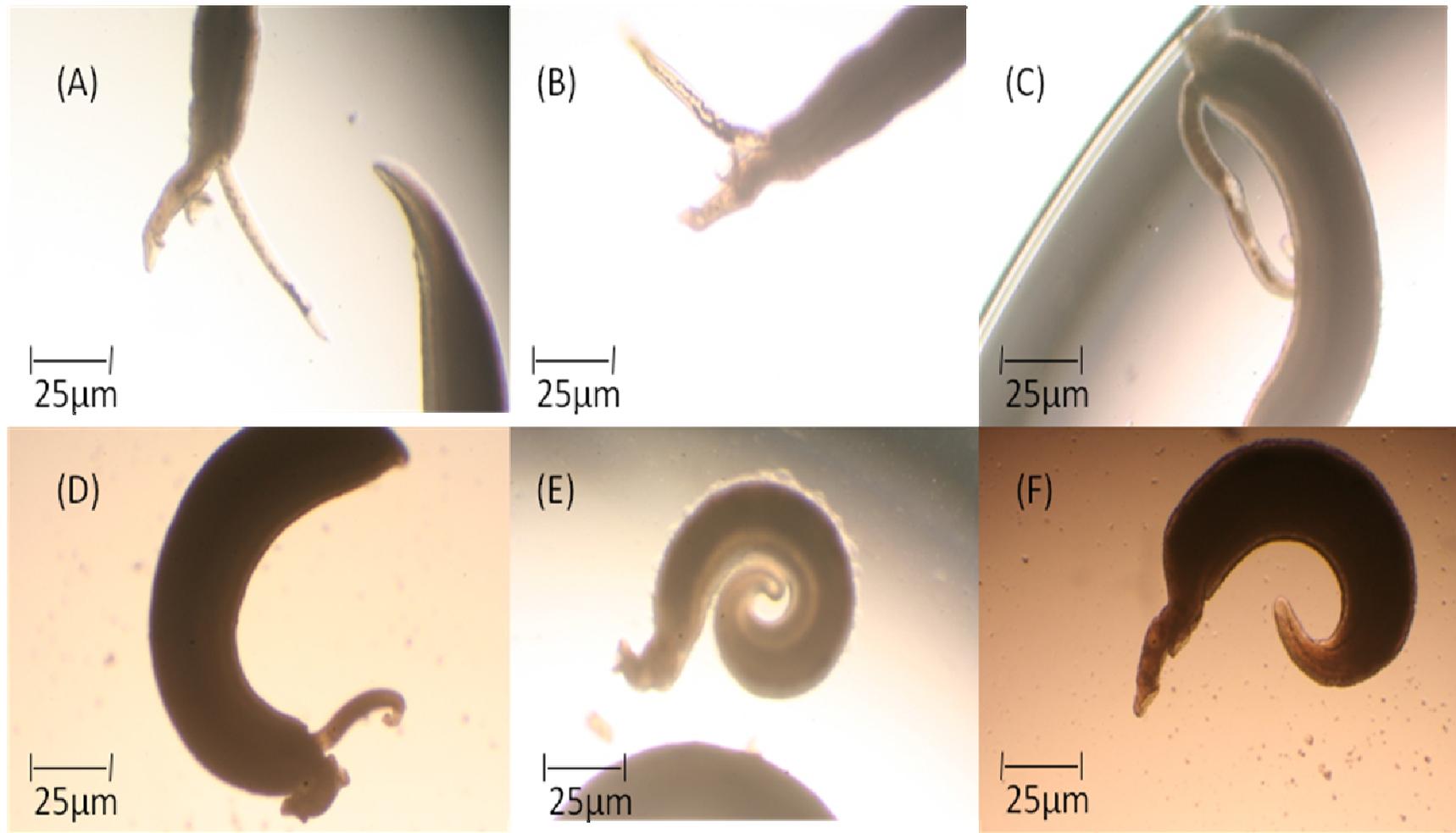


Figura 72 - Vermes 1 hora após receberem o tratamento em meio RPMI 1640. (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 µg/mL; (C) Comprimidos PZQ 1 µg/mL; (D) Nano PMMA-PZQ 0,5 µg/mL; (E) Nano PMMA-PZQ 1,0 µg/mL e (F) Nano 2,0 µg/mL.

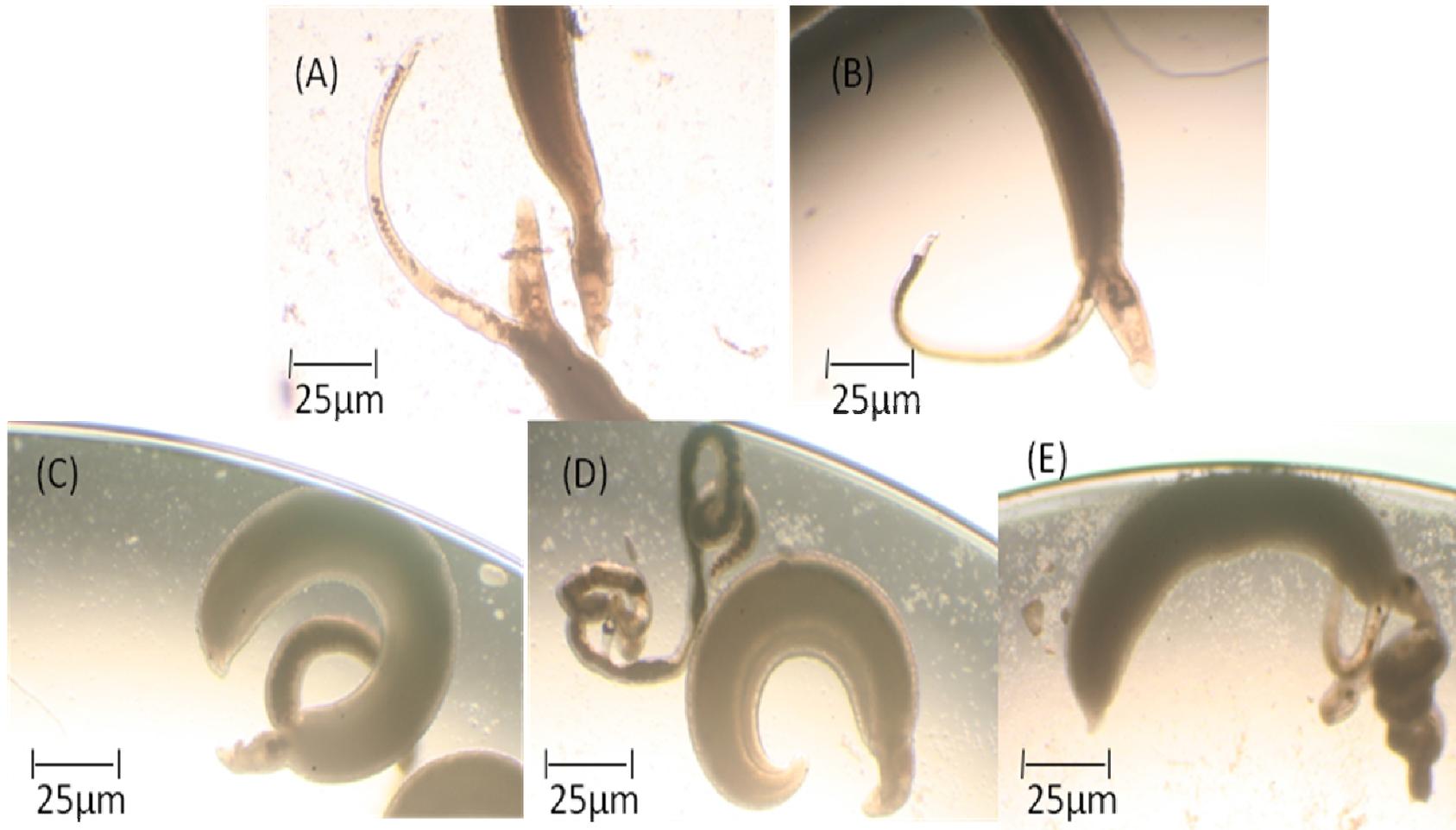


Figura 73 - Vermes 1 hora após receberem o tratamento em meio metanol. (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (C) Nano PMMA-PZQ 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (D) Nano PMMA-PZQ 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (E) Nano 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

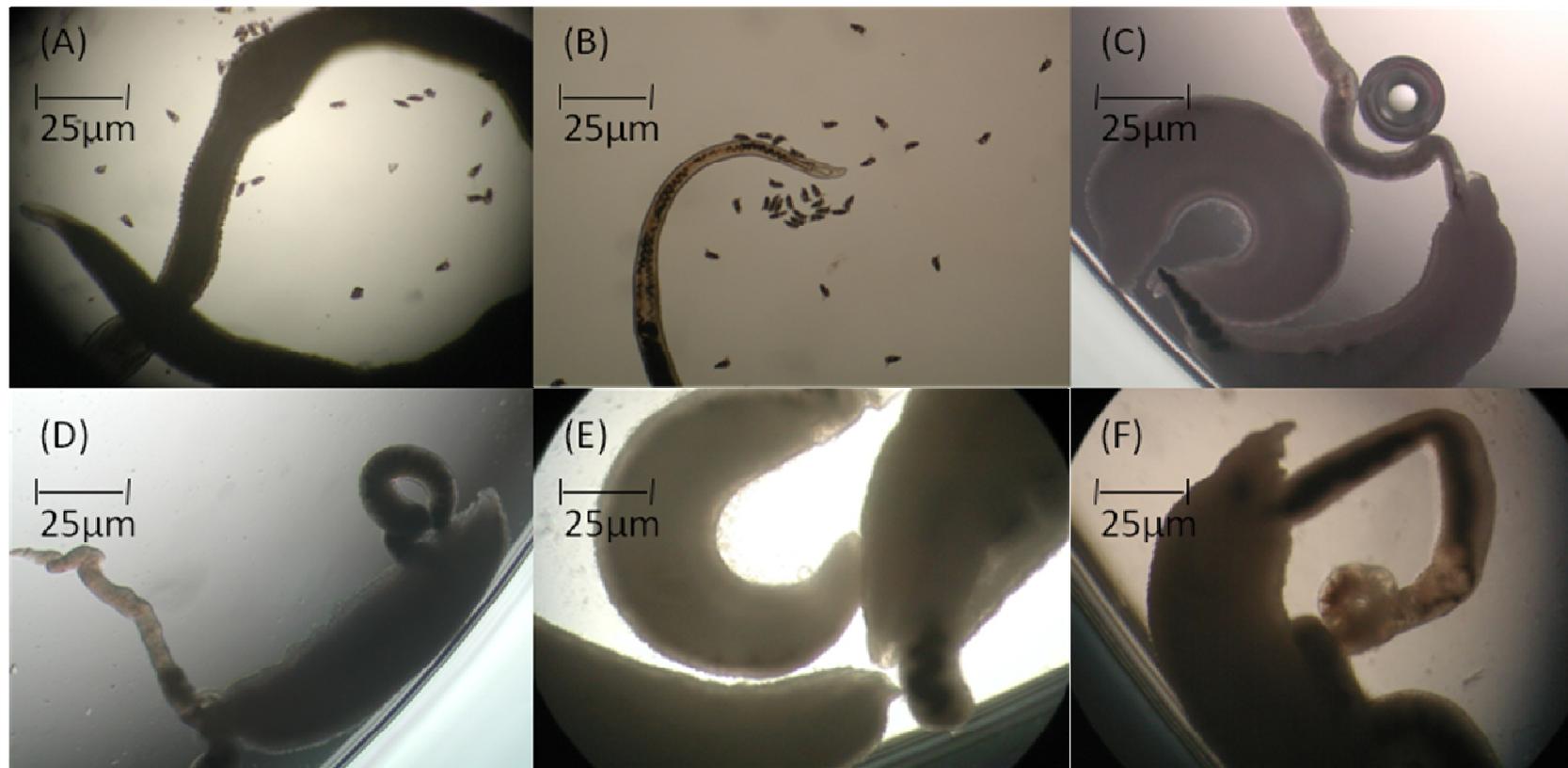


Figura 74 - Vermes 24 horas após a troca do meio (RPMI 1640). (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 $\mu\text{g/mL}$; (C) Comprimidos PZQ 1,0 $\mu\text{g/mL}$; (D) Nano PMMA-PZQ 0,5 $\mu\text{g/mL}$; (E) Nano PMMA-PZQ 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e (F) Nano 2,0 $\mu\text{g/mL}$.

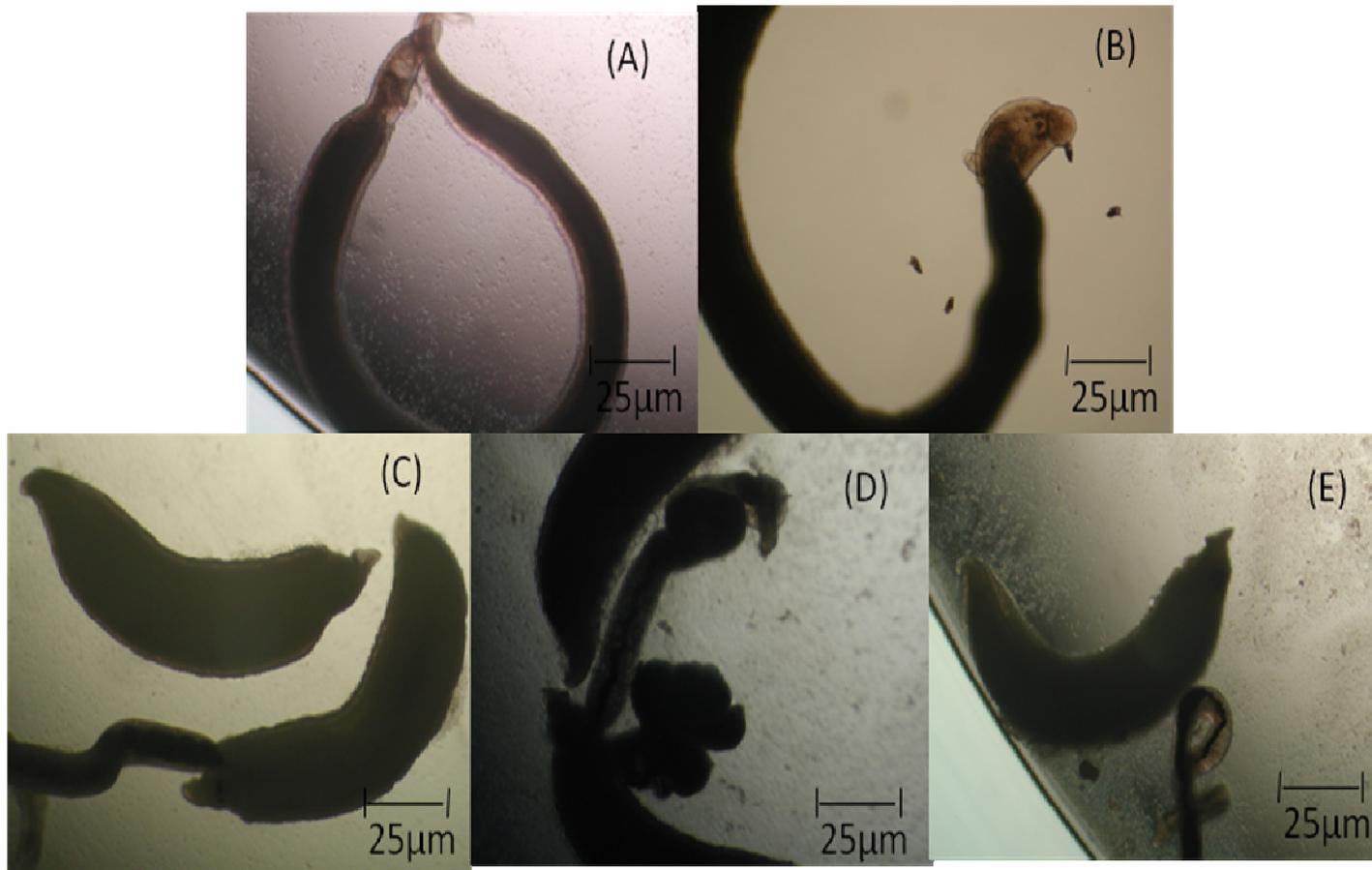


Figura 75 - Vermes 24 horas após a troca do meio (metanol). (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 µg/mL; (C) Nano PMMA-PZQ 0,5 µg/mL; (D) Nano PMMA-PZQ 1,0 µg/mL e (E) Nano 2,0 µg/mL.

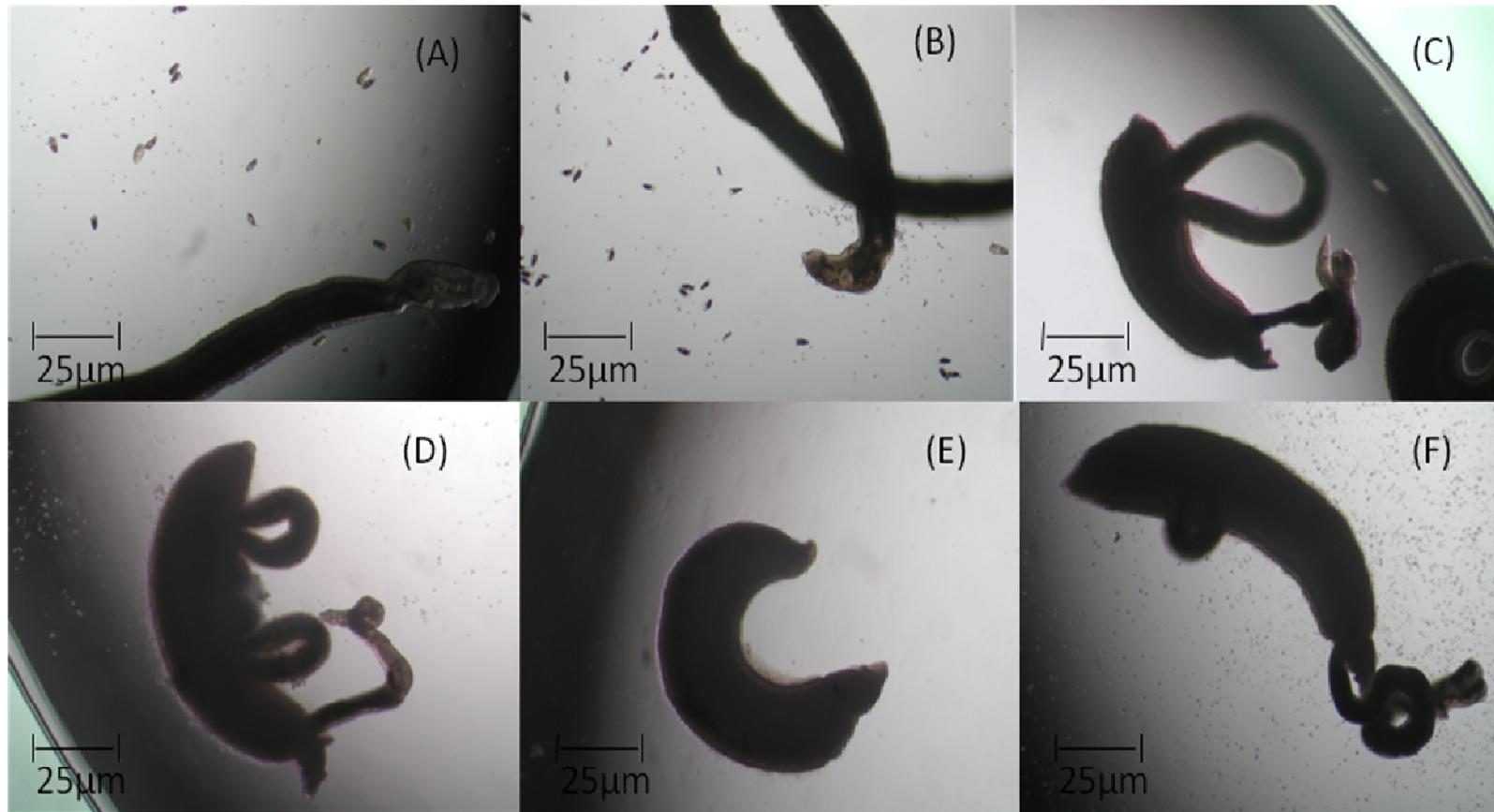


Figura 76 - Vermes 7 dias após a troca do meio (RPMI 1640). (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 µg/mL; (C) Comprimidos PZQ 1,0 µg/mL; (D) Nano PMMA-PZQ 0,5µg/mL; (E) Nano PMMA-PZQ 1,0 µg/mL e (F) Nano 2,0 µg/mL.

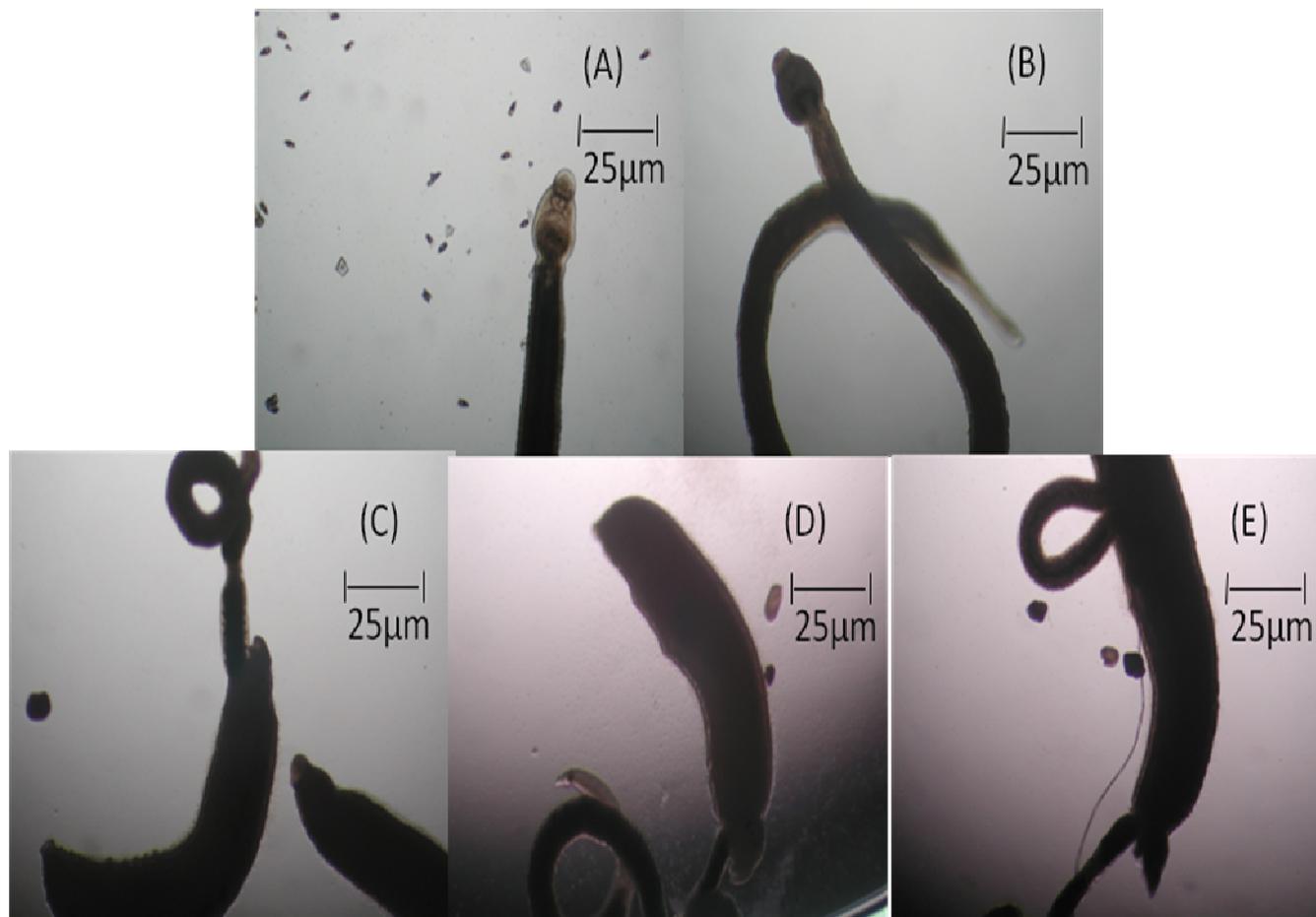


Figura 77 - Vermes 7 dias após a troca do meio em metanol. (A) Controle; (B) Nano PMMA 2 µg/mL; (C) Nano PMMA-PZQ 0,5 µg/mL; (D) Nano PMMA-PZQ 1,0 µg/mL e (E) Nano 2,0 µg/mL.

Os Resultados da Figura 71 foram muito semelhantes ao da Figura 72.

Após 48 horas do início do tratamento, era visível a quantidade de ovos depositada no grupo controle (Fig. 74A) e no grupo expostos ao PMMA (Fig. 74B). Entretanto, não havia ovos nas placas que levaram PZQ, na forma de comprimidos ou de nanopartículas. A contratura dos vermes era mantida (Fig. 74C a 74F) e os danos no tegumento eram mais nítidos.

No meio com metanol também foi observada a ovoposição. Entretanto, na placa com a amostra de nanopartículas de PMMA, a quantidade de ovos foi bem inferior quando comparada com a mesma amostra em RPMI 1640. Os demais resultados foram idênticos.

Ao final dos 7 dias de observação era evidente que os vermes submetidos a amostras contendo o PZQ não recuperaram a sua estrutura e motilidade, estando a maioria praticamente morta. Em relação aos vermes que receberam a amostra nano PMMA, foi observado que a ovoposição foi diminuída, quando comparada ao controle, o que também é um bom sinal. Mesmo não levando à morte do parasita, a presença das nanopartículas de PMMA leva à redução na formação de novos vermes. Esse resultados demonstram a atividade do PZQ, mesmo encapsulado em nanopartículas de PMMA e com concentrações inferiores ao esperado.

5.8. ESTUDOS IN VIVO

Os estudos *in vivo* objetivaram à comprovação da atividade do PZQ nas nanopartículas. Os animais foram divididos em grupo controle, que não receberam medicação nenhuma, dois grupos controle positivo, em que os animais receberam as doses de 200 e 400 mg/kg do PZQ na forma de comprimidos em dose única, e dois grupos teste, que receberam o PZQ nas nanopartículas nas mesmas doses do comprimido. É importante ressaltar que a dose administrada é medida em relação ao fármaco. Os resultados estão resumidos na Tabela 32.

Tabela 32 - Resultados dos ensaios *in vivo*

Grupos	Tempo após o tratamento	Número de animais		Média de vermes*	Distribuição dos vermes (%)		Vermes mortos no fígado (%)	Oograma (%)
		Tratados	Examinados		Mesentério	Fígado		
Controle	-	-	12	50,25	64,4	35,6	0	Sem alteração
Nano PMMA-PZQ 200mg/Kg	30 dias	12	4	18,75	41,7	58,3	10,7	50% de alteração
Nano PMMA-PZQ 400mg/Kg	30 dias	12	2	12,50	50,0	50,0	0	Sem alteração
Cp-PZQ 200mg/Kg	30 dias	12	4	9,25	63,0	37,0	20,0	Sem alteração
Cp-PZQ 400mg/Kg	30 dias	12	5	3,20	10,6	89,4	76,6	100% de alteração

*A média leva em consideração apenas os vermes recuperados vivos (total de fígado e mesentério, sem contar os mortos no fígado, dividido pelo número de camundongos examinados)

Observação: O número de animais examinados foram os sobreviventes do experimentos.

Conforme avaliado nos ensaios propostos, a taxa de mortalidade foi extremamente alta e a média dos vermes recuperada no grupo controle foi bem acima do normal, de 10 a 30%, mostrando que a infecção foi muito forte (ARAÚJO *et al.*, 2008a; ARAÚJO *et al.*, 2008b; WILLIAM *et al.*, 2001). Entretanto, em função do baixo número de animais, esses resultados são qualitativos e novos testes serão realizados posteriormente. A administração da dose do PZQ nas nanopartículas também não foi muito simples em virtude do alto teor de sólidos, a agulha de gavagem entupiu diversas vezes, o que pode ter ocasionado flutuações na dose administrada, esse procedimento também será revisto em novo ensaio futuro. Apesar disso os resultados podem ser considerados promissores. Para finalizar o efeito observado foi de longo prazo em todos os casos e bom nos animais vivos, visto que o tratamento foi feito em dose única.

5.9. ESTUDOS DE TOXICIDADE

5.9.1. CITOTOXICIDADE

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com as nanopartículas sem fármaco, com o PZQ puro e com as nanopartículas com o PZQ encapsulado. Todas as amostras foram dissolvidas em DMSO 5%. As nanopartículas sem fármaco, ou seja, apenas o polímero, nas concentrações 3,59, 14,36 e 39,5 µg/mL não induziram decréscimo de viabilidade celular quando comparado ao valor de 2% para o controle, DMSO 5%. A concentração de 7,18 µg/mL induziu nível reduzido e aceitável de citotoxicidade de 4%; ou seja, não induziu valor superior a 30% de decréscimo de viabilidade celular quando comparados ao DMSO 5%, sendo conseqüentemente empregada no ensaio Cometa. Os resultados de todas as concentrações empregadas no estudo estão na Tabela 33. O praziquantel nas concentrações 0,5, 2,0, 5,5, 13,75 e 35,0 µg/mL não induziram decréscimo de viabilidade celular, quando comparado ao valor de 0% para o controle, DMSO 5%. As concentrações de 1,0 e 13,75 µg/mL de PZQ causaram níveis reduzidos, mas aceitáveis, de citotoxicidade de 2 e 1%. Nesse caso, também todas as concentrações foram utilizadas no ensaio Cometa. A Tabela 33 apresenta todos os resultados.

Por fim, as nanopartículas contendo PZQ em todas as concentrações testadas não induziram decréscimo de viabilidade celular quando comparado ao valor de 1% do controle. Todas as concentrações fizeram parte do ensaio Cometa. A Tabela 35 apresenta todos os resultados.

Conclui-se, portanto, que os materiais produzidos não são citotóxicos.

Tabela 33 - Ensaio de citotoxicidade das nanopartículas sem PZQ (PMMA) em células sanguíneas *in vitro* após 2 horas de tratamento.

Grupos	% de decréscimo de viabilidade celular
Sangue (controle)	0
DMSO 5%	2
PMMA 3,59 µg/mL	2
PMMA 7,18 µg/mL	4
PMMA 14,36 µg/mL	2
PMMA 39,5 µg/mL	1

Tabela 34 - Ensaio de citotoxicidade do PZQ em células sanguíneas *in vitro* após 2 horas de tratamento.

Grupos	% de decréscimo de viabilidade celular
Sangue (controle)	0
DMSO 5%	0
PZQ 0,5 µg/mL	0
PZQ 1,0 µg/mL	2
PZQ 2,0 µg/mL	0

PZQ 5,5 µg/mL	0
PZQ 13,75 µg/mL	1
PZQ 35,0 µg/mL	0

Tabela 35 - Ensaio de citotoxicidade das nanopartículas contendo PZQ em células sanguíneas *in vitro* após 2 horas de tratamento.

Grupos	% de decréscimo de viabilidade celular
Sangue (controle)	0
DMSO 5%	1
PMMA 4,09 µg/mL	0
PMMA 8,18 µg/mL	1
PMMA 16,36 µg/mL	0
PMMA 45,0 µg/mL	0

5.9.2. GENOTOXICIDADE

Os ensaios de genotoxicidade foram realizados primeiramente para o PZQ puro. Os resultados relacionados ao dano ao DNA, estão nas Tabelas 36 e 37.

Conforme os resultados, observou-se que o tratamento com PZQ na faixa de concentração de 0,5 a 35 µg/mL não induziu dano significativo ao DNA ($p > 0,1$) em relação ao DMSO 5% (Tabela 37). O controle positivo induziu efeito genotóxico bem evidente e significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle. A Figura 78 apresenta as fotografias do microscópio de fluorescência, mostrando quando há dano ao DNA da célula.

Tabela 36 - Efeito do PZQ em células sanguíneas humanas *in vitro*

Grupos	UAT (média)	UAT (erro padrão da média)
Sangue	12,5	8,5
DMSO 5%	24,0	15,0
PZQ 0,5 µg/mL	13,5	5,5
PZQ 1,0 µg/mL	22,0	1,0
PZQ 2,0 µg/mL	25,0	2,0
PZQ 5,5 µg/mL	23,0	6,0
PZQ 13,75 µg/mL	48,5	0,5
PZQ 35,0 µg/mL	29,0	12,0
MMS 160 µM	520,5	17,5

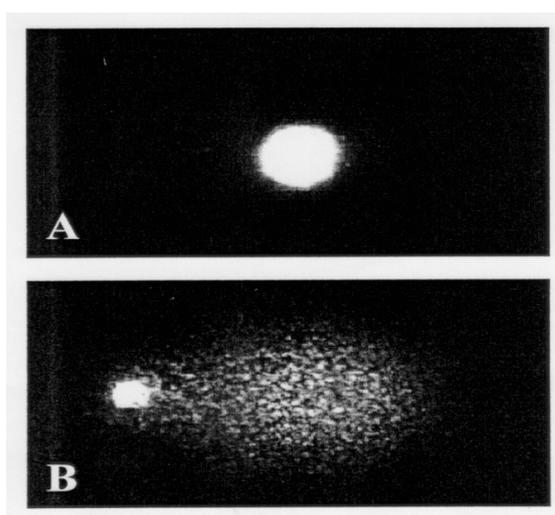


Figura 78 - Fotomicrografias de linfócitos humanos no ensaio Cometa; (A) Célula não tratada (controle), (B) Célula exibindo migração aumentada de DNA após tratamento com substância mutagênica (MMS)

Tabela 37 – Análises estatística - Efeito do PZQ em células sanguíneas humanas
in vitro

Grupos	UAT	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	Teste F	Teste t
Sangue ¹	4						
		12,5	12,0	8,5	144,5	-	-
Sangue ²	21						
DMSO 5% ¹	9						
		24,0	21,2	15,0	450	-	-
DMSO 5% ²	39						
MMS 160 µM ¹	503						
		520,5	24,7	17,5	612,5	0,57	0,00073
MMS 160 µM ²	538						
PZQ 0,5 µg/mL ¹	19						
		13,5	7,8	5,5	60,5	0,45	0,28928
PZQ 0,5 µg/mL ²	8						
PZQ 1,0 µg/mL ¹	21						
		22,0	1,4	1,0	2	0,084	0,45317
PZQ 1,0 µg/mL ²	23						
PZQ 2,0 µg/mL ¹	23						
		25,0	2,8	2,0	8	0,17	0,47666
PZQ 2,0 µg/mL ²	27						
PZQ 5,5 µg/mL ¹	17						
		23,0	8,5	6,0	72	0,48	0,4781
PZQ 5,5 µg/mL ²	29						
PZQ 13,75 µg/mL ¹	48						
		48,5	0,7	0,5	0,5	0,04	0,17474
PZQ 13,75 µg/mL ²	49						
PZQ 35,0 µg/mL ¹	17						
		29,0	17,0	12,0	288	0,86	0,4095
PZQ 35,0 µg/mL ²	41						

Os ensaios de genotoxicidade realizado com o polímero (ou seja as nanopartículas sem PZQ), estão nas Tabelas 38 e 39.

Tabela 38 - Efeito do PMMA em células sanguíneas humanas *in vitro*

Grupos	UAT (média)	UAT (erro padrão da média)
Sangue	11,0	0,0
DMSO 5%	22,0	4,0
PMMA 3,59 µg/mL	13,0	8,0
PMMA 7,18 µg/mL	23,5	4,5
PMMA 14,36 µg/mL	31,5	3,5
PMMA 39,5 µg/mL	48,0	11,0
MMS 160 µM	324,0	204,0

A Tabela 38 mostra o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT nos dois ensaios para as quatro concentrações de PMMA em DMSO 5% e para o MMS 160 µM. De acordo com os resultados, verificou-se que o tratamento com o PMMA na faixa de concentração de 3,59 a 39,5 µg/mL não induziu dano significativo ao DNA ($p>0,05$) em relação ao DMSO 5% (Tabela 39). O controle positivo induziu efeito genotóxico bem evidente e significativo ($p<0,001$) em relação ao controle. Há no entanto, aparente tendência de aumento de dano com o aumento do teor de PMMA no meio.

Tabela 39 – Análises estatística - Efeito do PMMA em células sanguíneas humanas *in vitro*

Grupos	UAT	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	Teste F	Teste t
Sangue ¹	11						
		11,0	0,0	0,0	0,0	-	-
Sangue ²	11						
DMSO 5% ¹	18						
		22,0	5,7	4,0	32,0	-	-
DMSO 5% ²	26						
MMS 160 µM ¹	528						
		324,0	288,5	204,0	83232,0	0,57	0,1839
MMS 160 µM ²	120						
PMMA 3,59 µg/mL ¹	5						
		13,0	11,3	8,0	128,0	0,59	0,2101
PMMA 3,59 µg/mL ²	21						
PMMA 7,18 µg/mL ¹	28						
		23,5	6,4	4,5	40,5	0,92	0,4132
PMMA 7,18 µg/mL ²	19						
PMMA 14,36 µg/mL ¹	28						
		31,5	4,9	3,5	24,5	0,91	0,1079
PMMA 14,36 µg/mL ²	35						
PMMA 39,5 µg/mL ¹	37						
		48,0	15,5	11,0	242	0,44	0,0782
PMMA 39,5 µg/mL ²	59						

Por fim foram realizados os ensaios de genotoxicidade com as nanopartículas poliméricas contendo o PZQ (NP), os resultados estão mostrados nas Tabelas 40 e 41.

Tabela 40 - Efeito das nanopartículas com PZQ em células sanguíneas humanas *in vitro*

Grupos	UAT (média)	UAT (erro padrão da média)
Sangue	22,0	1,0
DMSO 5%	17,5	2,5
NP* 4,09 µg/mL	14,0	1,0
NP* 8,18 µg/mL	22,0	6,0
NP* 16,36 µg/mL	28,5	3,5
NP* 45,0 µg/mL	28,5	6,5
MMS 160 µM	518,0	35,0

*NP = nanopartículas contendo PZQ

A Tabela 40 mostra o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT nos dois ensaios para as quatro concentrações e para o MMS 160 µM. De acordo com os resultados, verificou-se que o tratamento com as nanopartículas contendo PZQ na faixa de concentração de 4,09 a 45,0 µg/mL, não induziu dano significativo ao DNA ($p > 0,05$) em relação ao DMSO 5% (Tabela 40). O controle positivo induziu efeito genotóxico bem evidente e significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Tabela 41 – Análises estatística - Efeito das nanopartículas em células sanguíneas humanas *in vitro*

Grupos	UAT	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	Teste F	Teste t
Sangue ¹	23						
		22,0	1,4	1,0	0,0	-	-
Sangue ²	21						
DMSO 5% ¹	20						
		17,5	3,5	2,5	32,0	-	-
DMSO 5% ²	15						
MMS 160 µM ¹	553						
		518,0	49,5	35,0	83232,0	0,04	0,0223
MMS 160 µM ²	483						
NP* 4,09 µg/mL ¹	13						
		14,0	1,4	1,0	128,0	0,48	0,1616
NP* 4,09 µg/mL ²	15						
NP* 8,18 µg/mL ¹	16						
		22,0	8,5	6,0	40,5	0,50	0,2802
NP* 8,18 µg/mL ²	28						
NP*16,36 µg/mL ¹	25						
		28,5	4,9	3,5	24,5	0,79	0,0624
NP*16,36 µg/mL ²	32						
NP* 45,0 µg/mL ¹	22						
		28,5	9,2	6,5	242	0,47	0,1275
NP* 45,0 µg/mL ²	35						

Diante dos resultados apresentados para genotoxicidade, através do ensaio Cometa, realizado com o PZQ, o PMMA e as nanopartículas contendo PZQ encapsulado, indicam que estes materiais não induziram dano ao DNA.

CAPÍTULO 6

Conclusões

Diante dos resultados expostos, algumas conclusões podem ser obtidas. A primeira delas foi que as reações de polimerização por miniemulsão *in situ* foram adequadas a síntese de nanopartículas contendo PZQ encapsulado. A conversão das reações após alguns ajustes conseguiu alcançar sua totalidade ficando em torno de 100%. Dessa forma, a incorporação de fármacos de baixa solubilidade aquosa em uma única etapa durante a formação (síntese) das nanopartículas é viável e bem interessante as indústrias farmacêuticas, desde que o fármaco suporte bem as condições do meio reacional.

O praziquantel, fármaco alvo do estudo, quando incorporado nas nanopartículas poliméricas não apresentaram em nenhuma das análises realizadas indícios de interação química entre o fármaco e o polímero, mantendo suas propriedades íntegras.

Diversas receitas foram testadas; entretanto, as nanopartículas com EGDMA apresentaram uma cinética de liberação adequada, 85% em 15 minutos em todas as faixas de pH testadas, o que não ocorreu com as partículas que levaram Eudragit E-100® na sua composição. As reações que não receberam Eudragit® nem EGDMA apresentaram uma cinética de liberação inferior as demais.

O teor máximo de PZQ que se conseguiu incorporar nas nanopartículas poliméricas foi de aproximadamente 12% em relação a massa do polímero. O ideal seriam concentrações em torno de pelo menos 30%.

As nanopartículas com fármaco mostraram boa atividade *in vitro*, mostrando que a atividade do PZQ permanece inalterada quando o mesmo está encapsulado nas nanopartículas, não comprometendo a eficiência do fármaco.

O mascaramento do gosto não foi conseguido como desejado, o gosto amargo, característico do PZQ, aparece rapidamente após contato com a água, mostrando que a reticulação do polímero gerou uma boa cinética de dissolução, entretanto permitiu uma rápida liberação do fármaco, o que não era desejado.

O estudo de citotoxicidade e genotoxicidade demonstraram que as nanopartículas poliméricas, na ausência ou presença do PZQ, não apresentam toxicidade significativa sendo uma segurança para a utilização das mesmas em uma formulação farmacêutica.

Por fim, todas as técnicas de caracterização foram adequadas ao objetivo do trabalho.

CAPÍTULO 7

PERSPECTIVAS FUTURAS

As perspectivas são inúmeras e muito trabalho ainda precisa ser feito para se obter de fato um medicamento. Uma das primeiras ações é mexer na reticulação do polímero tentando fazer com que o fármaco demore um pouco mais para ser liberado, fazendo com que o pó para suspensão ao entrar em contato com a água permita um mascaramento de sabor de pelo menos 1 hora, tempo suficiente para a deglutição de uma criança. Nesse contexto está sendo avaliado um outro veículo para a suspensão, como um veículo aquoso, que segure um pouco mais a liberação do fármaco, como um veículo oleoso por exemplo. Tentativas serão feitas também, para se aumentar a taxa de incorporação do fármaco, alternativas já estão sendo estudadas e o objetivo é diminuir a quantidade de pó a ser injerida.

Os ensaios *in vivo* serão repetidos, uma vez que os mesmos não foram tão conclusivos. Além disso a avaliação da farmacocinética do PZQ em ratos, a partir das diferentes nanopartículas contendo PZQ será realizada. O objetivo é inclusive comparar as nanopartículas de liberação lenta contra as partículas de dissolução rápida. Isso porque as nanopartículas de liberação retardada podem ser interessantes e possuem a vantagem de mascarar por mais tempo o gosto do PZQ. Na questão dos ensaios *in vivo* é fundamental estudar a distribuição das nanopartículas nas membranas do organismo através de ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Por fim, após todos os ajustes, é o trabalho de aumento de escala (*scale up*) para produção das nanopartículas em escala industrial e semi-industrial.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFIA

- Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Stainmesse, S.; Fessi, H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 58, p. 1688-1713, 2006a.
- Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Fessi, H. Freeze-drying of nanocapsules: impact of annealing on the drying process. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 324, p. 74-82, 2006b.
- Ahlin, P.; Kristil, J.; Kristil, A.; Vrecer, F. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 239, p. 113-120, 2002.
- Ajikumar, P. K.; Devaky, K. S. EGDMA-cross linked polystyrene resin: An efficient support for gel phase peptide synthesis. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, v.112, n.4, p.465-474, 2000.
- Alonso, M.J.; Losa, C.; Calvo, P.; Vila-Jato, J.L. Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 68, p. 69-76, 1991.
- Amidon, G. L.; Lennernas, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- Ammouy, N.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Dubrasquet, M.; Benita, S. Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(D,L-lactide) and poly(isobutyl-cyanoacrylate) nanocápsulas in rats. *Pharmaceutical Research*, v. 8, p. 101-105, 1991.
- Ansel, H. C.; Popovich, N. G.; Allen, L. V. *Formas Farmacêuticas: considerações biofarmacêuticas. Farmacotécnica formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos*. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, p. 65-112, 2000.

- Ansel, H. C.; Popovich, N. G.; Allen, L. V. Suspensões orais, emulsões, magmas e géis. Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, p. 281-315, 2000.
- Antonietti, M.; Landfester, K. Polyreactions in miniemulsion. Progress in polymer Science, v. 27, p. 689-757, 2002.
- Akbarieh, M.; Besner, J. G.; Galal, A.; Tawashi, R. Liposomal delivery system for the targeting and controlled release of praziquantel. Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 18 (3), p. 303-317, 1992.
- Araujo, L.; Sheppard, M.; Löbenberg, R.; Kreuter, J. Uptake of PMMA nanoparticles from the gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and in oil vehicles. International Journal of Pharmaceutics, v. 176, p. 209-224, 1999.
- Araujo, N.; Mattos, A. C. A.; Coelho, P. M. Z.; Katz, N. Association of oxaminiquine praziquantel and clonazepam in experimental schistosomiasis mansoni. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 103, n. 3, p. 781-785, 2008a.
- Araujo, N.; Mattos, A. C. A.; Sarvel, A. K.; Coelho, P. M. Z.; Katz, N. Oxaminiquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental schistosomiasis mansoni. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 103, n. 5, p. 450-454, 2008b.
- Araújo, P. H. H. Distribuição de Tamanho de Partícula em Sistemas Heterogêneos de Polimerização. 1999. 273p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Engenharia Química / COPPE – UFRJ, Rio de Janeiro.
- Asua, J. M. Miniemulsion polymerization. Progress in polymer Science, v. 27, p. 1283-1346, 2002.
- Aulton, M. E. Secagem. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Artemed Editora, p. 393-399, 2005.
- Aulton, M. E. Suspensões e emulsões. Delineamento de formas farmacêuticas. 2 ed. São Paulo: Artemed, p. 341-368, 2005.
- Avgoustakis, K.; Beletsi, A.; Panagi, Z.; Klepetsanis, P.; Karydas, A.G.; Ithakissios, D.S. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle

- degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *Journal of Controlled Release*, v. 79, p. 123-135, 2002.
- Azema, N. Sedimentation behaviour study by three optical methods – granulometric end electrophoresis measurements, dispersion optical analyser. *Powder Technology*, v. 165, p. 133-139, 2006.
 - Beckert, T.; Lehmann, K.; Schmidt, P. Compression of enteric-coated pellets to disintegration tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 143, p. 13-23, 1996.
 - Becket, G.; Schep, L. J.; Tan, M. Y. Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with α -, β - and γ -cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 179, p.65-71, 1999.
 - Berton, M.; Alléman, E.; Stein, C.A.; Gurny, R. Highly loaded nanoparticulate carrier using an hydrophobic antisense oligonucleotide complex. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 9, p. 163-170, 1999.
 - Birchal, V.; Passos, M. L.; Wildhagen, G.; Mujumdar, A. Effect of spray-dryer operating variables on the whole milk powder quality. *Drying Technology*, V. 23, p. 611-636, 2005.
 - Brasil. Fundação Oswaldo Cruz. Farmanguinhos. Memento Terapêutico. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. 302 p. (Textos Básicos de Saúde). ISBN 8533411944.
 - BRASIL. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudo de estabilidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, 29 jul. 2005. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>.
 - BRASIL. Resolução nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo. *Diário Oficial da União*, Brasília, 11 agosto de 2010. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>. BROADhead, J.; Edmond Rouan, S. K.; Rhodes, C. T. The spray drying of pharmaceuticals. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, v. 18, p. 1169-1206, 1992.
 - Caffrey. C. R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, p. 433-439, 2007.

- Castro, N.; Medina, R.; Sotelo, J.; Jung, H. Bioavailability of praziquantel increases with concomitant administration of food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 2903- 2904, 2000.
- César-Oliveira, M. A. F.; Zaioncz, S.;Oliveira, A. R. S.; Almeida, M. C. R.; Zawadzki, S. F.; Akcelrud, L.; Aguiar, M.; Tabak, D.; Lucas, E. F. Síntese de copolímeros metacrílicos através da modificação química do poli (metacrilato de metila) de massa molar controlada. *Polímeros*, p. 156-162, 1999.
- Chen, F.; Lou, D.; Yang, J.; Zhong, M. Mechanical and thermal properties of attapulgite clay reinforced polymethylmethacrylate nanocomposites. *Polymer Advanced Technologies*, v. 22, p. 1912-1918, 2010.
- Chen, Y.; Sajjadi, S. Particle formation and growth in a initio emulsifier-free emulsion polymerization under monomer-starved conditions. *Polymer*, v. 50, p. 357-365, 2009.
- Chien, D.C.H E Penlidis, A. On-Line Sensors for Reactors. *JMS - Rev. Macromol Chem Phys. C.30*, p.1-42, 1990.
- Chitsulo, L.; Engels, D.; Montresor, A.; Savioli, L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, v. 77, p. 41-51, 2000.
- Chou, Y. J.; El-Aasser, M. S.; Vanderhoff, J. W. Mechanism of emulsification of styrene using hexadecyltrimethylammonium bromide-cetyl alcohol mixture. *J. Dispers. Sci. Technol.*, v. 1: p. 129-150, 1980.
- Cioli, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol. Today*, v. 14, n. 10, p. 418-422, 1998.
- Clas, S. D.; Dalton, C. R.; Hancock, B. Defferential scanning calorimetry: applications in drug development. *PSTT*, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.
- Cortina, F.V. Modelagem Matemática da Polimerização em Emulsão Utilizando Iniciador Hidrossolúvel e Organo-solúvel. 2007. 84p. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Engenharia Química– Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina – PR.
- Couto, F. F. B.; Coelho, P. M. Z.; Araujo, N.; Kusel, J. R.; Katz, N.; Jannotti-Passos, L. K.; Mattos, A. C. A. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing

- resistence to praziquantel using infected *Biomphalaria Glabrata* snail. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 106, n. 2, p. 153-157, 2011.
- Danielsson, I.; Lindman, B. The definition of microemulsion. *Colloids Surf.*, v.3, p.391-395, 1981.
 - Date, A. A.; Joshi, M. D.; Patravale, V. B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 505-521, 2007.
 - Dayan, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, v. 86, p. 141-159, 2003.
 - Decit - Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Rev Saúde Pública*, v.44, n. 1, p.200-202, 2010.
 - De La Torre, P.; Torrado, S.; Torrado, S. Preparation, dissolution and characterization of praziquantel solid dispersions. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 47, n. 11, p. 1629-1633, 1999.
 - Delie, F. Evaluation of nano- and microparticle uptake by the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 34, p. 221-233, 1998.
 - Damgé, C.; Michel, C.; Aprahamian, M.; Couvreur, P.; Devissaguet, J. P. Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. *J. Control. Release*, v.13, p. 233-239, 1990.
 - Duncan, R. *Nanotechnology- Impact on Healthcare and Regulations*, 2006.
 - Durrer, C.; Irache, J. M.; Puisieux, F.; Duchêne, D.; Ponchel, G. Mucoadhesion of latexes: I. Analytical methods and kinetic studies. *Pharmaceutical Research*, v.11, p. 674-679, 1994.
 - El-Arini, S. K.; Leuenberger, H. Dissolution properties of praziquantel-PVP systems. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 73, p. 89-94, 1998.
 - El-Aasser, M.S.; MILLER, C.M. Preparation of latexes using miniemulsion. In: Asua, J. M., editor. *Polymeric dispersions. Principles and Applications*. Dordrecht: Kluwer, p. 109-26, 1997.

- El-Jaby, U.; McKenna, T. F. L.; Cunningham, M. F. Miniemulsification: An analysis of the use of rotor stators as emulsification devices. *Macromol. Symp.*, v. 259, p. 1-9, 2007.
- El-Jaby, U.; Farzi, G.; Bourgeat-Lami, E.; Cunningham, M.; McKenna, T. F. L. Emulsification for latex production using static mixers. *Macromol. Symp.*, v. 281, p. 77-84, 2009.
- Epiquantel EIPICO Summary of product characteristics, dezembro, 2007.
- Esposito, E.; Cervellati, F.; Menegatti, E.; Nastruzzi, C.; Cortesi, R. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 242, p.329-334, 2002.
- Esteves, A. C. C.; Timmons, A. B.; Trindade, T. Nanocompósito de matriz polimérica: Estratégia de síntese de materiais híbridos. *Química Nova*, v.27, n. 5, p. 798-806, 2004.
- Evonik Industries. Eudragit® Polímeros Acrílicos para Formas Farmacêuticas Sólidas Orais, 2011.
- Farmacopéia Brasileira, 4. ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 1996. Monografia Praziquantel matéria-prima 61.
- Faucheu J.; Gauthier, C.; Chazeau, L.; Cavailé, J. Y.; Mellon, V.; Lami, E. B. Miniemulsion polymerization for synthesis of structured clay/polymer nanocomposites: Short review and recent advances. *Polymer*, v.51, p. 6-17, 2010.
- Fenwick, A.; Savioli, L.; Engels, D.; Bergquist, N. R.; Todd, M. H. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol.*, v. 19, n. 11, p. 509-515, 2003.
- Ferreira, A. O. Guia Prático da Farmácia Magistral. 2ª Edição. Juiz de Fora, MG. 2002
- 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.

- Ferreira, A. A. A.; Prates, E. C.; Fernandes, J. P. S.; Ferrarini, M. Avaliação do efeito da partição de comprimidos de furosemida sobre a uniformidade da dose. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*; n.32, v.1, p.47-53, 2011.
- Ferruti, P. Structure and properties of synthetic polymers of pharmacological and biomedical interest. *Makromol. Chem.*, v. 5, p. 1-14 (1981).
- Flizar, K. A.; Forsyth, R. J.; Li, Z.; Martin, G. P. Effects of dissolved gases in surfactant dissolution media. *Dissolution Technologies*, p. 6-9, 2005.
- Florence, A. T.; Attwood, D. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia*, 3. ed. São Paulo: EDUSP, 2003.
- Fonseca, G. E.; McKenna, T. F.; Dubé, M. A. Miniemulsion vs. conventional emulsion polymerization for pressure-sensitive adhesives production. *Chemical Engineering Science*, v. 65, p. 2797-2810 (2010).
- Fontenot, K. J. J.; Schork, F. J. Miniemulsion polymerization . Fourth International Work-shop on Polymer Reaction Engineering, v. 127, p. 429-439, 1992.
- Formariz, T. P.; Urban, M. C. C.; Júnior, A. A. S.; Gremião, M. P. D.; Oliveira, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármaco. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, p. 301-313, 2005.
- Freitas, S.; Merkle, H. P.; Gander, B. Microencapsulation by solvent extraction / evaporation: reviewing the state of the art of microspheres preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, v. 102, p. 313-332, 2005.
- Fresta, M.; Giammona, G.; Cavallaro, G.; Micali, N.; Furneri, P. M. Pefloxacin mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Characterization of the colloidal drug carrier formulation. *J. Pharm. Sci.*, v. 84, p. 895-902, 1995.
- Frezard, F.; Melo, A. L. Evaluation of the schistomicidal efficacy of liposome-entrapped oxamniquine. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 39 (2), p. 91-100, 1997.

- 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.
- Frezza, T. F.; Madi, R. R.; Banin, T. M.; Pinto, M. C.; Souza, A. L. R.; Gremião, M. P. D.; Allegretti, S. M. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28 (2), p. 209-214, 2007.
- Gamisans, F.; Lacoulonche, F.; Chauvet, A.; Espina, M.; García, M. L.; Egea, M. A. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structures by thermal methods. *International Journal of Pharmaceutics*, v.179, p. 37-48, 1999.
- Gilbert, R.G. *Emulsion Polymerization*. 1st ed., Academic Press, London, 1995.
- Giudici, R. *Polymerization Reaction Engineering: A personal Overview of the State-of-Art*. *Latin Amer. Appl. Res.*, 30, p. 351-356, 2000.
- Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M.C.; Illum, L.; Davis, S.S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, v. 57, p. 171-185, 1999.
- Greenberg, R. M. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? *Int. J. Parasitol.*, v. 35, p. 1-9, 2005.
- Greenwood, R. Review of the measurement of zeta potencial in concentrated aqueous suspension using electroacoustics. *Advanced in Colloid and Interface Science*, v. 106, p. 55-81, 2003.
- Gryseels, B.; Polman, N. K.; Clerinx, J.; Kestens, L. Human schistosomiasis. *Lancet*, v. 368, p. 1106-1118, 2006.
- Guo, Y.; Zetterlund P. B. Particle formation mechanism in radical polymerization in miniemulsion based on in situ surfactant formation without high energy homogenization. *Polymer*, v. 52, p. 4199-4207.
- Guterres, S.S.; Fessi, H.; Barrat, G. ; Devissaguet, J.-P. ; Puisieux, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac : I. Formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 113, p. 57-63, 1995.

- Harkins, W.D. A General Theory of the Reaction Loci in Emulsion Polymerization. *J. Chem.Phys.*, Vol.13, p.381, 1945.
- Hansen, F.K.; Ugelstad, J. Particle nucleation in emulsion polymerization IV. Nucleation in monomer droplets. *J. Polym. Sci. Chem.*, v.17, p. 3069-3082, 1979.
- Herrman, J.; Bodmeier, B. Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*, v. 45, p. 75-82, 1998.
- Hoar, T. P.; Schulman, J. H. Transparent water in oil dispersion: the oleopathic hydromicelle. *Nature*, v. 152, p. 102-105, 1943.
- Holmberg, K.; Jonsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, Ed. John Wiley E Sons, 2002.
- Hombroero-Pérez, M.; Siepmann, J.; Zinutti, C.; Lamprecht, A.; Ubrich, N.; Hoffman, N.; Bodmeier, R.; maincent, P. Non degradable microparticles containing a hydrophilic and / or lipophilic drug: preparations, characterization and drug release modeling. *Journal of Controlled Release*, v. 88, p. 413-428, 2003.
- Hussain, N.; Jaitley, V.; Florence, A. T. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 50, p. 107-142, 2001.
- Illum, L.; Davis, S. S. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (polaxamer 338). *FEBS Letts.*, v. 167, p. 79-82, 1984.
- Ismail, M.; Metwally, A.; Farghaly, A.; Bruce, J.; Tao, L. F.; Bennet, J. L. Characterization of isolates of schistosoma mansoni from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.55, p. 212-218, 1996.
- Jain, R.; Shah, N.; Malick, A. W.; Rhodes, C. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparatives approach. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.24, p. 703-727, 1998.

- Jeon, H-J.; Jeong, Y-I.; Jang, M-K.; Park, Y-H.; Nah, J-W. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* v. 207, p. 99-108, 2000.
- 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.
- Jezyk, N.; Rubas, W.; Grass, G. M. Permeability characteristics of various intestinal regions of rabbit, dog and monkey. *Pharm. Res.*, v. 9, p.1580-1586, 1992.
- Keiser, J.; Ingram, K.; Gutzinger, J. Antiparasitic drugs for paediatrics: systematic review, formulations, pharmacokinetics, safety, efficacy and implications for control. *Parasitology*, v.138, p.1620-1632, 2011.
- Kesisoglou, F.; Panmai, S.; Wu, Y. Nanosizing – Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Advanced Drug Delivery Reviews* v. 59, p. 631-644, 2007.
- Kim, B.; Hwang, S.; Park, J.; Park, H. Preparations and characterization of drug-loaded polymethacrylate microspheres by an emulsion solvent evaporation method. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, p. 811-822, 2002.
- Kocbek, P.; Baumgartner, S.; Kristl, J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics* v. 312 p. 179-186, 2006.
- Kohler, K.; Santana, A. S.; Braisch, B.; Preis, R.; Schuchmann, H. P. High pressure emulsification with nano-particles as stabilizing agents. *Chemical Engineering Science*, v. 65, p. 2957-2964, 2010.
- Kreuter, J. Large-scale production problems and manufacturing of nanoparticles. In: TYLE, P. **Specialized drug delivery system**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 257-266.
- Kreuter, J. Peroral administration of nanoparticles. *Adv. Drug Del. Rev.*, v.7, p. 71-86, 1991.

- Kreuter, J. Nanoparticles - a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006.
- Kristmundsdóttir, T.; Gudmundsson, O.; Ingvarsdóttir, K. Release of diltiazem from Eudragit microparticles prepared by spray-drying. *International Journal of Pharmaceutics*, v.137, p. 159-165, 1996.
- Kriwet, B.; Kissel, T. Poly(acrylic acid) microparticle widen the intercellular spaces of Caco-2 cell monolayer: an examination by confocal laser scanning microscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.42, p. 233-240, 1996.
- Kulkarni, A. R.; Soppimath, K. S. Urea-formaldehyde nanocapsules for the controlled release of diclofenac sodium. *Journal of Microencapsulation*, v.17, p. 449 - 458, 2000.
- Kumar, R. M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 3, p. 234-258, 2000.
- Lambertucci, J. R.; Serufo, J. C.; Gerspacher-Lara, R.; Rayes, A. A. M.; Teixeira, R.; Nobre, V.; Antunes, C. M. F. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Tropica*, 77, p. 101-109, 2000.
- Landfester, K.; Bechthold, N.; Franca, T.; Antonietti, M. Formulation and stability mechanisms of polymerizable miniemulsions. *Macromolecules*, v. 32, p. 5222-5228, 1999.
- Landfester, K. Recent developments in miniemulsions – Formation and stability mechanisms. *Macromol. Symp.*, v. 150, p. 171-178, 2000.
- Landfester, K. Polyreactions in miniemulsions. *Macromol. Rapid Commun.* v. 22, p. 896-936, 2001.
- Landfester, K. Synthesis of colloidal particles in miniemulsions. *Annu. Rev. Mater. Res.*, v. 36, p. 231-79, 2006.
- Landfester, K.; Musyanovych, A.; Mailander, V. From polymeric particles to multifunctional nanocapsules for biomedical applications using the miniemulsion process. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, v. 48, p. 493-515, 2010.

- Langer, K.; Marburger, C.; Berthold, A.; Kreuter, J.; Stieneker, F. Methylmethacrylate sulfopropylmethacrylate copolymer nanoparticles for drug delivery. Part I: Preparation and physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 137, p. 67-74, 1996.
- Lawrence, M. J.; Rees, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 45, p. 89-121, 2000.
- Lenzi, M. K.; Silva, F. M.; Lima, E. L.; Pinto, J. C. Semibatch styrene suspension polymerization process. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 89, p. 3021-3038, 2003.
- Lenzi, M.K; Lima, E.L.; Pinto, J.C. Modelagem da polimerização simultânea de estireno em suspensão e emulsão. *Polímeros*, v. 14, n. 2. São Carlos, 2004.
- Lenzi, M.K. Modelagem da polimerização simultânea de estireno em suspensão e emulsão. Rio de Janeiro, 2002. 141 p. Dissertação (Mestrado – Engenharia Química) – Programa de Engenharia Química – COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Li, M. G.; Lu, W. L.; Wang, J. C.; Zhang, X.; Wang, X. Q.; Zheng, A. P.; Zhang, Q. Distribution, transition, adhesion and release of insulin loaded nanoparticles in the gut of rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.329, p. 182-191, 2007.
- Lim, B-G.; Ching, C-B.; Tan, R. B. H.; NG, S-C. Recovery of (-)-Praziquantel from recemic mixtures by continuous chromatography and crystallisation. *Chemical Engineering Science*, v. 50, n. 14, p.2289-2298, 1995.
- Lima, A. C.; Chaud, M. V.; Gremião, M. P. D. Taxa de dissolução de dispersões sólidas de praziquantel em polietilenoglicol. 5ª Mostra Acadêmica UNIMEP, 2007. Disponível em: www.unimep.br/phpg/mostraacademica/anais/5mostra/5/527.pdf
- Lima, D. R. Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia. Doenças infecciosas e parasitárias. Ed. Medsi, p. 621 (1), 2002a.
- Lima, D. R. Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia. DIMED 2002-C. Ed. Medsi, p. 451-452 (2), 2002b.

- Lin, S. Y.; Kao, Y. H. Tablets study of spray-dried sodium diclofenac enteric-coated microcapsules. *Pharmaceutical Research*, v. 8 (7), p. 919-924, 1991.
- Lindenberg, M.; Kopp, S.; Dressman, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 265-278, 2004.
- Liu, R. *Water-insoluble drug formulation*. Segunda edição. CRC Press. Taylor E Francis Group. 2008.
- Loftsson, T.; Brewster, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.*, v. 85, p. 1017-1025, 1996.
- Lopez, A.; Chemtob, A.; Milton, J. I.; Manea, M.; Paulis, M.; Barandiaran, M. J.; Theisinger, S.; Landfester, K.; Hergeth, W. D.; Udagama, R.; Timothy, M.; Simal, F., Asua, J. M. Miniemulsification of monomer-resin hybrid systems. *Industrial Engineering Chemistry Research*, v. 47, p. 6289-6297, 2008.
- Lucas, E. F.; Soares, B. G.; Monteiro, E. *Caracterização de polímeros*. 1 ed. Ed. E-papers, p. 57-207, 2001.
- Mainardes, R. M.; Evangelista, R. C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 290, p. 137-144, 2005.
- Mainardes, R. M.; Gremião, M. P. D.; Evangelista, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 4, p. 523-530, 2006.
- Maincent, P.; Le Verge, R.; Sado, P.; Couvreur, P.; Devissaguet, J. P. Deposition kinetics and oral bioavailability of vincamicine-loaded polyalkyl cyanoacrylate nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 75, p. 955-958, 1986.
- Manea, M.; Chemtob, A.; Paulis, M.; De La Cal, J. C.; Barandiaran, M. J.; Asua, J. M. Miniemulsification in high-pressure homogenizers. *AIChE Journal*, v. 54, n.1, p. 289-297, 2007.

- Martin, R. J. Review Modes of action of Anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*, 154, p. 11-34, 1997.
- Martin, A. *Physical pharmacy*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p. 362-422.
- Maragos, S.; Archontaki, H.; Macheras, P.; Valsami, G. Effect of cyclodextrin complexation on the aqueous solubility. *AAPS Pharm Sci Tech*, v. 10, n. 4, p.1444-1451, 2009.
- Masuda, H.; Higashitani, K.; Yoshida, H. *Powder Technology Handbook*. Editado por Hiroaki Masuda, Ko Higashitani, Hideto Yoshida. CRC Press. 2006.
- Matsui, D. Assessing the palatability of medications in children. *Paediatric and Perinatal Drug Therapy*, v. 8, n. 2, 2007.
- Merck Index, 13.ed. New Jersey: Merck E Co, p. 1174, 2001.
- Meehan, E.; Saunders, G.; Tribe, K. High performance GPC analysis for reliable polymer characterization. *The Applications Books*, p. 1-2, 2003.
- Meier, H.; Blaschke, G. Investigation of praziquantel metabolism in isolated rat hepatocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 26, p. 409-415, 2001.
- Miller, C. M.; Blythe, P. J.; Sudol, E. D.; Silebi, C. A.; El-Asser, M. S. Effect of the presence of polymer in miniemulsion droplets on the kinetics of polymerization. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, v. 32, p. 2365-2376, 1994.
- Mosqueira, V.C.F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barrat, G. Poly (D, L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, p. 614-626, 2000.
- Mourão, S. C.; Costa, P. I., Salgado, H. R. N.; Gremião, M. P. D. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 295, p.157-162, 2005.

- Müller, R.H.; Jacobs, C.; Kayser, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews* v. 47 p. 3-19, 2001.
- Netz, P. A. E Ortega, G. G. Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. *Sistemas dispersos*. 1ed. Ed. Artmed. 2002. p. 265-289.
- Ngwuluka, N. Application of *in situ* polymerization for desing and development of oral drug delivery systems. *AAPS Pharm. Sci. Tech*, v. 11, n. 4, p. 1603-1611, 2010.
- Norris, D. A.; Sinko, P. J. The role of surface hydrophobicity in the transport of polystyrene microspheres through Caco-2 cell monolayers and intestinal mucin. *Proc. Control. Release Soc.*, v. 24, p. 17-18, 1997.
- Novaes, M. R. C. G.; Souza, J. P.; Araújo, H. C. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. *Química Nova* v. 22 (1), p. 5-10,1999.
- O'Donnell, P.; Vieira-Junior, G.; Chaves, M.; Almeida, F.; Florêncio, M.; Lima Jr, R. C. P.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. Gastro protective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium Heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacological Research*, v. 49, p. 105-111, 2004.
- Oliveira, M. A. M.; Boyer, C.; Nele, M.; Pinto, J. C.; Zetterlund, P. B.; Davis, T. P. Synthesis of biodegradable hydrogel nanoparticles for bioapplications using inverse miniemulsion RAFT polymerization. *Macromolecules*, v.44, p.7167-7175, 2011.
- Oliveira, M. A. M.; Melo Jr., P. A.; Nele, M.; Pinto, J. C. Suspension copolymerization of vinyl acetate and methyl methacrylate in presence of amoxicillin. *Macromolecular Reaction Engineering*, 2012.
- Oliveira, S. M.; Albuquerque, M. C. P. A.; Pitta, M. G. R.; Malagueño, E.; Santana, J. V.; Lima, M. C. A.; Pitta, I.R.; Galdino, S.L. A resposta do *Schistosoma mansoni* mantido *in vitro* frente a derivados imidazolidinônicos. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v. 23 (3), p. 343-348, 2004.
- Olds, G. R.; Dasarathy, S. Schistosomiasis. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, v. 2, p. 88-99, 2000.

- OMS. O controle da esquistossomose: Segundo relatório do comitê de especialistas da OMS / Organização Mundial da Saúde. Rio de Janeiro: FIOCRUZ ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD – OPAS. Sistema de Informação Geográfica em Saúde: Conceitos Básicos. Brasília, p.124, 2002.
- Oneda, F.; Ré, M. I. Effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts. *Powder Technology*, v. 130, p. 377-384, 2003.
- Passerini, N.; Albertini, B.; Perissutti, B.; Rodriguez, L. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 318, p. 92-102, 2006.
- Paul, M.; Fessi, H.; Laataris, A.; Boulard, Y. ; Durand, R. ; Deniau, M. ; Astier, A. Pentamine-loaded poly(DL-lactide) nanoparticles : physicochemical properties and stability work. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 159, p. 223-232, 1997.
- Pignatello, R.; Ferro, M.; Puglisi, G. Preparation of solid dispersions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with acrylic polymers and studies on mechanisms of drug polymer interactions. *AAPS Pharm Sci Tech*, v. 3, n. 2, p. 1-11.
- Piirma, I. Emulsion polymerization. Academic Press, New York, 1982.
- Pica-Matocchia, L.; Doenhoff, M. J.; Valle, C.; Basso, A.; Troiani, A. R.; Liberti, P.; Festucci, A.; Guidi, A.; Cioli, D. Genetic analysis of decreased praziquantel sensitivity in a laboratory strain of schistosoma mansoni. *Acta Tropica*, v.111, p. 82-85, 2009.
- Pillai, O.; Panchagnula, R. Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, p. 447-451, 2001.
- Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W. Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds. 2 ed. Ed. Springer-Verlag, p. I5-I280, 1989.

- Prista, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R. Formas farmacêuticas obtidas por dispersão mecânica. **Farmacotécnica**. v. 1, 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. p. 597-738, 1995.
- Ponchel, G.; Irache, J. M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Advanced Drug delivery Reviews*, v. 34, p. 191-219, 1998.
- Pordeus, L. C.; Aguiar, L. R.; Quinino, L. R. M.; Barbosa, C. S. The Occurrence of Acute and Chronic Forms of the Schistosomiasis Mansonic in Brazil from 1997 to 2006: A revision of literature. *Epidemiol. Serv. Saude*, v.17, n. 3, p.163-175, 2008.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. *Farmacologia. Fármacos Anti-helmínticos*. 4 ed. Ed. Guanabara Koogan, p. 624, 2000.
- Rattes, A. L. R.; Oliveira, W. P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technology*, v. 171 (1), p. 7-14, 2007.
- Rao, J. P.; Geckeler, K. E. Polymer nanoparticle: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, v.36, p.887-913, 2011)
- Rawle, A. Basic principles of particle size analysis. Disponível em: <<http://www.malvern.co.uk>>.
- Reich, M. R.; Govindaraj, R. Dilemmas in drug development for tropical diseases. Experience with praziquantel. *Health Policy*, v. 44, p. 1-18, 1998.
- Reis, C. P.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, v.2, p. 8-21, 2006.
- Richter, J. Evolution of schistosomiasis-induced pathology after therapy and interruption of exposure to schistosomes: a review of ultrasonographic studies. *Acta tropica*, v. 77, p. 111-131, 2000.
- Rollot, J. M.; Couvreur, P.; Roblot-Treupel, L.; Puisieux, F. Physicochemical and morphological characterization of polyisobutyl cyanoacrylate nanocapsules. *J. Pharm. Sci.*, v.75, p.361-364, 1986.

- Romio, A. P.; Bernardy, N.; Senna, E. L.; Araújo, P. H. H.; Sayer, C. Polymeric nanocapsules via miniemulsion polymerization using redox initiation. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, p. 514-518, 2009.
- Roszkowski, P.; Maurin, J. K.; Czarnocki, Z. Enantioselective synthesis of (R)-(-)-praziquantel (PZQ). *Tetrahedron Asymmetry*, 17, p. 1415-1419, 2006.
- Quan, P.; Xia, D.; Piao, H.; Shi, K.; Jia, Y.; Cui, F. Nitrendipine nanocrystals: Its preparation, characterization, and in vitro - in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech*, v. 12, n. 4, p. 1136-1143, 2011.
- Sairam, M.; Babu, V. R.; Naidu, B. V. K.; Aminabhavi, T. M. Encapsulation efficiency and controlled release characteristics of crosslinked polyacrylamide particles. *International Journal of Pharmceutics*, v. 320, p. 131-136, 2006.
- Samakande, A.; Sanderson, R. D.; Hartmann, P. C. Encapsulated clay particles in polystyrene by RAFT mediated miniemulsion polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, p. 7114-7126, 2008
- Sato, Y.; Kawashima, Y.; Takeuchi, H.; Yamamoto, H. In vitro evaluation of floating and drug releasing behaviors of hollow microspheres (microballoons) prepared by the emulsion solvent diffusion method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 253-243, 2004.
- Schaffazick, S.R.; Guterres, S.S.; Freitas, L.L.; Pohlmann, A.R. Caracterização e eatabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- Schaffazick, S.R.; Pohlmann, A.R.; Freitas, L.L.; Guterres, S.S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, vol. 21, p. 99-106, 2002.
- Seijo, B.; Fattal, E.; Treupel, L. R.; Couvreur, P. Desing of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation characterization and loading. *Int. J. Pharm.*, n. 62, p. 1-7 1990.
- Sethia, S.; Squillante, E. Solid dispersion: revival with greater possibilities and applications in oral drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 20, p. 215-247, 2003.

- Shah, S.; Pal, A.; Gude, R.; Devi, S. Synthesis and characterization of thermo-responsive copolymeric nanoparticles of poly (methyl methacrylate-co-N-vinylcaprolactam). *European Polymer Journal*, v. 46, p. 958-967, 2010.
- Silva, C.; Ribeiro, A.; Ferreira, D.; Veiga, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 1, p. 1-20, 2003.
- Skiba, M.; Nemati, F.; Puisieux, F.; Duchêne, D.; Wouessidjewe, D. Spontaneous formation of drug-containing amphiphilic β -cyclodextrin nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 145, p. 241-245, 1996.
- Song, M.; Liao, B. Amodulated DSC characterization of morphology of composite latex particles. *Thermochimica Acta*, n. 423, p. 57-61, 2004.
- Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.
- Souto-Maior, R. M.; Tavares, M. I. B.; Monteiro, E. E. C. Solid state ^{13}C NMR study of methyl methacrylate-methacrylic acid copolymers. *Ann. Magn. Reson.*, v. 4, n.3, p. 69-72, 2005.
- Suleiman, M. I.; A/Karin, E. I.; Ibrahim, K. E. E.; Ahmed, B. M.; Saeed, A. E. M.; Hamid, A. E. M. E. Photo-thermal stability of praziquantel. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 12, n.4, p. 157-162, 2004.
- Suthar, A. M.; Patel, M. M. Formulation and evaluation of taste masked suspension of metronidazole. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, v. 3, n. 1, 2011.
- Taylor, M. Global trends in schistosomiasis control. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 86 (10), p. 738, 2006.
- Teo, B. M.; Ashokkumar, M.; Grieser, F. Sonochemical polymerization of miniemulsion in organic liquids/water mixtures. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 13, p. 4095-4102, 2011.

- Tiarkis, F.; Landfester, K.; Antonietti, M. Preparation of polymeric nanocapsules by miniemulsion polymerization. *Langmuir*, v.17, p. 908-918, 2001.
- Tomar, L. K.; Tyagi, C.; Lahiri, S. S.; Singh, H. Poly (PEGDMA-MMA) copolymeric micro and nanoparticles for oral insulin delivery. *Polymers Advanced Technologies*, v.22, p. 1760-1767, 2011.
- Torchilin, V. P.; Trubetskoy, V. S. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 16, p. 141-155, 1995.
- Tröster, S. D.; Müller, U.; Kreuter, J. Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants. *Int. J. Pharm.*, v. 61, p. 85-100, 1990.
- Uchegbu, I. F.; Schatzlein, A. G. *Polymers in Drug Delivery. Polymeric nanoparticles as Drug Carriers*. 1 ed. Ed. CRC Taylor E Francis Group, 2006a.
- Uchegbu, I. F.; Schatzlein, A. G. *Polymers in Drug Delivery. Selecting the Right Polymer for Biomaterial Application*. 1 ed. Ed. CRC Taylor E Francis Group, 2006b.
- Uhrich, K. E.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. S.; Shakesheff, K. M. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem. Rev.* 99, p. 3181-3198, 1999.
- United States Pharmacopeia. General Chapters, In vitro and in vivo evaluation of dosage forms. 27. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004. Cap. 1088, p. 2670-2675.
- United States Pharmacopeia. Official Monographs, Praziquantel. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008a, p. 3056.
- United States Pharmacopeia. Official Monographs, Praziquantel Tablets. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008b, p. 3057.
- United States Pharmacopeia. General Chapters, Residual Solvents. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008c. Cap. 467, p. 170-175.

- Van Santen, E.; Barends, D. M.; Frijlink, H. W.; Breaking of scored tablets: a review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 53, p. 139-145, 2002.
- Varde, N. K.; Pack, D. W. Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 4, p. 1-17, 2004.
- Vauthier, C.; Bouchemal, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n.5, p. 1025-1058, 2008.
- Verrue, C. C.; Mehuys, E.; Boussery, K.; Remon, J. P.; Pstrovic, M. Tablet-splitting: a common yet not so innocent practice. *Journal of Advanced Nursing*, v. 67, n. 1, p.26-32, 2011.
- Vieira, R.A.M.; Sayer, C.; Lima, E.L.; Pinto, J.C. In-Line and In-Situ Monitoring of Semi-batch Emulsion Copolymerizations Using Near-Infrared Spectroscopy. *J. Appl. Pol. Sci.*, v. 84, p. 2670-2682, 2002.
- Waston, M. Praziquantel. *Journal of Exotic Pet Medicine*, v. 18, n.3, p.229-231, 2009.
- William, S.; Sabra, A.; Ramzy, F.; Mousa, M.; Demerdash, Z.; Bennet, J. L.; Day, T. A.; Botros, S. Stability and reproductive fitness of schistosoma mansoni isolates with decreased sensitivity to praziquantel. *International Journal of Parasitology*, v. 31, p.1093-1100, 2001.
- Woelfle, M.; Seerden, J. P.; Gooijer, J.; Pouwer, K.; Oliaro, P.; Todd, M. H. Resolution of Praziquantel. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 9, p. 1-7, 2011.
- WHO - World Health Organization. Preventive chemotherapy in human helminthiasis, p. 1-56, 2006.
- Yamagata, Y.; Misaki, M.; Kurokawa, T.; Taira, K.; Takada, S. Preparation of a copoly(dl-lactic/glicolic acid)-zinc oxide complex and its utilization to microcapsules containing recombinant human growth hormone. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 251, p. 133-141, 2003.

- Zheng, J. Y.; Keeney, M. P. Taste masking analysis in pharmaceutical formulation development using an electronic tongue. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 310, p.118-124, 2006.
- Zhang, Y.; Zhu, S.; Yin, L.; Qian, F.; Tang, C.; Yin, C. Preparation, characterization and biocompatibility of poly (ethylene glycol) - poly (n-butyl cyanoacrylate) nanocapsules with oil core via miniemulsion polymerization. *European Polymer Journal*, v.44, p. 1654-1661, 2008.
- Zyl, A. J. P.; Wet-Ross, D.; Sanderson, R. D.; Klumperman, B. The role of surfactant in controlling particle size and stability in the miniemulsion polymerization of polymeric nanocapsulas. *European Polymer Journal*, v. 40, p. 2717-2725, 2004.