UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Obtenção de micropartículas contendo dispersões sólidas de praziquantel por secagem por nebulização e estudo de sua estabilidade

Marcela Olaia Machado Pignata

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Obtenção de micropartículas contendo dispersões sólidas de praziquantel por secagem por nebulização e estudo de sua estabilidade

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências no dia 23/06/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Marcela Olaia Machado Pignata

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pignata, Marcela Olaia Machado

Obtenção de micropartículas contendo dispersões sólidas de praziquantel por secagem por nebulização e estudo de sua estabilidade. Ribeirão Preto, 2016
124 p.: Il.;; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Freitas, Luis Alexandre Pedro de

1.Estabilidade. 2.Solubilidade. 3.Eficácia *in vivo.*

4.Análise térmica. 5.Eficácia *in vitro.* *6.Spray dryer.*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcela Olaia Machado Pignata

Obtenção de micropartículas contendo dispersões sólidas de praziquantel por secagem por nebulização e estudo de sua estabilidade

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico aos meus pais Antônio Luis e Flávia que me ensinaram os verdadeiros valores da vida, à minha irmã Marília pelo companheirismo de sempre, por dividir comigo todos os momentos das nossas vidas e por me ensinar a dividir, ao meu marido Fernando por todo apoio e amor em todo momento e à minha filha Sofia pelo simples sorriso de todos os dias que passaram a iluminar minha vida.

Agradecimentos

A Deus, por me manter sempre no caminho certo, me guiando, amparando e fortalecendo nos momentos de que precisei.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas, por estar acompanhando meu desenvolvimento científico desde a Iniciação Científica, dispondo do seu tempo e conhecimento para me ajudar a crescer, pela paciência e apoio em todos os momentos da minha jornada científica.

Aos meus companheiros de jornada e grandes amigos do Laboratório de Desenvolvimento Industrial Farmacêutico (LADIFARP): Anna Beatriz, Ana Rita, Cristiane, Cristina, Daniele, Isabel, Melina, Natália, Rayssa, Rodrigo, Simone, Tatiana e Thiago pelos momentos de alegria e descontração divididos, por toda ajuda a mim dispensada, pelos conselhos, pelas comemorações, enfim, pela amizade.

Aos técnicos de laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP): Henrique Diniz e Luiz Henrique Cenzi por toda a ajuda na execução deste trabalho. Agradeço especialmente a Técnica Áurea Lanchote por todo o apoio em tudo na minha vida, pelos conselhos, pela ajuda, por ter se tornado uma grande amiga, uma pessoa de que gosto muito!

Aos técnicos da FFCLRP Djalma Gianeti e Lourivaldo dos Santos Pereira pela atenção dispensada a mim nesses anos de estudo.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação da FCFRP-USP, em especial a Eleni e Rafael, pela dedicação e empenho em sempre nos auxiliar.

Aos Professores Renata Fonseca Vianna Lopez, Anderson R. M. de Oliveira e João Claudio Thomeo pelas sábias sµgestões e dicas muito bem vindas que contribuíram para a melhoria desse trabalho.

A Professora Silmara Allegretti e toda equipe do Departamento de Biologia Animal da UNICAMP por toda atenção e auxilio na parceria nos estudos de eficácia *in vitro* e *in vivo.*

Aos meus pais, Antônio Luís e Flávia e à minha irmã Marília pelo apoio e carinho, pelas noites sem dormir, por toda a força que sempre tive e todo o exemplo que quero guardar comigo eternamente.

A minha madrasta Camila Valio Machado pelos conselhos, pela ajuda, pelo carinho de sempre que faz de você parte da família.

Aos meus sogros Maria Luiza e José Aµgusto Pignata por tantos anos de convívio, apoio e força, que me aceitaram como família com muito carinho e amor.

Aos meus amigos de longa data: Anelisa Baptista, Francisco Gaspar, Luiz Henrique Silva, Dayane Gutierrez pelos vários momentos de alegrias divididos, pela força, pelas palavras de coragem, pelas orações, pelo apoio nos momentos difíceis, por estarem há tantos anos comemorando comigo as minhas e as suas vitórias.

Ao meu companheiro Fernando, por tantos anos compartilhados e outros tantos que ainda virão, agradeço a paciência e aos momentos de sabedoria.

A minha filha Sofia, que na sua pouca idade já me ensinou tanto que nem consigo mensurar.

À Ourofino Agronegócio pelo fornecimento da matéria prima.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma me deram força e apoio pra seguir em frente,

Muito Obrigada!

"Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir."

Cora Coralina

RESUMO

MACHADO-PIGNATA, M. O. **Obtenção de micropartículas contendo dispersões sólidas de praziquantel por secagem por nebulização e estudo de sua estabilidade.** 2016. 124f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O objetivo deste trabalho foi obter dispersões sólidas microparticuladas contendo praziquantel a fim de aumentar sua solubilidade em água e consequentemente melhorar sua biodisponibilidade *in vivo* e estudar sua estabilidade acelerada. Foram preparadas 4 misturas físicas em proporções diferentes de PZQ e carreador e 8 dispersões sólidas microparticuladas foram obtidas por *spray dryer*. Para controle também foi seco em *spray dryer* o PZQ puro nas mesmas temperaturas do estudo das dispersões. Foi realizada a caracterização dessas amostras por DSC, Raios-x, Infravermelho e MEV. O aumento de solubilidade das misturas físicas não foi significante em relação ao PZQ puro, no entanto as DSM obtidas na temperatura de 70ºC foi significante, com $p \leq 0,05$, e chegaram a ser até 3 vezes maiores. O estudo de dissolução mostrou que ao final de 60 minutos de teste a dispersão sólida estudada obteve um desempenho 6x melhor que o PZQ puro. O MEV mostrou que as partículas ficaram esféricas, de superfície rµgosa, e a eficiência de encapsulação variou de 90 a 100%. Um estudo preliminar de estabilidade das amostras mostrou um aumento na solubilidade em relação ao tempo. Sendo assim algumas amostras foram escolhidas para recomeçar o estudo, fazendo um estudo de estabilidade acelerada mais aprofundado avaliando estabilidade quiral do fármaco, perfil de solubilidade, DSC, Raios-X e Infravermelho. Ao avaliar os dados dessa estabilidade acelerada percebemos que esse aumento de solubilidade com o tempo foi ocasionado por uma redução na cristalinidade do fármaco, também com o tempo. Observou-se nos dados de DSC o surgimento de um pico característico de transição vítrea para as DSMs 8, 10, 12 e PZQsd, e essa alteração na transição vítrea possivelmente levou a uma diminuição na mobilidade molecular do sistema dificultando o rearranjamento molecular do fármaco e assim sua recristalização. Foram realizados testes *in vitro* e *in vivo* de eficácia e os resultados mostraram que a dispersão sólida estudada teve excelente eficácia comparada ao PZQ puro. Podemos concluir, portanto, que a técnica escolhida nesse estudo atendeu aos objetivos propostos e foi eficaz no aumento de solubilidade e na eficácia para o tratamento da esquistossomose e que o estudo de estabilidade é de fato importante para dispersões sólidas.

Palavras-chave: estabilidade, solubilidade, eficácia *in vitro*, eficácia *in vivo*, DSC, *spray dryer*.

ABSTRACT

MACHADO-PIGNATA, M. O. **Obtaining of microparticles containing solid dispersions of praziquantel by spray dryer and study its stability.** 2016. 124f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The aim of this study was to produce microparticulated solid dispersions of praziquantel in order to increase its solubility in water and thus improve its bioavailability *in vivo*. Were prepared 4 physical mixtures in different proportions of carrier and 8 solid dispersion microparticles was obtained by spray drying. To control was also dried by spray drying pure PZQ the same temperatures the study of dispersions. The characterization of these samples was performed by DSC, X-rays, infrared and SEM. The increased solubility of the physical mixtures was not significant compared to pure PZQ, but for the samples dried at 70°C was significant compared to pure PZQ and 3folder than PZQ. The dissolution study has shown that the end of the 60minutes test solid dispersion released about 90% drµg, while releasing pure PZQ for the same time the study was about 15%. The SEM showed that the particles were spherical, and shown a “sponge-like” surface. The encapsulation efficiency varied from 90 to 100%. A preliminary study of the stability samples showed an increase in solubility over time. For this reason some samples were chosen for the recommence study, making a further study of accelerated stability evaluating chiral drµg stability, solubility profile, DSC, X-rays, infrared. When considering data that accelerated stability realized that this increase in solubility with time was caused by a decrease in drµg crystallinity, also in time. It was observed in the DSC data the appearance of a characteristic peak of glass transition for the samples 8, 10, 12 and PZQsd, and the change in glass transition possibly led to a decrease in the molecular mobility system avoiding molecular drµg rearrangement and thus its recrystallization. *in vitro in vivo* efficacy tests were carried out and the results showed that the solid dispersion studied had excellent efficacy compared to pure PZQ. Than it can be concluded that the technique chosen in this study met the proposed objectives and was effective in increasing solubility and efficacy for the treatment of schistosomiasis.

Keywords: estability, solubility, *in vitro* efficiency, *in vivo* efficiency, DSC, spray dryer.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA1 - CARAMUJOS DA ESPÉCIE BIOMPHALARIA GLABRATA ALBINA. EXTRAÍDO DE HTTP://WWW.FIOCRUZ.BR/IOC/CGI/CGILUA.EXE/SYS/START.HTM?INFOID=1493&SID=32 27
FIGURA 2 - CICLO BIOLÓGICO DO PARASITO. EXTRAÍDO DE HTTP://WWW.CVE.SAUDE.SP.GOV.BR/HTM/HIDRICA/IF_ESQUI05.HTM 28
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DA ESQUISTOSSOMOSE NO BRASIL. FONTE: BRASIL, 2014 29
FIGURA 4 - PRAZIQUANTEL. *CENTRO QUIRAL 30
FIGURA 5 - DIAGRAMA DE FASES DAS MISTURAS EUTÉTICAS. FONTE: LEUNER & DRESSMAN, 2000. 36
FIGURA 6 - SPRAY DRYER DO LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL FARMACÊUTICO – USP/RP. FONTE: MACHADO-PIGNATA, M. O. 39
FIGURA 7 - PARTE SUPERIOR DO BICO PNEUMÁTICO (ACIMA ENTRADA DO FLUIDO, ABAIXO A ENTRADA DO AR COMPRIMIDO). FONTE: MACHADO-PIGNATA, M. O. 41
FIGURA 8 – CICLONE (FILTRO NA ABERTURA SUPERIOR E FRASCO COLETOR NA ABERTURA INFERIOR). FONTE: MACHADO-PIGNATA, M. O. 42
FIGURA 9- ESQUEMA REPRESENTATIVO DA MEDIÇÃO DO ÂNGULO DE REPOUSO 56
FIGURA 10 - CURVA ANALÍTICA DO PZQ EM ÁGUA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS 62
FIGURA 11 - CURVA ANALÍTICA DO PZQ EM ÁGUA POR CLAE 63
FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DO PZQ NA CONCENTRAÇÃO DE 50µG/ML 65
FIGURA 13 -CROMATOGRAMA DA MISTURA AEROSIL/SORBITOL PARA AVALIAR SELETIVIDADE 65
FIGURA 14 - GRÁFICO DA ANÁLISE DE SOLUBILIDADE DAS MF E DS POR *SPRAY DRYER*. DESVIO PADRÃO ≤5%. 67
FIGURA 15 - CURVA DE DSC DO PRAZIQUANTEL 68
FIGURA 16 - CURVA DE DSC DO SORBITOL E AEROSIL RESPECTIVAMENTE 69
FIGURA 17 - CURVA DE TGA DO PZQ 69
FIGURA 18 - CURVA DE TGA DO SORBITOL E AEROSIL, RESPECTIVAMENTE. 70
FIGURA 19 - DIFRATOGRAMAS DO AEROSIL, SORBITOL E PRAZIQUANTEL 70
FIGURA 20 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO PRAZIQUANTEL 71
FIGURA 21 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO AEROSIL 72
FIGURA 22 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO SORBITOL 72
FIGURA 23 - GRÁFICO DO TESTE DE ESTABILIDADE A 25°. TODAS AS AMOSTRAS APRESENTARAM CV%<5%. CV% = COEFICIENTE DE VARIÂNCIA. 73
FIGURA 24 – GRÁFICO DO TESTE DE ESTABILIDADE A 37°C. TODAS AS AMOSTRAS APRESENTARAM CV%<5%. CV% = COEFICIENTE DE VARIÂNCIA. 73
FIGURA 25 – GRÁFICO DO TESTE DE ESTABILIDADE A 45°C. TODAS AS AMOSTRAS APRESENTARAM CV%<5%. CV% = COEFICIENTE DE VARIÂNCIA. 74
FIGURA 26 - ESTABILIDADE ACELERADA PELA SOLUBILIDADE NA TEMPERATURA DE 40ºC. DESVIO PADRÃO ≤5%. 75

FIGURA 27 - ESTABILIDADE ACELERADA PELA SOLUBILIDADE NA TEMPERATURA AMBIENTE. DESVIO PADRÃO ≤5%. 76
FIGURA 28 - CROMATOGRAMA DA DSM 12 ARMAZENADA POR 6 MESES, SEM PICOS DE DEGRADAÇÃO. 77
FIGURA 29 - ESPECTRO DE VARREDURA 3D DA DSM 12 MOSTRANDO QUE NÃO HÁ PICOS DE DEGRADAÇÃO. 77
FIGURA 30 - ESTABILIDADE ACELERADA PELA SOLUBILIDADE (POR CLAE) DAS DSM 12, PS, PA E PZQSD. DESVIO PADRÃO ≤5%. 78
FIGURA 31 - CROMATOGRAMA DO PZQ PURO 79
FIGURA 32 - ESPECTRO DE VARREDURA 3D DA DSM 12 MOSTRANDO QUE NÃO HÁ PICOS DE DEGRADAÇÃO. 79
FIGURA 33 - ESTABILIDADE QUIRAL DAS AMOSTRAS DSM12, PS, PA E PZQSD. DESVIO PADRÃO ≤5%. 80
FIGURA 34 - A) ESTABILIDADE ACELERADA POR DSC NA TEMPERATURA AMBIENTE E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR DSC NA TEMPERATURA DE 40ºC PARA A DSM 8 NOS TEMPOS DE 0, 3 E 6 MESES. 81
FIGURA 35 - A) ESTABILIDADE ACELERADA POR DSC NA TEMPERATURA AMBIENTE E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR DSC NA TEMPERATURA DE 40ºC PARA A DSM 10 NOS TEMPOS E 0, 3 E 6 MESES. 82
FIGURA 36 - A) ESTABILIDADE ACELERADA POR DSC NA TEMPERATURA AMBIENTE E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR DSC NA TEMPERATURA DE 40ºC PARA A DSM 12 NOS TEMPOS DE 0, 3 E 6 MESES. 83
FIGURA 37 - DSC DA AMOSTRA MF 84
FIGURA 38 - A) DSC DO PZQ NO INÍCIO E APÓS 6 MESES DE TESTE. B) DSC DA AMOSTRA PA NO INÍCIO, 3 MESES E 6 MESES DE TESTE. 84
FIGURA 39 - A) DSC DA AMOSTRA PS NO INÍCIO, 3 MESES E APÓS 6 MESES DE TESTE. B) DSC DA AMOSTRA SA NO INÍCIO, 3 MESES E 6 MESES DE TESTE. 85
FIGURA 40 - RAIO-X DA AMOSTRA MF E RAIOS-X DAS AMOSTRAS PZQ, AEROSIL E SORBITOL 86
FIGURA 41 - A) ESTABILIDADE ACELERADA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X NA TEMPERATURA AMBIENTE E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X NA TEMPERATURA DE 40ºC PARA A DSM 8 NOS TEMPOS DE 0(VERMELHO), 3(VERDE) E 6 MESES(PRETO). 86
FIGURA 42 - A) ESTABILIDADE ACELERADA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X NA TEMPERATURA AMBIENTE E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X NA TEMPERATURA DE 40ºC PARA A DSM 10 NOS TEMPOS DE 0(VERMELHO), 3(VERDE) E 6 MESES(PRETO). 87
FIGURA 43 - A) ESTABILIDADE ACELERADA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X NA TEMPERATURA AMBIENTE E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X NA TEMPERATURA DE 40ºC PARA A DSM 12 NOS TEMPOS DE 0, 3 E 6 MESES. 87
FIGURA 44 - A) ESTABILIDADE ACELERADA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X NA DAS AMOSTRAS PZQSD, PA, PS E SA NO TEMPO 0, B) NO TEMPO 3 MESES E C) NO TEMPO DE 6 MESES. 87
FIGURA 45 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DSM 8 – A) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 0 E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 6 MESES. 88
FIGURA 46 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DSM 10 – A) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA AMBIENTE NO TEMPO 0 E B) ESTABILIDADE

ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA AMBIENTE NO TEMPO 6 MESES 89
FIGURA 47 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DSM 10 – A) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 0 E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 6 MESES. 89
FIGURA 48 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DSM 12 – A) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA AMBIENTE NO TEMPO 0 E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA AMBIENTE NO TEMPO 6 MESES. 89
FIGURA 49 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DSM 12 – A) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 0 E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 6 MESES. 90
FIGURA 50- ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO AMOSTRA PA – A) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 0 E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 6 MESES. 90
FIGURA 51 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO AMOSTRA PS – A) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 0 E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 6 MESES. 90
FIGURA 52 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO AMOSTRA SA – A) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 0 E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 6 MESES. 91
FIGURA 53 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO AMOSTRA PZQSD – A) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 0 E B) ESTABILIDADE ACELERADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NA TEMPERATURA DE 40ºC NO TEMPO 6 MESES. 91
FIGURA 54-- ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO AMOSTRA MF 92
FIGURA 55 - PERFIL DE DISSOLUÇÃO DAS AMOSTRAS: DSM 12, PS, PA, MF E PZQ COM DESVIO PADRÃO ≤5%. 93
FIGURA 56 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA DSM 8 NO INÍCIO. A) AUMENTO DE 100X, B) AUMENTO DE 1,500X C) AUMENTO DE 6000X D) AUMENTO DE 10000X. 94
FIGURA 57 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA DSM 8 APÓS 6 MESES DE TESTE EM ESTUFA A 40C. A) AUMENTO DE 100X, B) AUMENTO DE 1,500X C) AUMENTO DE 6000X D) AUMENTO DE 10000X. 95
FIGURA 58 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA DSM 10 NO INÍCIO DOS TESTES. A) AUMENTO DE 100X, B) AUMENTO DE 1,500X C) AUMENTO DE 6000X D) AUMENTO DE 10000X. 95

FIGURA 59 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA DSM 10 APÓS 6 MESES DE TESTE EM ESTUFA A 40C. A) AUMENTO DE 100X, B) AUMENTO DE 1,500X C) AUMENTO DE 6000X D) AUMENTO DE 10000X. 96
FIGURA 60 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA DSM 12 NO INÍCIO DOS TESTES. A) AUMENTO DE 100X, B) AUMENTO DE 1,500X C) AUMENTO DE 6000X D) AUMENTO DE 10000X. 96
FIGURA 61 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA DSM 12 APÓS 6 MESES DE TESTE EM ESTUFA A 40C. A) AUMENTO DE 100X, B) AUMENTO DE 1,500X C) AUMENTO DE 6000X D) AUMENTO DE 10000X. 97
FIGURA 62 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO PRAZIQUANTEL. A) AUMENTO DE 100X, B) AUMENTO DE 1,500X C) AUMENTO DE 6000X D) AUMENTO DE 10000X. 97
FIGURA 63 - GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS AMOSTRAS MF 1 E 2 98
FIGURA 64 - GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS AMOSTRAS MF 3 E 4 99
FIGURA 65 - GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS AMOSTRAS DSM 5 E 6 99
FIGURA 66 - GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS AMOSTRAS DSM 7 E 8 99
FIGURA 67 - GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS AMOSTRAS DSM 9 E 10 99
FIGURA 68 - GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS AMOSTRAS DSM 11 E 12 100
FIGURA 69 - GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS AMOSTRAS 13 E 14 100
FIGURA 70 - SOLUBILIDADE DAS AMOSTRAS DSM 12 E PZQ EM PBS NO PREPARO DOS TESTES. 105
FIGURA 71 - MICROSCOPIA ÓTICA DOS VERMES, MACHOS E FÊMEAS, DE *S. MANSONI* APÓS 30' E 1 HORA DE INCUBAÇÃO NA DSM 12 NAS CONCENTRAÇÕES AVALIADAS DE 5 A 100 MG/ML.VERMES MACHOS E FÊMEAS APRESENTANDO CONTRAÇÃO DA MUSCULATURA E DESCAMAÇÃO NO TEGUMENTO BEM COMO ALTERAÇÕES NAS VENTOSAS ORAL E ACETABULAR. FIG. F – CASAL DE VERMES DO GRUPO CONTROLE SEM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E TEGUMENTARES. FOTOS OBSERVADAS NO AUMENTO DE 10X. 105
FIGURA 72 - MICROSCOPIA ÓTICA DOS VERMES, MACHOS E FÊMEAS, DE *S. MANSONI* APÓS 30' E 1 HORA DE INCUBAÇÃO EM PZQ NAS CONCENTRAÇÕES AVALIADAS DE 5 A 100 MG/ML.VERMES MACHOS E FÊMEAS APRESENTANDO CONTRAÇÃO DA MUSCULATURA E DESCAMAÇÃO NO TEGUMENTO BEM COMO ALTERAÇÕES NAS VENTOSAS ORAL E ACETABULAR. FIG. F – CASAL DE VERMES DO GRUPO CONTROLE SEM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E TEGUMENTARES. FOTOS OBSERVADAS NO AUMENTO DE 10X. 106
FIGURA 73 - RECUPERAÇÃO DE CASAIS, MACHOS E FÊMEAS DE *S. MANSONI*, APÓS TRATAMENTOS REALIZADOS 45 DIAS PÓS INFECÇÃO EM DOSE ÚNICA DE 200 MG/KG DE PZQ. 107
FIGURA 74 - REDUÇÃO TOTAL DO NÚMERO DE VERMES RECUPERADOS APÓS TRATAMENTOS REALIZADOS EM DOSE ÚNICA (200 MG/KG) DE PZQ APÓS 45 DIAS DE INFECÇÃO. 107
FIGURA 75 - OOGRAMA- PORCENTAGEM DO NÚMERO DE OVOS ENCONTRADOS NAS ANÁLISES DOS ANIMAIS TRATADOS 45 DIAS PÓS INFECÇÃO, REFERENTE AOS TRATAMENTOS EM DOSE ÚNICA (200 MG/KG) DE PZQ. OVOS IMATUROS (1º AO 4º ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO); OVOS MADUROS (5º ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO); OVOS MADUROS (5º ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO) E OVOS MORTOS. 108

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MISTURAS FÍSICAS PREPARADAS 48
TABELA 2 - DISPERSÕES SÓLIDAS MICROPARTICULADAS POR *SPRAY DRYER* 48
TABELA 3 - EXATIDÃO E PRECISÃO INTERDIAS 62
TABELA 4 – EXATIDÃO E PRECISÃO INTRADIAS 63
TABELA 5 - EXATIDÃO E PRECISÃO INTERDIAS 64
TABELA 6 - EXATIDÃO E PRECISÃO INTRADIAS 64
TABELA 7 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%) 66
TABELA 8 - PERFIL CALORIMÉTRICO DA DSM 8 81
TABELA 9 - PERFIL CALORIMÉTRICO DA DSM 10 82
TABELA 10 - PERFIL CALORIMÉTRICO DA DSM 12 83
TABELA 11 - PERFIL CALORIMÉTRICO DA AMOSTRA MF 83
TABELA 12 - PERFIL CALORIMÉTRICO DAS AMOSTRAS SA, PA, PS, PZQSD 85
TABELA 13 - ENSAIO DE DISSOLUÇÃO DAS AMOSTRAS 12, PS, PA, MF E PZQ 93
TABELA 14 - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DAS MF, DSM E PZQ SECO EM *SPRAY DRYER* 98
TABELA 15 - PROPRIEDADES DE FLUXO DAS DSM E PZQ SECO EM *SPRAY DRYER* 101
TABELA 16 - EFEITO IN VITRO DO PZQ -12 E PZQ- C SOBRE VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI*, LINHAGEM BH. 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

S. mansoni	*Schistosoma mansoni*
PZQ	Praziquantel
OMS	Organização Mundial da Saúde
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutico
DS	Dispersões sólidas
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FTIR	Infravermelho
MF	Mistura Física
UV	Ultravioleta
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FH	Fator de Hauser
IC	Índice de Carr
ρa	Densidade Aparente
ρc	Densidade Compactada
θ	Ângulo de Repouso
SC	*Spray congealing*
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DSM	Dispersão sólida microparticulada
MF	Mistura física
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EXP	Experimento
PZQsd	Praziquantel spray dried
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
SA	Sorbitol:Aerosil
PS	Praziquantel:Sorbitol
PA	Praziquantel:Aerosil

SUMÁRIO

RESUMO X

ABSTRACT XI

LISTA DE FIGURAS XII

LISTA DE TABELAS XVI

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS XVII

SUMÁRIO XVIII

1. INTRODUÇÃO 22

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 27

2.1 ESQUISTOSSOMOSE 27

2.1.1 SINTOMAS E TRATAMENTO 29

2.2 PRAZIQUANTEL 30

2.3 DISPERSÕES SÓLIDAS 32

2.3.1 PREPARO DE DISPERSÕES SÓLIDAS 34

2.3.2 TIPOS DE DISPERSÕES SÓLIDAS 35

2.4 SPRAY DRYER 38

2.4.1 HISTÓRICO DO *SPRAY DRYER* 38

2.4.2 FUNCIONAMENTO DO *SPRAY DRYER* 39

2.4.3 CONTATO ENTRE O *SPRAY* E O AR AQUECIDO 41

2.4.4 EVAPORAÇÃO DA FASE LÍQUIDA 41

2.4.5 RECUPERAÇÃO DO PRODUTO SECO 42

2.4.6 APLICAÇÕES DO *SPRAY* DRYER 42

3. OBJETIVOS 45

4. MATERIAIS E MÉTODOS 47

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS 47

4.1.1 EQUIPAMENTOS 47
4.1.2 MATÉRIAS-PRIMAS, SOLVENTES E REAGENTES 47
4.2 MÉTODOS 47
4.2.1 PREPARO DAS FORMULAÇÕES 47
4.2.2 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS 49
4.2.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR UV E CLAE 49
4.2.4 ANÁLISE DA SOLUBILIDADE 51
4.2.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO 51
4.2.6 ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE 51
4.2.7 ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA 52
4.2.8 AVALIAÇÃO QUIRAL 52
4.2.9 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) 52
4.2.10 TERMOGRAVIMETRIA (TGA) 53
4.2.11 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X 53
4.2.12 INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURRIER 53
4.2.13 ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO 53
4.2.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 54
4.2.15 ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE FLUXO 54
4.2.16 TAMANHO DE PARTÍCULA 56
4.2.17 ENSAIOS *IN VITRO* DE EFICÁCIA 57
4.2.18 ENSAIOS *IN VIVO* DE EFICÁCIA 58

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 61

5.1 QUANTIFICAÇÃO DO PZQ POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS 61
5.1.1 LINEARIDADE 61
5.1.2 PRECISÃO E EXATIDÃO 62
5.1.3 SELETIVIDADE 63
5.2 QUANTIFICAÇÃO DO PZQ POR CLAE 63
5.2.1 PRECISÃO E EXATIDÃO 64
5.2.2 SELETIVIDADE 64
5.2.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO 65
5.3 ENSAIOS DE SOLUBILIDADE 66
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MISTURAS FÍSICAS E DISPERSÕES SÓLIDAS 68
5.4.1 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) 68

5.4.2 TERMOGRAVIMETRIA (TGA) 69
5.4.3 INFRAVERMELHO 71
5.5 ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE PELA SOLUBILIDADE 72
5.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA 75
5.6.1 ENSAIOS DE SOLUBILIDADE 75
5.6.2 AVALIAÇÃO QUIRAL 79
5.6.3 ESTUDO DE ESTABILIDADE TÉRMICA POR DSC 80
5.6.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X 86
5.6.5 INFRAVERMELHO 88
5.6.6 ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO 92
5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 94
5.8 TAMANHO DE PARTÍCULA 98
5.9 PROPRIEDADES DE FLUXO 100
5.10 ENSAIOS *IN VITRO* DE EFICÁCIA 101
5.10.1 EFEITO *IN VITRO* DO PZQ-12 E PZQ-C SOBRE VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI*, LINHAGEM BH. 101
5.11 ENSAIOS *IN VIVO* DE EFICÁCIA 106
5.11.1 EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE A REDUÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DOS ANIMAIS 106
5.11.2 EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE A OVIPOSIÇÃO DE *S. MANSONI* 107

6. CONCLUSÕES 110

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 112

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Medicamentos para administração por via oral são as formas de preferência da indústria farmacêutica, pois apresentam menores custos de produção, melhor estabilidade, são de fácil escalonamento além de possuírem grande aceitação do paciente pela facilidade da administração. Porém a maioria dos medicamentos já existentes administrados pela via oral apresentam problemas de biodisponibilidade, que estão relacionados à baixa solubilidade em água dos fármacos em questão. Essa baixa solubilidade em água é um dos maiores desafios no desenvolvimento de muitos produtos farmacêuticos, uma vez que mais de um terço dos fármacos listados na Farmacopeia Americana e metade das novas entidades químicas ou dos novos ingredientes ativos são fracamente solúveis em água ou insolúveis (SHEN et al., 2010). Dessa maneira, muitas dessas novas entidades químicas desenvolvidas pela indústria farmacêutica estão sendo descartadas já no estágio de pré-formulação. Com isso é crescente a busca por técnicas que promovam a melhora da solubilidade desses fármacos e consequentemente da sua biodisponibilidade, como o caso dos fármacos de Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB), que apresentam baixa solubilidade em água e alta permeabilidade (ARAUJO, TEIXEIRA & FREITAS, 2010, MARTINS et al., 2012).

O praziquantel (PZQ) é um fármaco anti-helmíntico de amplo espectro, de uso humano e veterinário (JESUS et al., 2006; FERRARI et al., 2003). É o fármaco de primeira escolha para o tratamento das formas mais comuns de esquistossomoses (MOURÃO et al., 2005), pertence à lista dos medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) (MOURÃO et al., 2005 ; PASSERINI et al., 2006) e tem uma ampla utilização em países em desenvolvimento como o Brasil (PASSERINI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2004).

No SBC está classificado como de Classe II (PASSERINI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2004), apresentando, portanto, baixa solubilidade em água e alta permeabilidade. Além disso, seu rápido metabolismo reduz seu efeito, pois restringe sua distribuição pela via oral (MOURÃO et al., 2005; PASSERINI et al., 2006).

Por apresentar esses problemas e por ser um fármaco de escolha para o tratamento de uma doença negligenciada, pesquisas sobre o aumento da sua solubilidade são necessárias com o objetivo de melhorar a taxa de dissolução, e consequente biodisponibilidade podendo assim reduzir as elevadas doses terapêuticas que são usadas atualmente.

Uma maneira de conseguir alcançar este objetivo é utilizar como recurso a obtenção de dispersões sólidas do fármaco em carreadores hidrossolúveis com o intuito de conseguir um sistema amorfo que é mais solúvel que o fármaco em sua forma cristalina (BAIRD & TAYLOR, 2012; ALVES, 2010).

Dispersões sólidas são obtidas pela mistura de componentes ativos em carreadores compatíveis com a finalidade desejada, como: de alterar as propriedades do estado sólido, melhorar a velocidade de dissolução, retardar a liberação do fármaco, melhorar o coeficiente de solubilidade e/ou a estabilidade do fármaco em questão. Para isso a escolha do carreador adequado é importante, pois ele deve ser capaz de proporcionar o objetivo desejado, ser farmacologicamente inerte e atóxico (WEUTS et al., 2005; SILVA, 2008).

Os carreadores solúveis em água mais usados são geralmente polímeros como polietilenoglicol (PEG) e polivinilpirrolidona (PVP), mas também podem ser utilizadas pequenas moléculas como ureia, ácido cítrico, manitol e sorbitol (BROMAN, KHOO & TAYLOR, 2001; SILVA, 2008; SANTOS, 2008).

A produção de dispersões sólidas com o fármaco no estado amorfo é uma solução muito atrativa para melhorar a taxa de dissolução e solubilidade de fármacos pouco solúveis em água. Uma vez que, nessas dispersões, o fármaco está miscível com os carreadores a nível molecular, ele é mais solúvel em água do que no estado cristalino, pois a forma desordenada das moléculas do fármaco no estado amorfo exige baixa energia de solvatação para a homogeneização no meio o que leva a uma dissolução mais rápida (BAIRD & TAYLOR, 2012, ALVES, 2010).

Porém manter a estabilidade física dessa dispersão é um desafio, pois o fármaco no estado amorfo tende a se rearranjar em sua forma cristalina. Portanto, o desafio principal desse tipo de dispersão sólida é a estabilidade

física, que pode ser avaliada por análises térmicas e difração de raios-x. Essa possível instabilidade pode estar relacionada à mobilidade molecular do sistema, e essa mobilidade é fortemente dependente da temperatura (BAIRD & TAYLOR, 2012).

Uma vez que se consegue aumentar a temperatura de transição vítrea da mistura em algumas dispersões sólidas, pode-se diminuir a sua mobilidade molecular, dificultando assim que o fármaco volte ao seu estado cristalino (BAIRD & TAYLOR, 2012).

Uma das maneiras mais comuns de se obter dispersões sólidas amorfas é pela técnica de secagem por nebulização, ou *spray dryer*.

O *spray dryer* é um equipamento destinado à secagem contínua e automática dos mais diversos produtos diluídos em água, que ocorre pulverizando-se a mistura para secar numa câmara juntamente com uma corrente de ar quente. Essa técnica permite uma secagem uniforme e perfeitamente controlada dentro dos parâmetros desejados.

As partículas secas são separadas do ar e são coletadas, e a vaporização da água é feita a partir da sua atomização em que suas gotículas entram em contato com o ar quente (ESTEVES, 2006). O tempo de secagem é bem reduzido devido ao pequeno tamanho das partículas (BIANCHINI, 2004).

As características do produto seco dependem de inúmeras variáveis de processo, tais como: propriedades físico-químicas do fluido, do design do equipamento e das condições da operação, podendo formar-se grânulos, aglomerados ou pó.

Na indústria farmacêutica o *spray dryer* vem sendo amplamente empregado para aumentar a taxa de dissolução de substâncias pouco solúveis, secagem de materiais termossensíveis e secagem de proteínas e enzimas.

Há relatos do uso de spray dryer para a obtenção de dispersões sólidas amorfas de celecoxib, carbamazepina e nifedipina, de forma estável (FOUAD et. al, 2011; BAIRD & TAYLOR, 2012) e do cloridrato de raloxifeno, também em dispersão sólida amorfa e estável (CHO et. al, 2010).

Devido a esses fatos, esse trabalho se propôs a desenvolver dispersões sólidas de PZQ utilizando a técnica de *spray drying* na tentativa de obter uma dispersão amorfa e estável.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Esquistossomose

Esquistossomose é uma verminose provocada por um platelminto da classe Trematode chamado *Schistosoma mansoni*. É um verme achatado que lança seus ovos pelas fezes do homem, seu hospedeiro definitivo, e no meio ambiente aquático contamina o planorbídeo que é um caramujo da espécie *Biomphalaria sp.* (Figura 1), popularmente conhecido como caramujo, seu hospedeiro intermediário (ANGELUCCI, 2010; VITORINO et. al, 2012; Brasil, 2014).

Figura1 - Caramujos da espécie Biomphalaria glabrata albina. Extraído de http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1493&sid=32

É uma doença de ocorrência tropical, endêmica atualmente em cinquenta e quatro países, ocorrendo principalmente na África, Leste do Mediterrâneo, Oriente Médio e América do Sul (destacando-se Venezuela, Caribe e Brasil), infestando cerca de duzentos milhões de pessoas, e ainda, seiscentos milhões correm o risco de contraí-la (WHO, 2013), sendo, portanto, considerada um grande problema de saúde pública principalmente nos países tropicais e subtropicais (LIANG et al., 2003; SHEWEITA, HASSAN & BAHASHWAN, 2010).

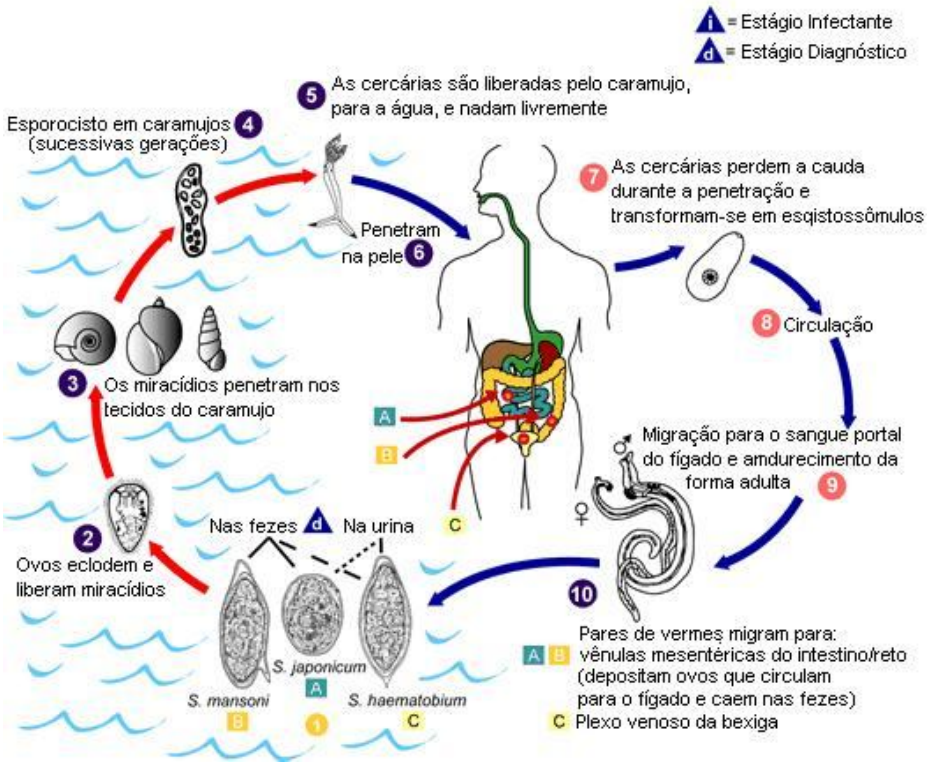


Figura 2 - Ciclo biológico do parasito. Extraído de http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_ESQUI05.htm

A Figura 2 apresenta o ciclo do parasita: o Homem adquire esquistossomose através da penetração da cercaria em sua pele. No organismo do homem a cercaria evolui para a forma larval de esquistossômulos que ao caírem na circulação sanguínea evoluem para a forma adulta onde os vermes acasalam e seus ovos são liberados pelas fezes humanas em rios e lagoas. No ambiente aquático os ovos eclodem e liberam os miracídeos, que infectam o hospedeiro intermediário, e se desenvolvem em cercarias sendo liberadas na água, pelas fezes do planorbídeo, estando livres para a contaminação do homem.

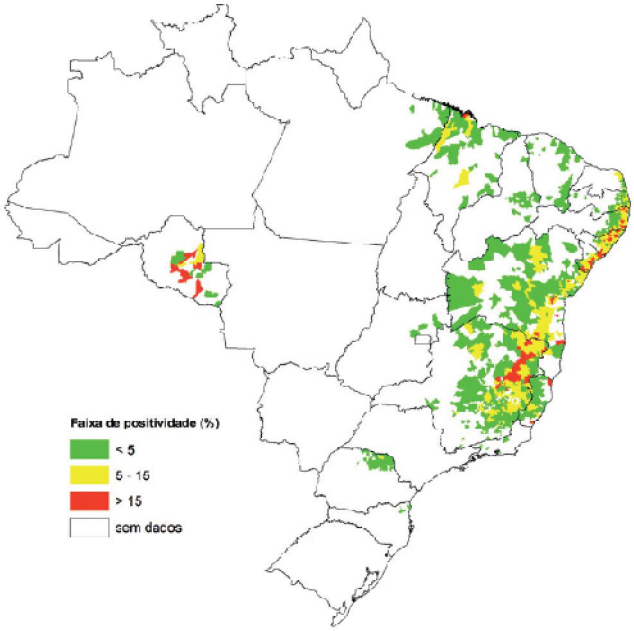
Atualmente, o Brasil é considerado uma das principais áreas de distribuição da doença no mundo, não somente devido à vastidão de sua zona endêmica e à existência de grande número de pacientes portadores de suas formas graves, mas também pela expansão desta endemia para outras áreas do país, até então indenes (BRASIL, 2014).

Estima-se que cerca de 1,5 milhões de pessoas vivem em área de risco no Brasil, sendo que as regiões Nordeste e Sudeste são as mais afetadas. As

áreas endêmicas e focais abrangem os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais, como mostra a Figura 3 (BRASIL, 2014).

Ocorre em sua maior parte em áreas rurais e em comunidades de baixa renda, geralmente nas periferias das grandes cidades, uma vez que a ocorrência da doença está diretamente ligada com a falta de saneamento básico (VITORINO et. al, 2012)

Considerada a segunda doença parasitária mais devastadora do mundo pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a esquistossomose infectou mais de 63 mil brasileiros no ano de 2011, segundo dados do Ministério da Saúde (WHO, 2013).



Fonte: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS.

Figura 3 - Distribuição da esquistossomose no Brasil. Fonte: Brasil, 2014

2.1.1 Sintomas e Tratamento

Os sintomas iniciais vão dos mais simples, como: dermatite cercariana, náuseas, vômitos, emagrecimento se agravando até a diarreia muco sanguinolenta, dor abdominal, hepatomegalia, ascite (barriga d'água), esplenomegalia, circulação colateral, varizes esofagianas, hemorragias e morte (Brasil, 2014).

O tratamento pode ser feito através da utilização de dois medicamentos: oxamniquine e praziquantel que é o fármaco de primeira escolha (WHO, 2013).

2.2 Praziquantel

Praziquantel (PZQ), de fórmula química representada na Figura 4, foi sintetizado inicialmente pela Merk, Alemanha, como um potencial tranquilizante. Posteriormente suas propriedades anti-helminticas foram testadas e provadas pela Bayer, Alemanha, (por volta dos anos 70) e vem sendo utilizado no controle da esquistossomose desde 1984 e como ação preventiva desde 2006 (WHO 2013). É um fármaco anti-helmíntico de amplo espectro, de uso tanto veterinário quanto humano (JESUS et al., 2006; ALSAQABI & LOTFY, 2014). É considerado mundialmente o fármaco de escolha para o tratamento das formas mais comuns de esquistossomoses e apresenta uma grande melhora no tratamento da maioria das infecções por trematódeos e cestódeos (MOURÃO et al., 2005), pertence à lista dos medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) (MOURÃO et al., 2005 ; PASSERINI et al., 2006) e tem uma ampla utilização em países em desenvolvimento (WHO, 2013; ALSAQABI & LOTFY, 2014). A dose recomendada é de 40 a 60mg/Kg. É capaz de atravessar a barreira hematocefálica, explicando sua efetividade também contra a neurocisticercose (ALSAQABI & LOTFY, 2014).

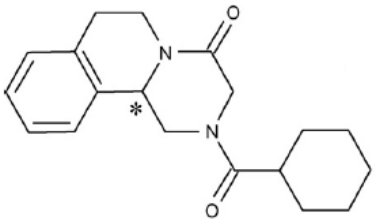


Figura 4 - Praziquantel. *Centro Quiral

Apresenta massa molecular de 312,3g/mol e está classificado no Sistema de Classificação Biofarmacêutico como de classe II, que representa a classe dos fármacos com baixa solubilidade e alta permeabilidade (PASSERINI et al., 2006; INGRAM, ELLIS & KEISER, 2012; ALSAQABI & LOTFY, 2014). Além disso seu rápido metabolismo restringe sua distribuição pela via oral, tendo seu efeito reduzido (MOURÃO et al., 2005). Apesar de sua baixa

solubilidade é extensamente absorvido no trato gastrointestinal, porém são necessárias doses elevadas para superar o efeito de primeira passagem do metabolismo e conseguir uma dose adequada que atinja o tecido larval do parasita (PASSERINI et al., 2006; INGRAM, ELLIS & KEISER, 2012).

Apesar do seu amplo uso, existem poucas informações sobre suas características biofarmacêuticas. Foi observado que seu uso com os alimentos, principalmente carboidratos, promoveu um aumento da concentração plasmática de PZQ e que tais níveis eram significativamente reduzidos quando da utilização de carbamazepina e fenitoína mostrando que possivelmente os alimentos aumentam sua taxa de dissolução e a carbamazepina e a fenitoína deslocam o praziquantel de suas ligações à proteínas plasmáticas (ALSAQABI & LOTFY, 2014).

Ele age desregulando a homeostase do verme adulto induzindo a espasmos e contrações musculares até a imobilização e morte do verme (MANNECK et al., 2011; INGRAM, ELLIS & KEISER, 2012; CHAN, ZAROWIECKI & MARCHANT, 2013).

O PZQ é um composto quiral comercializado como o racemato porém o enantiômero (-)-PZQ apresenta uma alta eficiência e baixa toxicidade quando comparado ao PZQ racêmico.

Em 1991, Wu e colaboradores verificou que uma dose única de 20mg/kg de (-)-PZQ foi tão eficaz quanto 40mg/kg da sua forma racêmica. Seu estudo foi realizado com pacientes que possuiam a esquistossomose Japônica. Ele verificou também que essa forma enantiomérica também apresentou menos efeitos colaterais que o fármaco racêmico, vendido no mercado.

O praziquantel representa um exemplo em que pesquisas sobre o aumento da solubilidade de fármacos são necessárias com o objetivo de melhorar a taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis, aumentando sua biodisponibilidade e podendo assim reduzir as elevadas doses terapêuticas que são usadas atualmente em programas de países em desenvolvimento como o Brasil (CAMPOS et al., 2013).

Uma maneira de se atingir esse objetivo é utilizar como recurso a obtenção de dispersões sólidas do fármaco em carreadores hidrossolúveis, essas dispersões sólidas de PZQ vem sendo estudadas por vários grupos de

pesquisa, utilizando-se diferentes técnicas e diferentes carreadores para alcançar um aumento na solubilidade (PASSERINI et al., 2006; CHAUD et al., 2010, CHAUD et al., 2013). Em 2010, Chaud e colaboradores obtiveram uma dispersão sólida de PZQ em óleo de rícino hidrogenado - PEG60. As dispersões sólidas foram obtidas através do método de evaporação de solvente e conseguiu um aumento na solubilidade em água de 2,19 vezes para a proporção 1:2(PZQ:excipiente).

Em 2013, Chaud e colaboradores, no seu estudo sobre dispersões sólidas de PZQ em amido glicolato de sódio por liofilização, conseguiu um aumento na solubilidade de 1,5 a 3 vezes em relação ao PZQ puro e a dissolução foi 1,5 vezes maior.

2.3 Dispersões Sólidas

Medicamentos para administração por via oral são as formas de preferência da indústria farmacêutica, pois apresentam menores custos de produção, melhor estabilidade, são de fácil escalonamento além de possuírem grande aceitação do paciente pela facilidade da administração. Porém a maioria dos medicamentos já existentes para essa forma de administração apresentam problemas de biodisponibilidade, que estão relacionados à baixa solubilidade em água dos fármacos em questão. Dessa maneira, muitas novas entidades químicas descobertas pela indústria farmacêutica estão sendo descartadas já no estágio de pré-formulação, pois são pouco ou insolúveis em água. Com isso é crescente a busca por técnicas que promovam a melhora da solubilidade desses fármacos e consequentemente da sua biodisponibilidade, como o caso dos fármacos de Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB), que apresentam baixa solubilidade em água e alta permeabilidade (ARAUJO, TEIXEIRA & FREITAS, 2010, SHARMA & JAIN, 2011; MARTINS et al., 2012).

Com o objetivo de aumentar a velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis em água, em 1961 Skiguchi e Obi criaram uma formulação de misturas eutéticas de sulfadiazol e ureia (fármaco modelo e carreador) e conseguiram provar que essa mistura era capaz de aumentar a dissolução do fármaco. (SEKIGUCHI & OBI, 1961, SANTOS, 2008).

Em 1971, o termo “dispersões sólidas” passou a ser utilizado pelos pesquisadores Chiou e Riegelman caracterizando esse tipo de mistura entre um fármaco hidrofóbico com carreadores hidrofílicos com o intuito de aumentar a velocidade de dissolução ou o contrário para o fim de retardar a liberação. (CHIOU & RIEGELMANS, 1971).

A baixa solubilidade aquosa de muitos dos ingredientes ativos farmacêuticos é um dos maiores desafios no desenvolvimento de novos produtos. Mais de um terço dos fármacos listados na Farmacopeia Americana e metade das novas entidades químicas ou dos novos ingredientes ativos apresentam baixíssima solubilidade em água, acarretando em problemas de dissolução e consequente problemas de biodisponibilidade. (SHEN et al., 2010; HUANG & DAI, 2013).

Dispersões sólidas são formadas pela mistura de ativos com carreadores compatíveis com sua finalidade, tais como: de alterar algumas propriedades do estado sólido, tais como: retardar a liberação, aumentar a velocidade de dissolução, melhorar a solubilidade do fármaco, dentre outras. Para isso, a escolha do carreador deve ser feita de maneira minuciosa, pois ele precisa alterar essa propriedade do fármaco, ser farmacologicamente inerte e atóxico e ainda ter uma compatibilidade físico-química com o fármaco para possibilitar a formação de dispersões sólidas, preferencialmente a nível molecular e que sejam estáveis (WEUTS et al., 2005; SILVA, 2008)

Quando o objetivo é a melhora de solubilidade de fármacos, os carreadores das dispersões são solúveis em água e podem auxiliar na redução do tamanho de partícula, na melhora da taxa de molhabilidade e solubilidade aquosa do fármaco que, por esse motivo, podem promover um aumento na sua taxa de dissolução (SIX et al., 2005).

A equação modificada de Noyes-Whitney (Equação 1) é capaz de indicar o quanto a taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis pode ser melhorada com o aumento da área superficial minimizando, assim, os problemas relacionados à baixa biodisponibilidade oral destes.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{AD(Cs - C)}{h} \qquad (1)$$

onde:

- *dC/dt* é a taxa de dissolução;
- *A* é a área de superfície disponível para dissolução;
- *D* é o coeficiente de difusão do composto;
- *Cs* é a concentração de saturação do composto;
- *C* é a concentração do fármaco no meio;
- *h* representa a camada limítrofe que separa a camada de superfície do composto com o meio.

Segundo esta equação, melhorar a dissolução destes fármacos seria possível aumentando a sua área superficial, o que pode ser atingido com a diminuição do tamanho de suas partículas (LEUNER & DRESSMAN, 2000).

Os carreadores solúveis em água mais usados são geralmente polímeros como polietilenoglicol (PEG) e polivinilpirrolidona (PVP), mas também podem ser utilizadas pequenas moléculas como ureia, ácido cítrico, manitol e sorbitol (BROMAN, KHOO & TAYLOR, 2001; SILVA, 2008; SANTOS, 2008).

Martins e colaboradores (2012) em seu estudo sobre obtenção de dispersões sólidas de Hidroclorotiazida com PVP-K30 conseguiram um aumento de 9 vezes na solubilidade do fármaco na dispersão sólida.

As dispersões sólidas podem ser preparadas de diversas maneiras e são classificadas em diferentes tipos baseados nas propriedades físico-químicas de cada uma (SETHIA & SQUILLANTE, 2003; KAPOOR et. al, 2012).

2.3.1 Preparo de dispersões sólidas

O preparo das dispersões sólidas pode ser feito basicamente das seguintes maneiras: método de fusão, método por evaporação de solvente e método de solvente-fusão.

Método de fusão

As primeiras dispersões sólidas descritas, em 1961, foram obtidas através da técnica de fusão. Neste método, fármaco e carreador são juntamente aquecidos até a temperatura de fusão do carreador e/ou de ambos, misturados e depois e sofrem rápido resfriamento (KAPOOR et. al, 2012).

Obtém-se, dessa maneira, o aprisionamento do fármaco na matriz carreadora solidificada devido ao rápido resfriamento. Em seguida ao resfriamento, realiza-se a sua trituração da dispersão sólida (SILVA, 2008;

SANTOS, 2008). O método só pode ser aplicado para carreadores de baixo ponto de fusão e a termoestabilidade do fármaco deve ser levada em consideração. Esse método apresenta como vantagem sua simplicidade e economia e pode ser limitado pela sensibilidade térmica dos componentes da formulação, pela necessidade do fármaco e carreador serem miscíveis na forma fundida e pelo cuidado na evaporação ou decomposição de substâncias devido às altas temperaturas empregadas (SILVA, 2008; SANTOS, 2008, KAPOOR et. al, 2012).

Método por evaporação de solvente

Descrito pela primeira vez por Tachibana e Nakamura, em 1965. Neste método, tanto o fármaco quanto o carreador são solubilizados em solvente aquoso ou orgânico, no mesmo recipiente, e em seguida o solvente é evaporado sob agitação. Na sequência, é feita a pulverização e tamisação da dispersão sólida. Como vantagem, o método minimiza possível degradação térmica do fármaco, porém apresenta como dificuldade a escolha do solvente, que deve solubilizar o fármaco lipossolúvel e o carreador hidrossolúvel. É também de grande importância a garantia da remoção total do solvente uma vez que muitos deles são tóxicos (LEUNER & DRESSMAN, 2000; SERAJUDDIN, 1999).

Método de solvente-fusão

O fármaco é solubilizado em uma pequena quantidade de solvente e é adicionado ao carreador fundido, o solvente é então evaporado, a mistura é resfriada rapidamente e o fármaco é disperso no carreador, em seguida a dispersão sólida é triturada (LEUNER & DRESSMAN, 2000).

2.3.2 Tipos de Dispersões Sólidas

Misturas Eutéticas

Descritas pela primeira vez em 1961 por Sekiguchi e Obi, A mistura eutética simples é constituída de dois compostos que quando se encontram no estado líquido são completamente miscíveis entre si, porém essa miscibilidade é bem restrita no estado sólido (Figura 5). Portanto, na fusão, esses dois compostos se misturam e quando resfriados cristalizam-se, ou separam, simultaneamente. As misturas eutéticas sólidas são preparadas pelo resfriamento muito rápido do composto que foi fundido e assim é formada uma

mistura física de cristais muito pequenos de dois componentes. Se essa mistura consistir de um fármaco ligeiramente solúvel em um carreador muito hidrossolúvel este carreador em meio aquoso será rapidamente dissolvido e liberará cristais muito pequenos do fármaco. Esse aumento na área superficial da suspensão resulta em uma melhor taxa de dissolução e, por consequência, proporciona uma melhor biodisponibilidade (LEUNER & DRESSMAN, 2000; ANDRADE, 2009; KAPOOR et al., 2012).

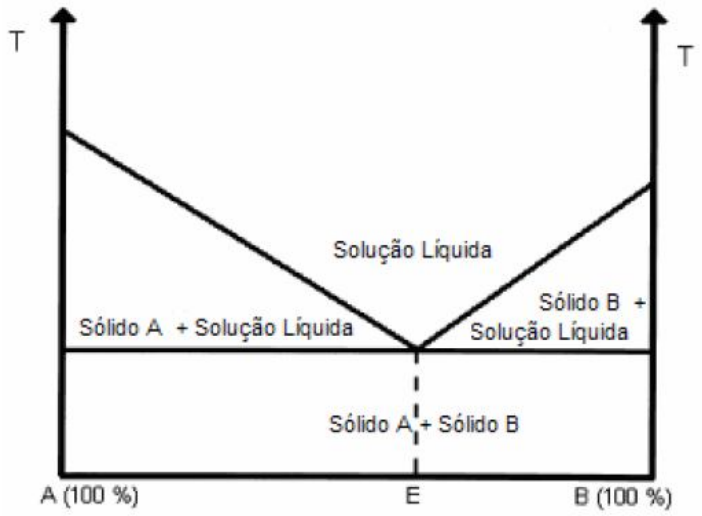


Figura 5 - Diagrama de fases das misturas eutéticas. Fonte: LEUNER & DRESSMAN, 2000.

Soluções Sólidas

Comparáveis às soluções líquidas, as soluções sólidas apresentam somente uma fase homogênea independentemente do número de componentes. Elas podem ser soluções sólidas do tipo cristalinas ou amorfas. As cristalinas são quando um fármaco cristalino é aprisionado em uma matriz cristalina.

No caso de uma solução sólida amorfa, o tamanho das partículas do fármaco é reduzido à dimensões moleculares e sua taxa de dissolução será determinada pela taxa de dissolução do carreador, melhorando a biodisponibilidade (LEUNER & DRESSMAN, 2000). O tamanho das moléculas do fármaco deve ser igual ou menor do que as moléculas do carreador, de forma que cada molécula possa substituir a outra na rede cristalina ou que o fármaco se acomode nos espaços da rede do carreador (AULTON, 2005).

Portanto, a escolha do carreador pode aumentar em várias ordens de grandeza a velocidade de dissolução do fármaco em questão (LEUNER & DRESSMAN, 2000). Essas soluções sólidas promovem um aumento na estabilidade física do fármaco no estado amorfo, pois consegue inibir a sua cristalização através da diminuição da mobilidade molecular do sistema (KAPOOR et. al, 2012).

Suspensões sólidas ou Dispersões sólidas Cristalinas

São formadas quando a velocidade de cristalização do fármaco, em uma mistura miscível de fármaco-polímero, é maior que a velocidade de solidificação desta mistura. (KAPOOR et. al, 2012).

Dispersões sólidas Amorfas

Quando o polímero em mistura é solidificado em uma taxa mais alta do que a taxa de cristalização do fármaco este fica cineticamente preso à matriz no seu estado amorfo ou "sólido-liquido". Essas dispersões apresentam a tendência a voltar ao estado cristalino mais estável e menos solúvel, uma vez que materiais amorfos são geralmente termodinamicamente mais instáveis. (KAPOOR et. al, 2012; SHEN et. al, 2010).

A produção de dispersões sólidas com o fármaco no estado amorfo é uma alternativa muito atrativa para melhorar a taxa de dissolução e solubilidade de fármacos pouco solúveis em água. Uma vez que nessas dispersões o fármaco está miscível com os carreadores a nível molecular ele é mais solúvel em água do que no estado cristalino, pois a forma desordenada das moléculas do fármaco no estado amorfo exige baixa energia de solvatação para a homogeneização no meio o que leva a uma dissolução mais rápida (BAIRD & TAYLOR, 2012; ALVES, 2010).

Porém manter a estabilidade física dessa dispersão é um desafio, pois o fármaco no estado amorfo tende a se rearranjar em sua forma cristalina. Portanto, o desafio principal desse tipo de dispersão sólida é a estabilidade física, que pode ser avaliada por análises térmicas e difração de raios-x. Essa possível instabilidade pode estar relacionada a mobilidade molecular do sistema, e essa mobilidade é fortemente dependente da temperatura (BAIRD & TAYLOR, 2012).

Uma vez que se consegue aumentar a temperatura de transição vítrea da mistura em uma dispersão sólida, pode-se diminuir a sua mobilidade molecular, dificultando assim que o fármaco volte ao seu estado cristalino (BAIRD & TAYLOR, 2012).

Uma das maneiras mais comuns de se obter dispersões sólidas amorfas é pela técnica de secagem por nebulização, ou *spray dryer*.

2.4 Spray Dryer

2.4.1 Histórico do *spray dryer*

A secagem feita por *spray dryer* teve seu início a partir do ano de 1865, quando foi patenteada a primeira operação de secagem de ovos. Porém, o começo de sua utilização como processo em escala industrial aconteceu em meados de 1920. Sendo os primeiros produtos obtidos em larga escala com a secagem por nebulização (ou *spray drying*) o leite e o sabão em pó (ROSA et al., 2008).

Posteriormente seu uso foi disseminado pelas indústrias sendo hoje muito utilizado para secagem em larga escala de qualquer produto possível de ser bombeado como as emulsões, pastas, soluções e suspensões para as indústrias farmacêutica, química, cerâmica e alimentícia (ROSA et al., 2008; BROADHEAD, EDMOND & RHODES, 1992).

Durante a Segunda Guerra Mundial, com a clara necessidade de alimentos desidratados e todas as formas de produtos secos para que houvesse a redução de peso dos produtos e menores custos com transportes, a técnica de secagem, *spray drying*, passou a ser ainda mais utilizada, levando a produção de equipamentos com capacidades de produção cada vez maiores, esse avanço teve como resultado a consolidação do *spray drying* como uma técnica econômica (BROADHEAD, EDMOND & RHODES, 1992).

Outras vantagens que ganharam destaque foram a alta capacidade produtiva e, principalmente, o curto período em que a amostra permanece na câmara de secagem, o que permite a utilização de materiais termolábeis devido ao rápido contato do produto com temperaturas elevadas, alta produção horária e custos inferiores ao da liofilização, por exemplo.

2.4.2 Funcionamento do *spray dryer*

O *spray dryer* (Figura 6) é um equipamento destinado à secagem contínua e automática dos mais diversos produtos diluídos em água, que ocorre pulverizando-se a mistura para secar numa câmara juntamente com uma corrente de ar quente. Essa técnica permite uma secagem uniforme e perfeitamente controlada dentro dos parâmetros desejados (PATEL, PATEL & SUTHAR et al., 2009).

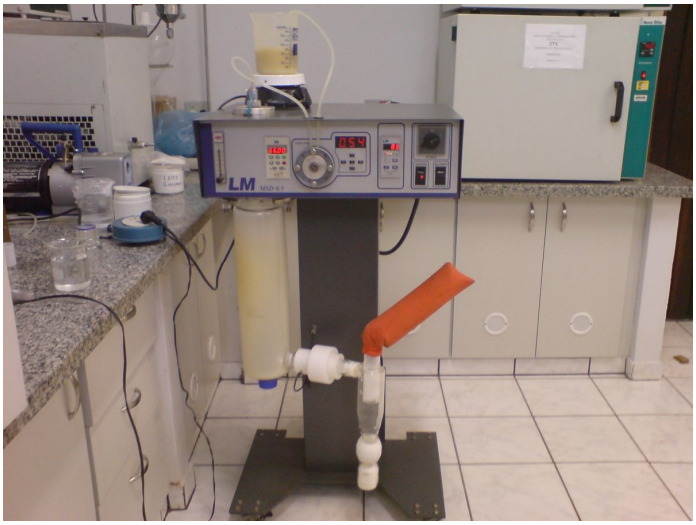


Figura 6 - Spray Dryer do Laboratório de Desenvolvimento industrial Farmacêutico – USP/RP. Fonte: Machado-Pignata, M. O.

O processo de *spray drying*, secagem por nebulização, ou ainda denominado por atomização, é dado a partir da transformação de um material fluido bombeável em partículas secas através da atomização deste em um meio de secagem com temperatura elevada. É feito de forma contínua, em uma só etapa realizando a secagem (MASTERS, 1985, ESTEVES, 2006, CAL & SOLLOHUB, 2010).

As partículas secas são separadas do ar e são coletadas, e a vaporização da água é feita a partir da sua atomização em que suas gotículas entram em contato com o ar quente (ESTEVES, 2006). O tempo de secagem é bem reduzido devido ao pequeno tamanho das partículas (BIANCHINI, 2004).

As características do produto seco dependem das propriedades físico-químicas do fluido, do design do equipamento e das condições da operação, podendo formar-se grânulos, aglomerados ou pó.

Os quatro estágios da operação são (MASTERS, 1985): atomização do fluido, contato ar/*spray*, evaporação da fase líquida e recuperação do produto seco.

Atomização do fluido

A atomização ou pulverização transforma a suspensão em pequenas gotas, determina a distribuição do tamanho de partícula, área de troca térmica, velocidade e trajetória da partícula. Ela deve ser usada de acordo com o tamanho e as propriedades desejadas para o produto seco, como granulometria, textura, molhabilidade, solubilidade e densidade (CAL & SOLLOHUB, 2010).

Existem vários sistemas de atomização disponíveis, sendo comumente classificados de acordo com o design (BROADHEAD, EDMOND & RHODES, 1992; PATEL, PATEL & SUTHAR, 2009):

- **Atomizador rotativo**

Neste processo o fluido entra na câmara de secagem através de um disco, e sua movimentação faz com que o fluido seja lançado para a periferia do mesmo e assim forma-se o *spray*. Este sistema permite maiores capacidades produtivas, melhor homogeneização do pó e menor desgaste dos componentes da pulverização. O tamanho das partículas, em geral, é inversamente proporcional à velocidade e ao diâmetro dos discos.

- **Atomizador de bicos de pressão**

No processo de atomizador de bicos de pressão o fluido entra pelo bico e é pulverizado sob pressão. Normalmente produzem pós com distribuição granulométrica menos homogênea e com tamanhos inversamente proporcionais à pressão de bombeamento (PATEL, PATEL & SUTHAR, 2009).

- **Atomizador de duplo-fluido ou pneumático**

No processo através do atomizador de duplo fluído ou pneumático o fluido e o gás de atomização (geralmente ar) são inseridos separadamente no

bico (Figura 7). No interior do bico eles se misturam e o ar, injetado com uma alta velocidade, faz com quem haja a formação do *spray*. Este sistema é mais utilizado em escala laboratorial (BROADHEAD, EDMOND & RHODES, 1992; PATEL, PATEL & SUTHAR, 2009), e especialmente para suspensões com viscosidade e densidade elevadas (RIBEIRO et al., 2001). Esse foi o sistema utilizado na realização desse projeto.

Figura 7 - Parte superior do bico pneumático (acima entrada do fluido, abaixo a entrada do ar comprimido). Fonte: Machado-Pignata, M. O.

2.4.3 Contato entre o *spray* e o ar aquecido

Existem três tipos de contato ar/*spray* utilizados no processo;

- **Contra-corrente**: o ar de secagem e o *spray* passam pela câmara em sentidos opostos, expõe o produto à temperaturas mais elevadas porém é melhor em relação à economia e aproveitamento do material;
- **Co-corrente:** quando o *spray* e o ar passam pela câmara de secagem no mesmo sentido, as gotículas formadas são expostas ao ar quente e mais seco imediatamente após a sua formação. É um tipo muito utilizado para substâncias termossensíveis;
- **Misto**: inicialmente o ar e o *spray* passam em sentidos opostos e após um tempo o sentido passa a ser o mesmo.

2.4.4 Evaporação da fase líquida

Durante a evaporação, cada material sofre uma modificação própria como colidir, expandir e desintegrar-se, podendo formar materiais porosos e irregulares. Alguns mantém a forma esférica (MASTERS, 1985; ESTEVES,

2006; PATEL, PATEL & SUTHAR, 2009). As gotículas de ar evaporam devido a temperatura elevada do sistema.

2.4.5 Recuperação do produto seco

Para a separação gás-sólido, normalmente utiliza-se um ciclone (Figura 8), geralmente com um filtro acoplado em sua abertura superior e um frasco coletor acoplado à abertura inferior.

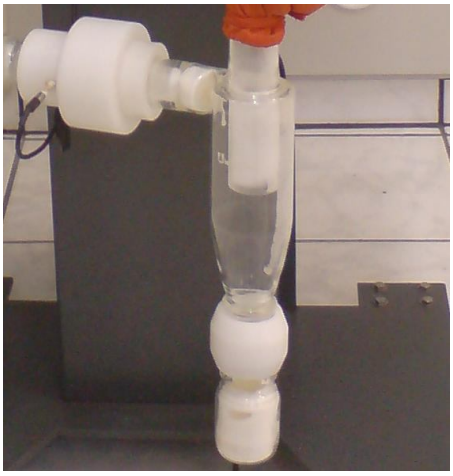


Figura 8 – Ciclone (filtro na abertura superior e frasco coletor na abertura inferior). Fonte: Machado-Pignata, M. O.

O ar passa com as partículas, que caem no frasco, na abertura inferior, e o ar sai pela abertura superior que contém o filtro. Assim, o produto seco é recuperado (ESTEVES, 2006, CAL & SOLLOHUB, 2010).

2.4.6 Aplicações do *spray* dryer

Na indústria farmacêutica o *spray dryer* vem sendo amplamente empregado para aumentar a taxa de dissolução de substâncias pouco solúveis, secagem de materiais termossensíveis, secagem de proteínas e enzimas.

O processamento de micropartículas por *spray dryer* tem recebido bastante atenção pois tem sido utilizados para várias finalidades como alteração das propriedades biofarmacêuticas do fármaco, secagem de

fármacos praticamente insolúveis com polímeros hidrofílicos para a melhoria da taxa de dissolução, formação de micropartículas gastrorresistentes e para a liberação controlada de fármacos (MUKESH et al., 2009; RÉ, 2006).

Martins e colaboradores (2012) em seu estudo sobre o aumento da solubilidade da carbamazepina através da obtenção de dispersões sólidas por *spray dryer* conseguiu um aumento na solubilidade da carbamazepina de aproximadamente 2,5 vezes.

Weuts e colaboradores (2011) utilizaram a técnica de *spray dryer* para a produção de dispersões sólidas amorfas de Etravirine, conseguindo excelente resultado com esta técnica. Também em 2010, Shen e colaboradores (2010) obtiveram dispersões sólidas amorfas de ibuprofeno estáveis pela técnica de *spray dryer* por 12 meses de estudo.

Há relatos do uso de *spray dryer* para a obtenção de dispersões sólidas amorfas de celecoxib, carbamazepina e nifedipina, de forma estável (FOUAD et al., 2011; FOUAD et. al, 2011; BAIRD & TAYLOR, 2012) e do cloridrato de raloxifeno, também em dispersão sólida amorfa e estável (CHO et. al, 2010).

Em 2012, Martins e colaboradores estudaram os efeitos na dissolução para alguns fármacos secos em *spray dryer*. Os fármacos estudados foram: nifedipina, carbamazepina, indometacina e piroxicam e concluíram que a secagem por *spray* conseguiu diminuir o tamanho das partículas melhorando a sua dissolução.

Objetivos

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi obter, caracterizar e avaliar as dispersões sólidas microparticuladas de PZQ obtidas através da técnica de secagem por nebulização.

Como objetivos específicos seguem:

- Preparar misturas físicas e dispersões sólidas de PZQ com diferentes proporções dos carreadores Sorbitol e Dióxido de Silício Coloidal Aerosil® a fim de avaliar a melhora da solubilidade do fármaco;
- Caracterizar as misturas físicas e dispersões sólidas microparticuladas, obtidas pela secagem por nebulização, por métodos físico-químicos com o intuito de verificar possíveis interações entre fármaco/polímero e se o processo de obtenção de dispersões sólidas é termicamente seguro;
- Realizar um estudo das propriedades de fluxo das dispersões sólidas microparticuladas;
- Estudar o perfil de dissolução *in vitro* do PZQ a partir das dispersões sólidas obtidas.
- Estudar a estabilidade acelerada das micropartículas através de acompanhamento dos estudos de solubilidade, estabilidade quiral, DSC, Raios-X e Infravermelho,
- Avaliar a eficácia das micropartículas obtidas através de ensaios *in vitro* e *in vivo*

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e equipamentos

4.1.1 Equipamentos

- Equipamento *spray dryer,*modelo MSD 0.5, Labmaq do Brasil Ltda (Brasil);
- Balança analítica e semi-analítica Explorer, Ohaus INC (EUA);
- Espectrofotômetro M 330Plus, Camspec Ltd. (Reino Unido);
- Aparelho de DSC modelo DSC-50, Shimadzu Co. (Japão);
- Aparelho de TGA modelo TGA-50, Shimadzu Co. (Japão);
- Difratômetro de raios-X modelo D5005, Siemens Co. (EUA)
- FT-IR modelo Protegè 460, Nicolet Ltd. (EUA)
- Microscópio eletrônico de varredura modelo SS-550, Shimadzu Co. (Japão)
- Dissolutor modelo NE299/6, Nova Ética Ltda (Brasil)
- HPLC modelo UHLPC Ultimate 3000, Thermo Fisher Brazil Instrumentos Científicos Ltda; (Brasil)

4.1.2 Matérias-primas, solventes e reagentes

- Fármaco: Praziquantel, Galena Química e Farmacêutica. Ltda., gentilmente cedido por Ouro Fino Agronegócio (Brasil);
- Dióxido de Silício Coloidal Aerosil® 200, Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. (Brasil)
- Sorbitol, Vetec, Gold Lab Artigos para Laboratórios (Brasil);
- Etanol (PA), Merk, Gold Lab Artigos para Laboratórios (Brasil);
- Acetonitrila, Metanol, Hexano e Isopropanol grau HPLC, JT Backer, WM Comércio e Produtos de Laboratórios Ltda. (Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das formulações

Preparo das misturas físicas

As misturas físicas (MF) foram preparadas pesando adequadamente quantidades suficientes de PZQ, sorbitol e aerosil que foram colocados em

tubo falcon com tampa e misturados manualmente até homogeneização. As misturas físicas preparadas e suas concentrações estão ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Misturas Físicas Preparadas

Amostra	PZQ:Sorbitol:Aerosil
MF1	1:1:1
MF2	1:1:2
MF3	1(1:2):1
MF4	2(1:2):1

Preparo das dispersões sólidas micropartículadas por *spray dryer*

Para o preparo das dispersões sólidas microparticuladas (DSM) em *spray dryer,* 20g de quantidades suficientes de fármaco e carreador foram solubilizadas em 100mL de uma solução hidroalcoólica 30% de etanol. As misturas foram homogeneizadas pelo turrax por 5 minutos e em seguida foram mantidas em agitação magnética à temperatura ambiente, quando foram atomizadas no aparelho *spray dryer* . O equipamento foi regulado para manter a temperatura de saída controlada em 50 ou 70ºC de acordo com a Tabela 2, por um equipamento de *spray dryer* obtendo-se após o processo de secagem as micropartículas desejadas. As amostras 13 e 14 foram secagens do PZQ puro nas temperaturas de 50 e 70ºC.

Tabela 2 - Dispersões sólidas microparticuladas por *spray dryer*

Amostras	PZQ: Sorbitol: Aerosil	Temperatura Saída *Spray* (ºC)
DSM5	1:1:1	50
DSM6	1:1:2	50
DSM7	1:1:1	70
DSM8	1:1:2	70
DSM9	2(1:2):1	50
DSM10	2(1:2):1	70
DSM11	1(1:2):1	50
DSM12	1(1:2):1	70
13	PZQ puro	50
14	PZQ puro	70

O *spray* operou em modo co-corrente, com um bico atomizador duplo fluido de 1,2mm de diâmetro. Os demais parâmetros do spray dryer foram mantidos constantes como: vazão de ar de 45m^3/min, vazão de atomização de 0,5mL/min e pressão do ar no bico atomizador de 5bar.

4.2.2 Condições Cromatográficas

Para o estudo de solubilidade por espectofotometria por UV/Vis foi utilizado um espectrofotômetro UV/Vis para fazer uma varredura de 190-600nm no intuito de identificar o pico de máxima absorção. Esse comprimento de onda foi identificado em 262nm. Foi preparada ima solução de 5mg/mL de PZQ em metanol e a partir dela foram realizadas diluições de 0,05 a 0,8mg/mL para a realização da curva analítica.

Foi utilizado um equipamento de UPLC, Ultimate 3000, equipado com uma coluna C18 phenomenex, 200x4,6mm, 5µm para as análises de solubilidade e dissolução. . A fase móvel foi constituída de acetonitrila:água (40:60) na vazão de 1mL/min. O volume injetado foi de 50µL e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 262nm. Os resultados obtidos foram calculados usando uma curva analítica nas concentrações de 5 a 110µg/mL de PZQ em metanol.

Para a avaliação quiral foi utilizada nesse mesmo equipamento de UPLC a coluna quiral, Chiralpack AD, 250x4,6mm 10µm, a fase móvel foi constituída de hexano:isopropanol (80:20), vazão de 1mL/min. Volume injetado de 50µL e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 262nm. Os resultados obtidos foram calculados usando uma curva analítica nas concentrações de 20 a 110µg/mL de PZQ em metanol, que foi evaporada e ressuspendida em fase móvel para análise.

4.2.3 Validação da metodologia analítica por UV e CLAE

A metodologia analítica utilizada para a quantificação do PZQ por UV e CLAE foi validada baseada nos parâmetros analíticos de linearidade, precisão, exatidão e seletividade (BRASIL, 2005).

Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas analíticas para 6 concentrações diferentes em triplicata para cada uma delas. Primeiramente, foi preparada uma solução estoque de PZQ. Desta solução estoque foram feitas seis diluições em água. A partir da relação entre as absorbâncias e suas respectivas concentrações foi feita a curva analítica. A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, onde (a) corresponde ao coeficiente angular, fornecido pela inclinação da reta, e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de interseção da reta com o eixo das ordenadas. As faixas lineares serão calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear (*r*), com o critério mínimo aceitável de 0,99 (BRASIL, 2003).

Precisão

A precisão intra-dia e inter-dia foram verificadas analisando-se três concentrações diferentes (baixa, média e alta), dentro do intervalo de linearidade, em triplicata para cada concentração e em três dias consecutivos. Os resultados foram expressos matematicamente através do coeficiente de variação (CV %), o qual é calculado através da Equação 2 (BRASIL, 2003).

$$CV\ \% = \frac{(Desvio\ padrão)}{(Concentração\ média)} \times 100 \qquad (2)$$

Exatidão

A exatidão intra e inter-ensaio foram analisadas da mesma maneira que a precisão utilizando-se as mesmas concentrações. A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de PZQ adicionada a uma mistura dos componentes da formulação (placebo contaminado). Os resultados foram expressos em função da porcentagem de erro relativo, conforme Equação 3.

$$E\ (\%) = \left(\frac{Valor_{obtido} - Valor_{real}}{Valor_{real}}\right) \times 100 \qquad (3)$$

Onde, *E* % corresponde a porcentagem de erro relativo; $Valor_{obtido}$ corresponde ao valor obtido após a análise; e $Valor_{real}$ corresponde à concentração que deveria ser encontrada após a análise.

Seletividade

Foi estudada a interferência dos carreadores utilizados na quantificação do PZQ por espectrofotometria UV/Vis e CLAE. Todas as amostras submetidas a análises por UV/Vis e CLAE contendo carreadores foram filtradas em filtros de membrana de 0,22 µm.

4.2.4 Análise da solubilidade

Foram pesadas 40mg de amostra para garantir a saturação do meio em 10mL de água destilada adicionados em um erlenmeyer. As amostras ficaram sob agitação magnética por 48h a temperatura de 37°C. Após esse período de 48h as amostras foram filtradas em papel de filtro qualitativo e depois em filtro de membrana Millipore de 0,22µm e analisadas em espectrofotômetro UV e CLAE em comprimento de onda de 262nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para a análise em CLAE, alíquotas de 100µL das amostras foram diluídas com metanol para que houvesse uma concentração final de 50µg/mL de PZQ.

4.2.5 Eficiência de encapsulação

Para avaliar a eficiência de encapsulação nas dispersões sólidas obtidas, foi pesada quantidade suficiente para se obter 1mg/mL de PZQ em Metanol e foram deixadas por 45min em sonicação. Depois disso cada solução foi filtrada em filtro Millipore 0,22µm e diluída para que houvesse uma quantidade de PZQ de 50µg/mL para quantificação em HPLC.

4.2.6 Estudo Preliminar de estabilidade

Para avaliar a estabilidade preliminar das misturas físicas e dispersões sólidas obtidas, todas as amostras foram divididas em 3 partes cada uma, armazenadas em frascos protegidos da luz e umidade. Uma das partes foi mantida em estufa a 37ºC, 45ºC e a temperatura ambiente, pelo período de 3 meses. A cada mês foi avaliada a solubilidade dessas amostras. Após

esse período, as amostras de maiores solubilidades foram escolhidas para que alguns estudos fossem repetidos, foram elas: DSM 8, DSM10 e DSM12.

Repetiu-se a secagem para a produção de dispersões sólidas das DSMs 8, 10 e 12, do PZQ na temperatura de 70ºC, na intenção de fazer uma avaliação mais aprofundada nessas amostras com técnicas de análise mais completas para avaliar o que de fato ocorreu com essas amostras no espaço de tempo avaliado pela estabilidade preliminar. Para avaliar também a influência de cada excipiente utilizado realizou-se também a secagem das amostras PA (PQZ:Aerosil), PS(PZQ:SORBITOL) e SA(Sorbirol:Aerosil). Para todas essas amostras foi realizado um estudo de estabilidade acelerada e nesse estudo foram acompanhados os resultados de solubilidade, DSC, XRPD e FT-IR. Como o praziquantel é um fármaco quiral, realizou-se também um acompanhamento da estabilidade quiral do fármaco, através da solubilidade, ao longo de 6 meses.

4.2.7 Estudos de Estabilidade Acelerada

Para avaliar mais a fundo a estabilidade das dispersões sólidas obtidas, as DSMs 8, 10, 12, PZQsd, PS, PA e SA foram mantidas pelo período de seis meses em estufa com temperatura controlada de 40ºC e umidade ≥75% (BRASIL, 2003). Foram realizadas as análises de solubilidade, teor de fármaco, DSC, Raios-X e Infravermelho nos tempos de 0, 3 e 6 meses.

4.2.8 Avaliação Quiral

Escolheu-se as amostras DSM 12, PA, PS e PZQsd para este estudo. A partir das amostras filtradas da solubilidade, 100µL foi coletado e diluído para uma concentração de 50µg/mL de PZQ em cada uma. Em seguida evaporou-se todo o solvente e a suspendeu com a fase móvel as amostras foram analisadas por CLAE.

4.2.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para as análises de DSC, 4mg de PZQ e das dispersões sólidas selecionadas para estudo foram previamente pesados em cadinho de alumínio

que foi selado para a análise em DSC Shimadzu DSC-50, com aumento da temperatura até 250ºC em uma razão de aumento da temperatura de 10ºC/min em atmosfera de nitrogênio a 50mL/min.

4.2.10 Termogravimetria (TGA)

Para as análises de TGA, 4mg de PZQ foram previamente pesados em cadinho de platina para a análise em TGA Shimadzu TGA-50, com aumento na temperatura até 500ºC em uma razão de aumento da temperatura de 10ºC/min em atmosfera de nitrogênio a 50mL/min.

4.2.11 Difração de Raios-X

O estudo foi realizado em um difratômetro de raios-X equipado com tubo de cobre e filtro de níquel, operando com voltagem de 40kV e corrente de 30mA.

4.2.12 Infravermelho por Transformada de Fourrier

Os espectros de vibração infravermelho das amostras foram obtidos através do equipamento FT-IR. Cada amostra foi misturada com brometo de potássio (KBr) em gral de quartzo e prensadas em miniprensa para obter discos translúcidos. Os espectros foram registrados nas faixas de 4000 – 400 cm^{-1} de número de ondas e os picos característicos foram identificados e comparados.

4.2.13 Ensaios de Dissolução

O estudo da dissolução *in vitro* do PZQ, MF 3, DS 12, PA e PS foi baseado na metodologia de dissolução do PZQ em comprimidos da USP 30 (2007), porém usando-se água destilada em substituição ao meio HCl 0,1N com 2mg/mL de lauril sulfato de sódio (LSS). Foi utilizado o aparato tipo cesta em 900mL de meio e velocidade de agitação de 50rpm. Quantidade de amostra suficiente para garantir as condições sink foi pesado e colocado na cesta do dissolutor. O teste foi feito em 60 minutos e alíquotas de 5mL foram retiradas

nos tempos 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos. O volume de cada amostra retirada foi imediatamente reposto com o meio de dissolução. As alíquotas retiradas foram filtradas em filtro de membrana Millipore 0,22 µm e quantificadas por CLAE, comprimento de onda de 262nm. O experimento foi realizado em quintuplicata para todas as amostras.

4.2.14 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para o estudo de morfologia das micropartículas foi realizada a microscopia eletrônica de varredura do PZQ, DSM 8, DSM 10 e DSM 12. As amostras receberam banho de ouro por 80 segundos no equipamento BAL-TEC modelo SCD050 sputter coater, Fürstentun Liechtenstein, e em seguida foram inseridas no MEV para a captura das imagens.

4.2.15 Estudo das propriedades de fluxo

Para o estudo das propriedades de fluxo dos microparticulados obtidos, foram realizadas análises do fator de Hausner e do índice de Carr (obtidos pelas densidades aparente e compactada) e também através da análise do ângulo de repouso. Essas análises foram realizadas para todos os experimentos do estudo.

Densidades aparentes livre e compactada

Em uma proveta graduada de 10mL previamente pesada, adicionou-se as amostras até a marcação de 3mL e pesou-se novamente. A densidade aparente (ρa) é obtida pela razão da massa de amostra adicionada (g) pelo seu volume ocupado (mL), indicada pela Equação 4 (ARAUJO, 2010).

$$\rho a \left(\frac{g}{mL}\right) = \frac{\text{massa da amostra}}{\text{volume inicial}} \qquad (4)$$

A mesma proveta, com a amostra, foi submetida à compactação manual até volume constante e da razão entre a massa de amostra (g) e esse novo volume obtido tem-se a densidade compactada (ρc), indicada pela Equação 5.

$$\rho c \left(\frac{g}{mL}\right) = \frac{\text{massa da amostra}}{\text{volume final}} \qquad (5)$$

Determinação do Fator de Hausner e Índice de Carr

O Fator de Hausner (FH) e o Índice de Carr (IC) foram calculados a partir dos valores das densidades aparente e compactada. A razão entre ρc pela ρa é o Fator de Hausner segundo a Equação 6 (ARAUJO, 2010).

$$FH(-) = \frac{\rho a}{\rho c} \qquad (6)$$

O Índice de Carr foi obtido segundo a Equação 7 (ARAUJO, 2010).

$$IC\ (\%) = \left(\frac{\rho c - \rho a}{\rho c}\right) \times 100 \qquad (7)$$

Análise do Ângulo de Repouso

Para avaliar o ângulo de repouso (θ), foi utilizado um sistema com funil de abertura de 1,2cm, com uma altura fixa de 4,6 cm em relação à saída do funil e uma base como suporte de diâmetro de 3,5 cm, de acordo com a Figura 9. Foram pesados aproximadamente 3 g de amostra e colocada no funil e foi medida a altura do cone formado pelas micropartículas. As análises foram feitas em triplicata para cada experimento e o ângulo de repouso foi calculado segundo a Equação 8 (ARAUJO, 2010):

$$\tan^{-1}\theta = \frac{h}{r} \qquad (8)$$

Onde h é a altura do cone formado; e r o raio da base circular.

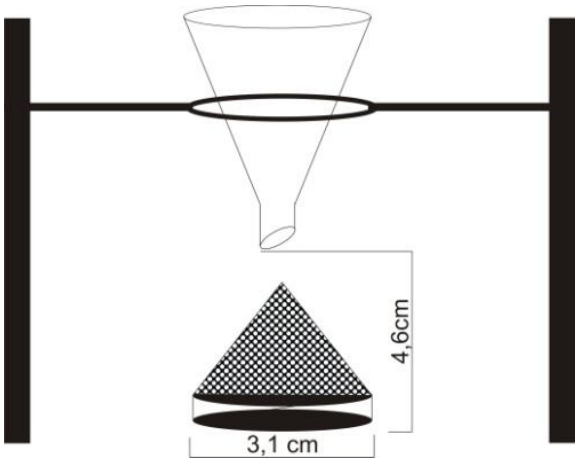


Figura 9- Esquema representativo da medição do ângulo de repouso

4.2.16 Tamanho de Partícula

A distribuição do tamanho de partícula foi determinada por microscopia ótica. 50mg de cada amostra foi disperso em uma lâmina de vidro usando uma câmara de sopro de ar comprimido. As lâminas foram analisadas utilizando uma imagem de alta definição pelo software analisador de imagens Motik Images Plus, conectado a um microscópio ótico Nikon Eclipse E200. Foram captadas, aleatoriamente, imagens suficientes para medir cerca de 1500 partículas através da determinação da sua área projetada e perímetro. A partir desses dados, a área projetada de diâmetro equivalente (conhecida como Diâmetro de Heywood - Hd) foi calculada a partir da Equação (9). A partir dos valores da frequência acumulada da distribuição do diâmetro de Heywood os valores de Hd10, Hd50 e Hd90 foram determinados e usados para calcular a polidispersividade (SPAN), de acordo com a equação (10). SPAN representa uma medida da largura da distribuição de tamanho de partícula onde Hd10, Hd50 e Hd90 representam os diâmetros menores ou iguais àqueles medidos em 10, 50 e 90% da distribuição do tamanho de partícula (GUIMARÃES et al., 2015).

$$Hd = \frac{\mathbf{4A}}{\boldsymbol{\pi}} \quad (9)$$

$$\mathrm{SPAN} = \frac{(\mathrm{Hd90} - \mathrm{Hd10})}{\mathrm{Hd50}} \quad (10)$$

Onde Hd é o diâmetro de Heywood, A é a área projetada

4.2.17 Ensaios *in vitro* de eficácia

Este estudo foi realizado em parceria com o Departamento de Biologia Animal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob supervisão da Professora Silmara Allegretti. Esses estudos *in vitro* e *in vivo* de eficácia tiveram a aprovação do Comitê de Ética para uso de animais (CEUA/UNICAMP, protocolo 2170-1)

Ciclo de vida dos parasitas e infecção dos animais

Neste estudo utilizou-se a linhagem de *Schistosoma mansoni* BH (oriunda de Belo Horizonte, MG, Brasil). Esta linhagem é mantida em moluscos, planorbídeos *Biomphalaria glabrata,* no departamento de Biologia Animal, IB, Unicamp. Para realização dos ensaios *in vitro*, foram utilizados camundongos fêmeas (*Mus musculus),* linhagem *Swiss*-SPF com 30 dias de idade pesando ≈ 22g foram infectadas individualmente com ± 100 cercárias de *S. mansoni,* utilizando-se a técnica de imersão caudal em suspensão cercariana, durante duas horas com exposição à luz e temperatura de aproximadamente 28ºC (Oliver & Stirewalt, 1952). Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp.

Obtenção dos vermes adultos de *S. mansoni*

Após 60 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os vermes adultos de *S. mansoni* foram recuperados por meio da perfusão do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas de acordo com Pellegrino & Siqueira, (1956). Os mesmos foram lavados, cuidadosamente, por três vezes, em meio de cultura RPMI-1640 (Nutricell®).

Preparação da Cultura *in vitro*

Após lavagens dos vermes, um casal foi transferido para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços (TTP®), contendo meio de cultura RPMI-1640 (Nutricell®) composto por 0,05 g/L de estreptomicina, 10.000 UI/mL de

penicilina, 0,3 g/L de L- Glutamina, 2,0 g/L de D- Glicose, 2,0 g/L de $NaHCO_3$ e 5,958 g/L de Hepes. Os ensaios foram realizados em triplicata para os dois grupos: Grupo I (DSM 12) e Grupo II- PZQ puro, nas concentrações: (C1) 5 µg/mL; (C2) 10 µg/mL; (C3) 25 µg/mL; (C4) 50 µg/mL; (C5) 100 µg/mL. O grupo controle negativo foi mantido em meio RPMI-1640 sem adição de fármaco. O volume final de cada poço foi de 2 mL. As amostras foram solubilizadas em solução tamponada "*Phosphate Buffered Saline*" (PBS). Após o preparado das placas, estas foram incubadas em estufa de CO_2 5% a 37°C (Xiao et al., 2007). Todos os ensaios foram realizados em cinco réplicas, observados em microscópio invertido (Leica®) DMI-500, em intervalos crescentes e regulares 30',1h, 2h, 4h, 6h e 24h. Foram avaliados os seguintes parâmetros: motilidade, oviposição, alterações tegumentares e/ou morfológicas e, sobretudo, a mortalidade dos parasitas (OLIVEIRA et al., 2012).

4.2.18 Ensaios *in vivo* de eficácia

Grupos Experimentais para os Tratamentos

Para a realização dos tratamentos *in vivo* os camundongos foram organizados em três grupos experimentais n= 05 animais por grupo. (**Grupo I**) - tratado com (DSM12), (**Grupo II**) - tratado com PZQ puro, em dose única de 200 mg/kg, através de tubagem esofágica, após 45 dias de infecção e (Grupo II) – Controle, infectado e não tratado, receberam 0.3mL de PBS. Esses estudos *in vitro* e *in vivo* de eficácia tiveram a aprovação do Comitê de Ética para uso de animais (CEUA/UNICAMP, protocolo 2170-1)

Análises dos Tratamentos

Avaliação da carga parasitária

Para avaliar a carga parasitária dos animais tratados, duas semanas após os tratamentos os camundongos foram eutanasiados por meio do deslocamento cervical e submetidos à perfusão do sistema porta-hepático de acordo com Pellegrino & Siqueira, (1956). Os vermes recuperados foram colocados em placa de Petri contendo solução salina NaCl 0,85%, estes foram quantificados e identificados segundo o sexo e vermes acasalados com auxílio

de estereomicroscópio. Para o cálculo das porcentagens de redução de vermes (RV) utilizou-se a fórmula de acordo com Delgado et al., 1962 (Equação 11).

$$\%RV = \left(\frac{\mathrm{TVC-TVT}}{\mathrm{TVT}}\right).100 \quad (11)$$

Onde: %RV é a porcentagem de redução de vermes, TVT é o total de vermes do grupo controle e TVT é o total de vermes do grupo tratado.

Efeito dos tratamentos sobre a oviposição dos vermes

Para avaliação deste parâmetro foi aplicado o método do oograma. Para análise foi retirado um fragmento (1cm) do intestino delgado de cada animal tratado para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a oviposição e maturação dos ovos: 1º a 4º estágios (ovos imaturos) 5º estágio (ovos maduros), ovos mortos e cascas. Para tanto, foram analisados 10 campos aleatórios em microscópio óptico com aumento de 10x. A classificação dos estágios de desenvolvimento dos ovos estão de acordo com o critério proposto por Hermeto e colaboradores (1994).

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação do PZQ por espectrofotometria UV/Vis

Por ser de fácil execução e baixo custo, a espectrofotometria UV/Vis é uma técnica muito utilizada para a quantificação de fármacos na forma de medicamentos.

Para garantir uma quantificação confiável realizou-se a padronização da metodologia para a quantificação do PZQ nas amostras desse estudo, em especial para os ensaios de solubilidade e perfil de dissolução. Foi realizada uma varredura do PZQ entre 190-600nm para identificar o comprimento de onda de máxima absorção. Este comprimento foi identificado em 262nm e as análises por espectrofotometria UV/Vis foram realizadas nesse comprimento de onda. Esse valor de absorbância está de acordo com o encontrado na literatura científica.. Em 2006 Passerini e colaboradores encontraram o valor de 262nm, muito próximo ao encontrado nesse estudo.

A validação da metodologia desenvolvida para a quantificação do PZQ foi realizada seguindo as normas de ANVISA, segundo os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e seletividade, permitindo assim resultados seguros e confiáveis (BRASIL, 2003).

5.1.1 Linearidade

A Figura 10 mostra a curva analítica do praziquantel em água. Os resultados apresentados mostram a média das absorbâncias obtidas para cada uma dessas concentrações em relação à concentração teórica de cada uma.

A partir da regressão linear dos dados foi obtido o coeficiente de correlação linear r de 0,9995 e a equação da reta $y = 0,9702x + 0,0269$, em que x é a concentração de PQZ na amostra em mg/mL e y a absorbância no comprimento de onda de 262nm.

A partir da análise estatística de regressão linear dos mínimos quadrados podemos afirmar que o método é linear dentro do intervalo de estudo (de 0,05 a 0,8mg/mL). Obteve-se um excelente coeficiente de correlação linear $r=0,9996$, pois são aceitos pela ANVISA valores de $r \geq 0,99$ (BRASIL, 2003).

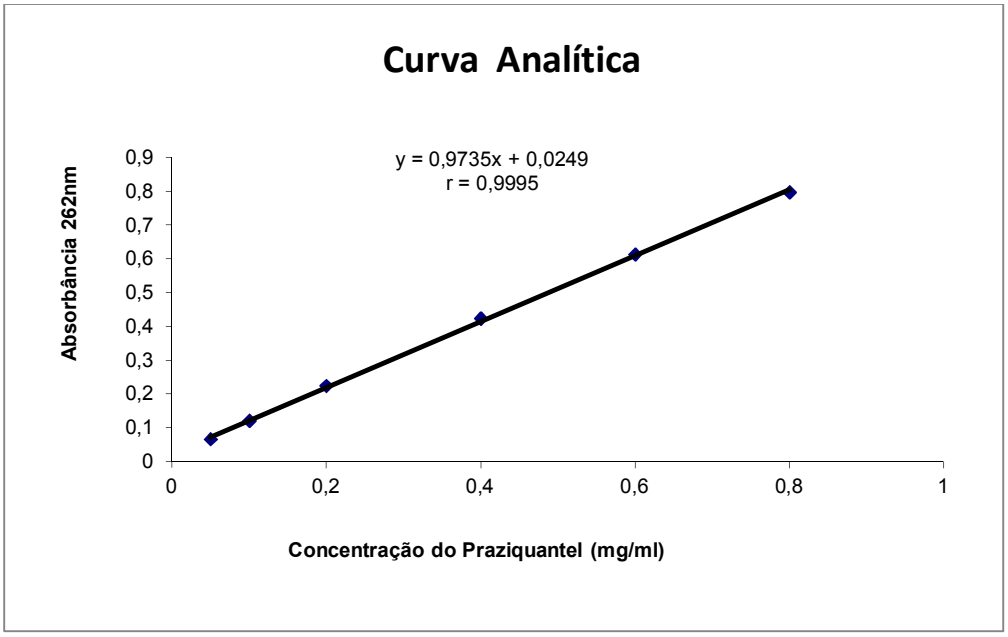


Figura 10 - Curva analítica do PZQ em água por espectrofotometria UV/Vis

5.1.2 Precisão e Exatidão

Foi realizada a precisão e exatidão interdias e intradias. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para a precisão e exatidão intercorridas. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para a precisão e exatidão intradias.

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se afirmar que o método de análise é preciso e exato. Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003) são aceitos valores de precisão (CV%) de no máximo 5%. Os valores de exatidão foram superiores a 95%.

Tabela 3 - Exatidão e Precisão interdias

Concentração teórica (mg/mL)	Concentração analisada (mg/mL)	Exatidão (%)	Precisão (CV%)
0,05	0,047±0,001	94,71	2,11
0,4	0,409±0,003	102,23	0,85
0,8	0,792±0,002	99,05	0,29

Os resultados representam a média das triplicatas ± desvio padrão

Tabela 4 – Exatidão e Precisão intradias

Concentração teórica (mg/mL)	Concentração analisada (mg/mL)	Exatidão (%)	Precisão (CV%)
0,05	0,048±0,0008	96,31	1,78
0,4	0,412±0,003	102,89	0,78
0,8	0,790±0,001	98,80	0,23

Os resultados representam a média das triplicatas ± desvio padrão

5.1.3 Seletividade

Foi realizada uma análise da interferência dos carreadores utilizados nesse estudo. Os resultados mostraram que o sorbitol e o aerosil não apresentaram absorbâncias significantes no comprimento de onda de 262nm, garantindo assim que o método é seletivo para a quantificação do PZQ mesmo em presença desses carreadores.

5.2 Quantificação do PZQ por CLAE

A Figura 11 mostra a curva analítica do praziquantel em água. Os resultados apresentados mostram a média das absorbâncias obtidas para cada uma dessas concentrações em relação à concentração teórica de cada uma.

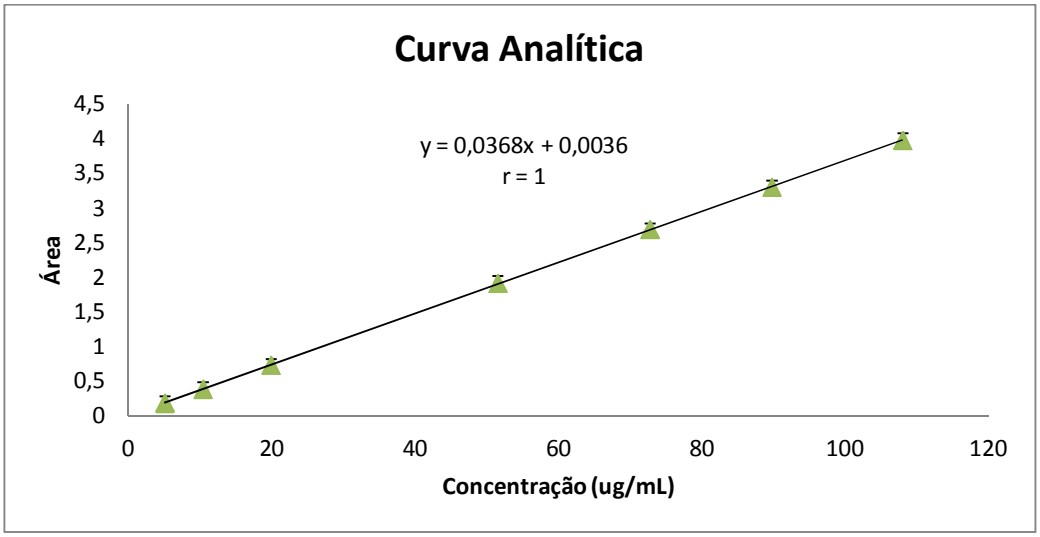


Figura 11 - Curva analítica do PZQ em água por CLAE

A partir da regressão linear dos dados foi obtido o coeficiente de correlação linear r de 1 e a equação da reta y = 0,0368x + 0,0036, em que x é a

concentração de PQZ na amostra em µg/mL e y a área do pico no comprimento de onda de 262nm.

A partir da análise estatística de regressão linear dos mínimos quadrados podemos afirmar que o método é linear dentro do intervalo de estudo (5 a 110 µ/mL). Obteve-se um excelente coeficiente de correlação linear r=0,9996, pois são aceitos pela ANVISA valores de r≥0,99 (BRASIL, 2003).

5.2.1 Precisão e Exatidão

Foi realizada a precisão e exatidão interdias e intradias. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para a precisão e exatidão intercorridas. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para a precisão e exatidão intradias.

Tabela 5 - Exatidão e Precisão interdias

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração analisada (µg/mL)	Exatidão (%)	Precisão (CV%)
5	5,061 ± 0,004	101,22	0,08
50	51,500 ± 0,014	103,00	0,03
110	107,986 ± 0,008	98,17	0,01

Os resultados representam a média das triplicatas ± desvio padrão

Tabela 6 - Exatidão e Precisão intradias

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração analisada (µg/mL)	Exatidão (%)	Precisão (CV%)
5	5,193 ± 0,008	103,86	0,15
50	51,500 ± 0,007	103,00	0,01
110	107,986 ± 0,006	98,17	0,01

Os resultados representam a média das triplicatas ± desvio padrão

De acordo com os resultados, pôde-se afirmar que o método de análise é preciso e exato. Segundo a ANVISA são aceitos valores de precisão (CV%) de no máximo 5%. Os valores de exatidão foram superiores a 95%.

5.2.2 Seletividade

Foi realizada uma análise da interferência dos carreadores utilizados nesse estudo. Os resultados expressos nas Figuras 12 e 13 mostraram que o

tempo de retenção do PZQ foi de 5,413 minutos, já o cromatograma contendo uma mistura de sorbitol e aerosil não apresentaram absorbâncias significantes no comprimento de onda de 262nm, garantindo assim que o método é seletivo para a quantificação do PZQ mesmo em presença desses carreadores.

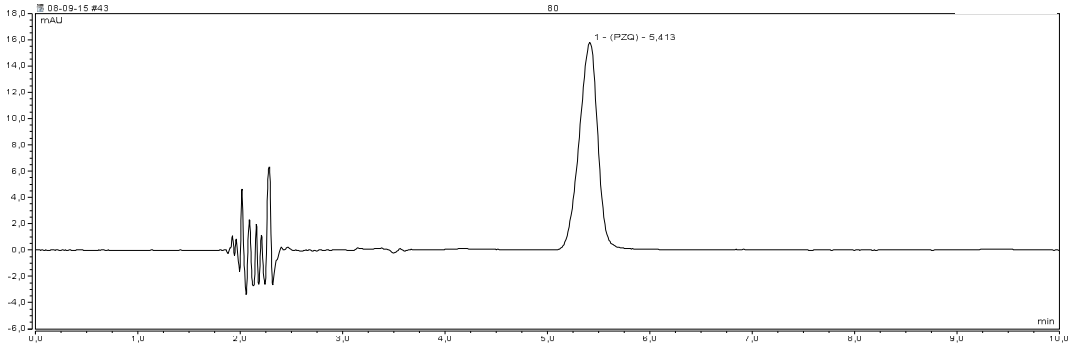


Figura 12 - Cromatograma do PZQ na concentração de 50µg/mL

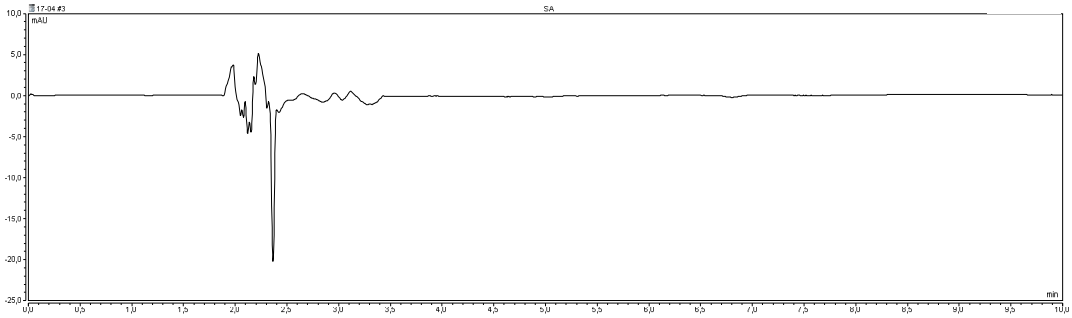


Figura 13 -Cromatograma da mistura Aerosil/Sorbitol para avaliar seletividade

5.2.3 Eficiência de Encapsulação

Os valores foram da eficiência de encapsulação, expressos na Tabela 7, calculados a partir do conteúdo de fármaco encontrado em cada microparticulado, por CLAE e variaram de 92 a 101%. Esses resultados mostraram que os valores encontrados experimentalmente foram muito próximos ao valor teórico de fármaco, mostrando que a técnica de *spray dryer* apresentou uma excelente eficiência de encapsulação. Fouad e colaboradores (2011) encontraram como resultados valores que ficaram em torno de 90% para a produção de misturas binárias de celecoxib por *spray dryer*. Wua e colaboradores (2014) encontraram resultados que variaram de 12 a 70% em seu estudo sobre a microencapsulação do Sulforafano por *spray dryer,* essa

baixa eficiência foi atribuída a uma possível degradação do ativo na temperatura estudada.

Tabela 7 - Eficiência de Encapsulação (%)

Amostra	Eficiência (%)
DSM5	92,58+-0,0775
DSM6	96,29+-0,0194
DSM7	98,21+-0,0167
DSM8	99,7+-0,0204
DSM9	94,43+-0,0393
DSM10	99,74+-0,0512
DSM11	92,18+-0,0433
DSM12	101,06+-0,0276
13	101,11+-0,0232
14	99,93+-0,0531

*Porcentagens encontradas+-desvio padrão. Todas as amostras apresentaram CV%<5%. CV% = coeficiente de variância.

5.3 Ensaios de Solubilidade

O estudo de solubilidade foi feito com a intenção de comparar a influência dos carreadores e do processo de produção de dispersões sólidas no aumento da solubilidade. Ele foi realizado com as misturas físicas, dispersões sólidas microparticuladas por *spray dryer* e o praziquantel puro como meio de comparação. Comparou-se a solubilidade das misturas físicas com as dispersões sólidas para verificar se o processo de obtenção das dispersões sólidas foi eficaz no aumento da solubilidade e usou-se o PZQ puro para verificar o quanto essa solubilidade foi aumentada.

A Figura 14 relaciona os valores de solubilidade de cada experimento obtido e o gráfico ilustrado na Figura 5 mostra de forma mais clara o aumento de solubilidade comparativamente em cada experimento.

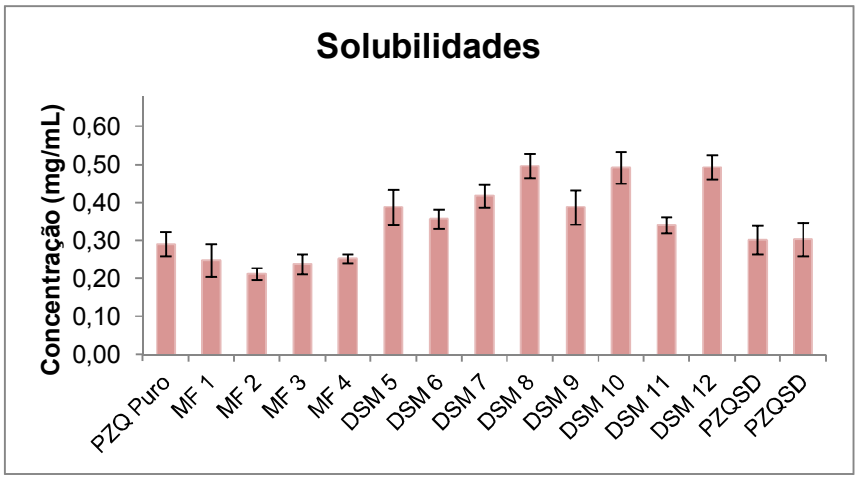


Figura 14 - Gráfico da análise de solubilidade das MF e DS por *spray dryer*. Desvio Padrão ≤5%.

Como pode ser observado, as MF permaneceram praticamente com a mesma solubilidade do PZQ puro, não demonstrando alterações significantes nos valores de solubilidade. Para as DSM, o valor da solubilidade variou de 0,358 a 0,617 mg/mL, o que confere uma solubilidade de 1,50 a 2,59 vezes maior que o PZQ puro. O teste T-student mostrou significância dos resultados obtidos para todas das DSM, com p≤5% e as DSMs 8, 10 e 12 foram significantes quando comparadas as demais DSMs. Para os experimentos 13 e 14 que são PZQ puro secos em *spray dryer* nas temperaturas utilizadas no processo, para controle, não houve também aumento significante de valor de solubilidade em relação ao PZQ puro sem passar pelo *spray dryer.* A partir desses resultados podemos afirmar que a técnica de *spray dryer* foi eficiente no aumento da solubilidade do PZQ utilizando os carreadores escolhidos nesse estudo. Em 2011, Correa e colaboradores encontraram um aumento de solubilidade do PZQ em dispersões solidas com PEG6000 mas com valor máximo de 1,85 vezes. Em 2013 Chaud e colaboradores encontraram valores de aumento de solubilidade para suas dispersões sólidas de PZQ em óleo de rícino que variaram entre 1,3 a 2,25 vezes. Campos e colaboradores (2016), em seu estudo de hidrogéis de PZQ conseguiram um aumento de 1,4 vezes. Com esses resultados comparativos encontrados na literatura científica podemos afirmar que a técnica de obtenção de dispersões sólidas de PZQ com Aerosil e Sorbitol, por *spray dryer* teve ótimos resultados.

5.4 Caracterização das Misturas Físicas e Dispersões Sólidas

A caracterização das dispersões sólidas foi realizada apenas para 3 amostras de melhor solubilidade, que são as 3 amostras escolhidas para os testes de estabilidade acelerada. São elas: DSM 8, DSM 10 e DSM 12.

5.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica de DSC foi utilizada para avaliar possíveis interações entre o PZQ e os carreadores utilizados, bem como avaliar juntamente com as demais técnicas escolhidas nesse estudo a estabilidade das amostras obtidas.

A Figura 15 mostra o perfil calorimétrico do PZQ, sendo observado um pico endotérmico em 142,40°C, temperatura ligeiramente acima da indicada pela Farmacopeia Brasileira (1996) que está entre 136-140°C, porém próxima do valor encontrado por Passerini e colaboradores em 2006 de 143,14°C. Segundo Liu e colaboradores (2004), que estudaram as formas enantioméricas do praziquantel e constataram que a mistura racêmica, (±)-PZQ, e a forma enantiomérica (-)-PZQ apresentam picos endotérmicos em 136,2°C e 110,6°C respectivamente, com base nesse estudo concluiu-se que o PZQ estudado neste trabalho encontra-se na sua forma racêmica.

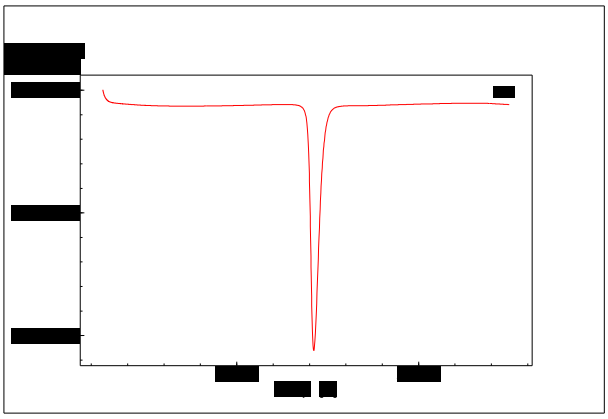


Figura 15 - Curva de DSC do praziquantel

O PZQ estudado apresentou uma entalpia de fusão de ΔH= -84,85 J/g, pouco abaixo do valor encontrado por Passerini e colaboradores (2006) que foi de ΔH= -98,3 J/g. A Figura 16 mostra o perfil calorimétrico do sorbitol, que apresentou pico endotérmico em 100ºC e do aerosil, que por ser amorfo não apresentou picos.

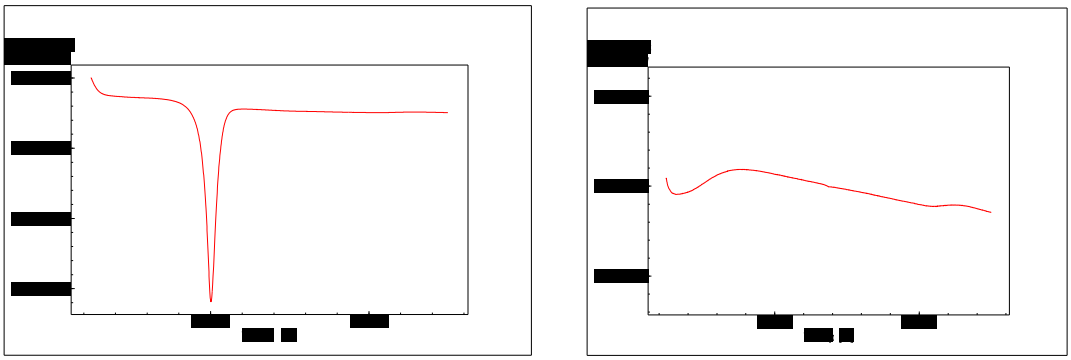


Figura 16 - Curva de DSC do Sorbitol e Aerosil respectivamente

5.4.2 Termogravimetria (TGA)

Esta análise térmica foi utilizada para verificar se tanto o fármaco quanto os carreadores do presente estudo resistiriam ao processo de obtenção de dispersões sólidas por *spray dryer*.

A Figura 17 mostra o comportamento termogravimétrico do praziquantel, que apresentou uma única etapa de decomposição, tendo início em 196,83°C e término em 351,88°C com uma perda de massa de 98,92% apresentando uma massa residual final de 1,08%.

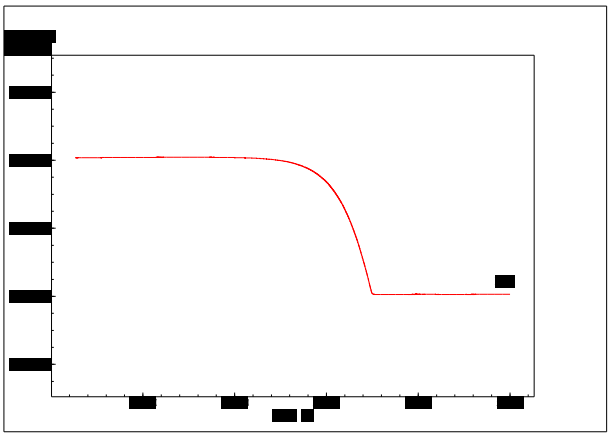


Figura 17 - Curva de TGA do PZQ

Com esses dados pode-se afirmar que a técnica de obtenção de dispersões sólidas microparticuladas de PZQ por *spray dryer* é segura e não provocou a degradação do praziquantel.

Na Figura 18 observamos o comportamento termogravimétrico do sorbitol e aerosil. O sorbitol apresentou uma única etapa de decomposição, em torno de 200ºC no início e término em 350ºC, e o aerosil não apresentou decomposição na temperatura estudada.

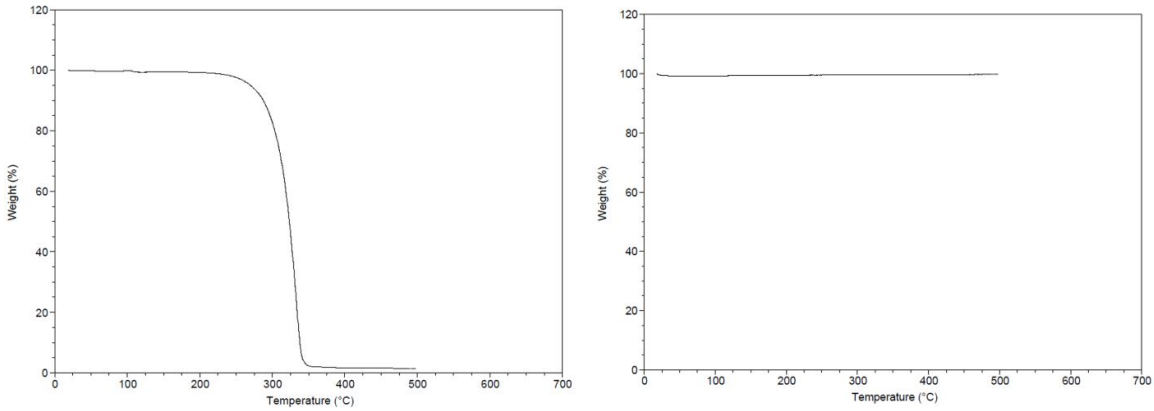


Figura 18 - Curva de TGA do Sorbitol e Aerosil, respectivamente.

5.4.3 Difração de Raios-X

A Figura 19 apresenta os difratogramas do PZQ, aerosil e sorbitol. O PZQ, fármaco cristalino, apresentou picos acentuados e intensos em 2θ aproximadamente em 5, 8 e 22º como encontrados por Passerini e colaboradores, 2006. O sorbitol apresentou picos em 2θ aproximadamente em a 10 e 20º e o aerosil, carreador amorfo, não apresentou picos.

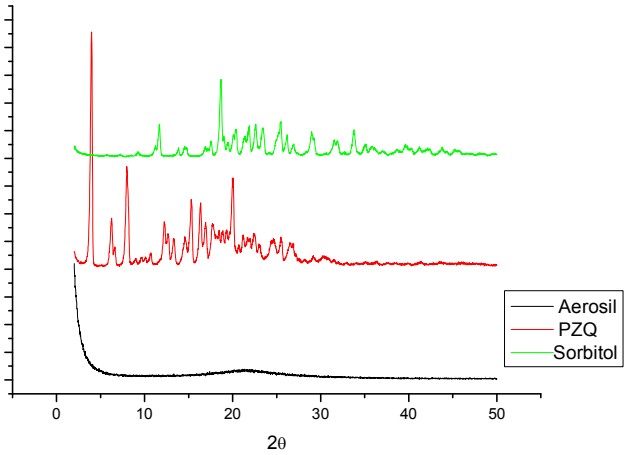


Figura 19 - Difratogramas do Aerosil, Sorbitol e Praziquantel

5.4.3 Infravermelho

A Figura 20 apresenta o espectro de vibração na região de infravermelho do praziquantel e são observadas várias bandas características dos grupos funcionais presentes.

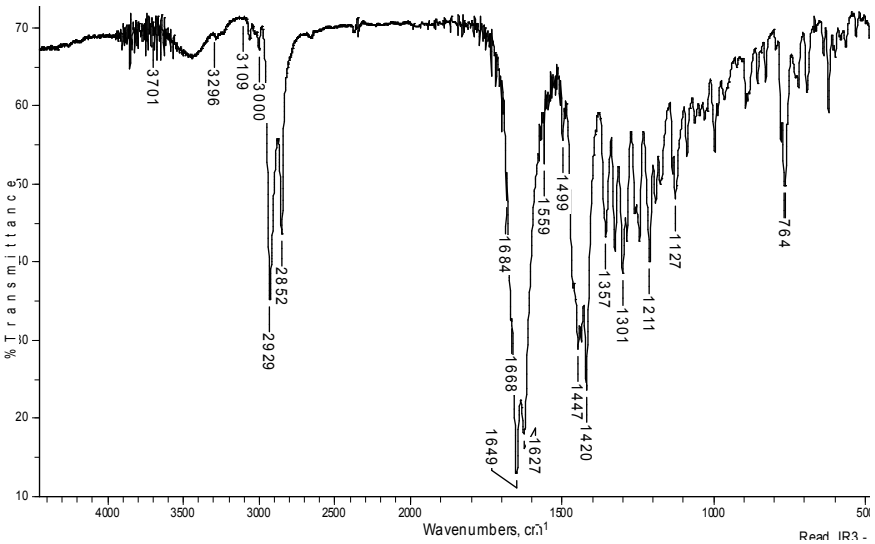


Figura 20 - Espectro de Infravermelho do Praziquantel

São observadas duas bandas referentes à vibração de deformação axial, uma assimétrica de intensidade forte e outra simétrica de intensidade média de C-H cíclico em 2929 e 2852cm^{-1}, respectivamente. Os picos em 1649 e 1627 cm^{-1} correspondem às vibrações amidas do PZQ (PASSERINI et al., 2006); em 1496 e 1447 cm^{-1} são observadas deformações axiais C-C do anel aromático que estão acopladas pela deformação angular simétrica do plano C-H da estrutura cíclica em 1420 cm^{-1} e na região de menor frequência ocorre uma banda em 764 cm^{-1} que corresponde à deformação angular fora do plano de C-H do anel que é importante para caracterizar a presença de anel aromático (SILVA, 2008).

As Figuras 21 e 22 mostram os espectros de vibração no infravermelho do sorbitol e aerosil, respectivamente.

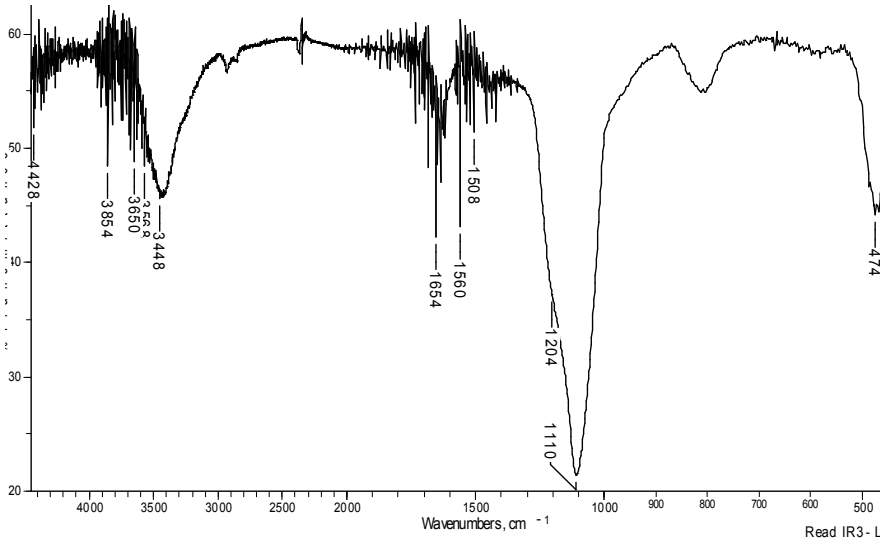


Figura 21 - Espectro de Infravermelho do Aerosil

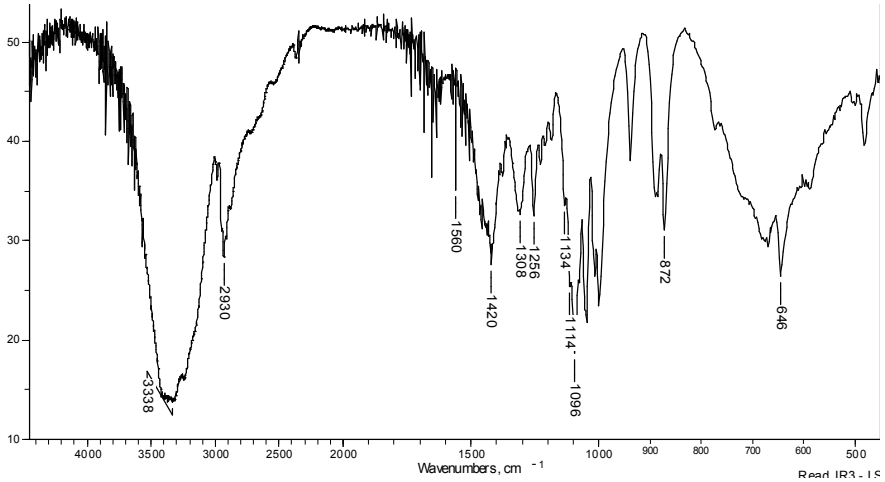


Figura 22 - Espectro de Infravermelho do Sorbitol

5.5 Estudo preliminar de estabilidade pela solubilidade

Nesse estudo avaliou-se a solubilidade das amostras obtidas pelo período de 3 meses, armazenadas 3 temperaturas diferentes. Os resultados do teste preliminar de estabilidade serão mostrados nas Figuras 23 a 25. Podemos observar que com o passar do tempo a solubilidade das amostras aumentou.

As amostras que tiveram o aumento mais significativo foram as DSMs 8, 10 e 12 em todas as temperaturas testadas.

Para a temperatura de 25°C as DSMs 8, 10 e 12 tiveram um aumento em relação ao tempo decorrido de respectivamente 1,17; 1,12 e 1,13 vezes. Em relação ao fármaco puro esse aumento foi de 2,94; 2,81 e 2,68 vezes para as DSMs 8, 10 e 12 respectivamente.

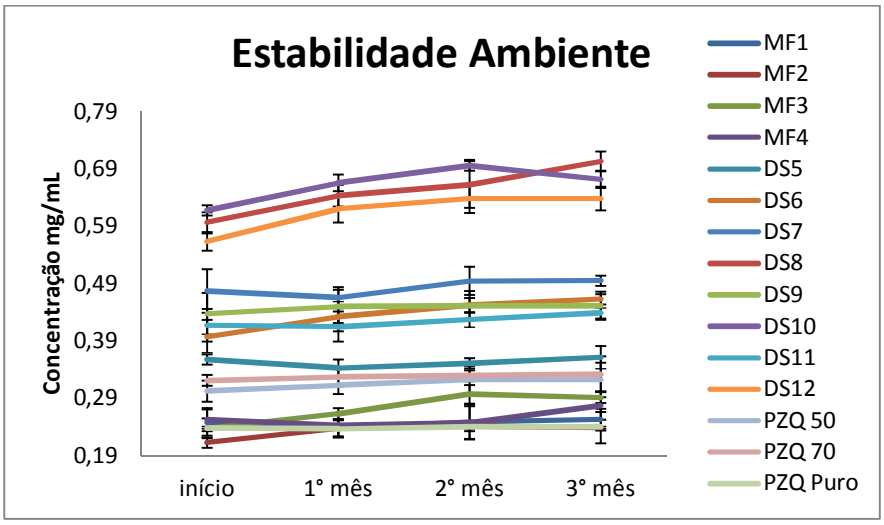


Figura 23 - Teste de estabilidade a 25°. Todas as amostras apresentaram CV%<5%. CV% = coeficiente de variância.

Para a temperatura de 37°C as DSMs 8,10 e 12 tiveram um aumento em relação ao tempo decorrido de respectivamente 1,30; 1,19 e 1,27vezes. Em relação ao PZQ puro esse aumento foi de 2,98; 3,15 e 2,97 respectivamente para as DSMs 8, 10 e 12.

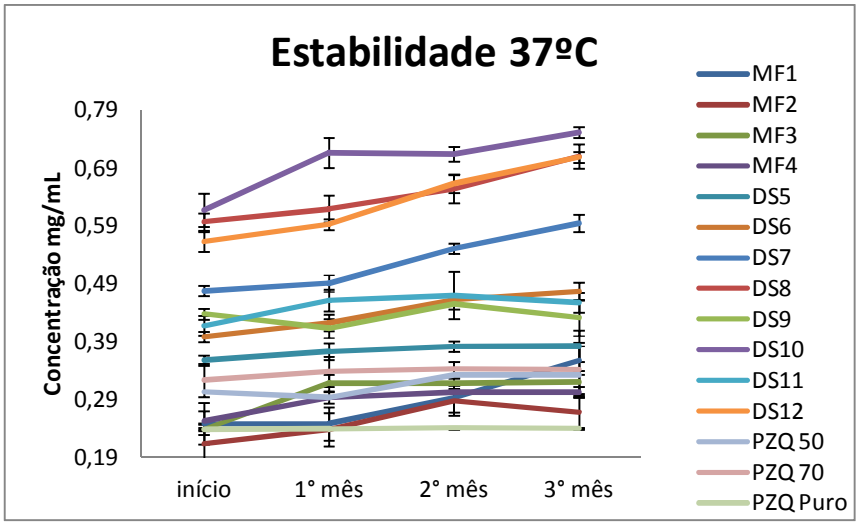


Figura 24 – Teste de estabilidade a 37°C. Todas as amostras apresentaram CV%<5%. CV% = coeficiente de variância.

Para a temperatura de 45°C as DSMs 8, 10 e 12 tiveram um aumento em relação ao tempo decorrido de respectivamente de 1,20; 1,23 e 1,25 vezes. Em relação ao praziquantel puro, esse aumento foi de 3,28; 3,08 e 3,00 vezes para as DSMs 8, 10 e 12 respectivamente.

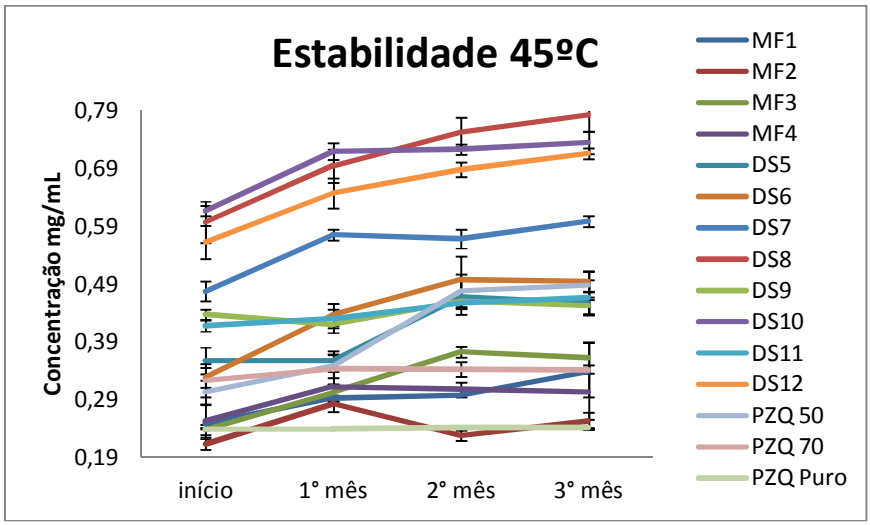


Figura 25 – Teste de estabilidade a 45°C. Todas as amostras apresentaram CV%<5%. CV% = coeficiente de variância.

O praziquantel puro não apresentou essa mudança e as amostras de praziquantel puro que foram secos em *spray dryer* tanto na temperatura de 50°C quanto na temperatura de 70°C apresentaram uma pequena mudança, porém não foi significante com p≤5%, o que pode indicar que o fenômeno não está acontecendo pelo processo de secagem por si só, provavelmente se deve à formação de dispersão sólida de PZQ, mais precisamente quando é realizada com a temperatura do *spray dryer* a 70ºC, onde esse fato pode ser mais evidenciado (DSMs 7, 8, 10 e 12).

Para verificar a possível razão deste fato serão realizadas as análises de, estabilidade por cromatografia quiral, solubilidade, DSC, Raios-x e IR e esses dados serão comparados com os dados do PZQ puro. Em 2008 Silva encontrou que em uma proporção 2:1 de PZQ:PEG houve o aparecimento do pico de DSC do (-)-PZQ, forma ativa do PZQ comercial comprado na sua forma racêmica. Em 2006 Liu e colaboradores fizeram um estudo de diagrama de fases do PZQ quiral para comparar a solubilidade dos enantiômeros em diferentes temperaturas e chegaram à conclusão de que o enantiômero (-)-PZQ

apresentou uma solubilidade até 3 vezes maior, em relação ao PZQ racêmico para as temperaturas por eles estudadas por isso optou-se por avaliar a estabilidade quiral dessas dispersões.

5.6 Estudos de estabilidade acelerada

Após a caracterização, novas amostras de dispersões sólidas foram preparadas em *spray dryer* nas condições selecionadas que correspondem às preparações das DSM 8, 10 e 12. foram Essas amostras foram colocadas em frascos de plástico fechados e protegidos da luz armazenadas por um período de 6 meses em estufa a 40±2ºC com umidade ≥75±2% e em temperatura e umidade ambientes (25 ºC) em caráter comparativo para a realização do estudo de estabilidade acelerada. Os ensaios utilizados nesse estudo foram: avaliação quiral, análise da solubilidade por UV/VIS e CLAE, DSC, Raios-X e FTIR. Esses ensaios foram realizados nos tempos 0, 3 e 6 meses.

5.6.1 Ensaios de solubilidade

As Figuras 26 e 27 mostram a evolução da solubilidade (analisadas em espectrofotômetro UV/VIS, 262nm) das DSMs 8, 10, 12 e PZQ mês a mês até o sexto mês de ensaio na temperatura de 40ºC e ambiente, respectivamente. Pode se verificar um aumento gradativo na solubilidade do PZQ tanto das amostras armazenadas em estufa quanto das amostras armazenadas a temperatura ambiente.

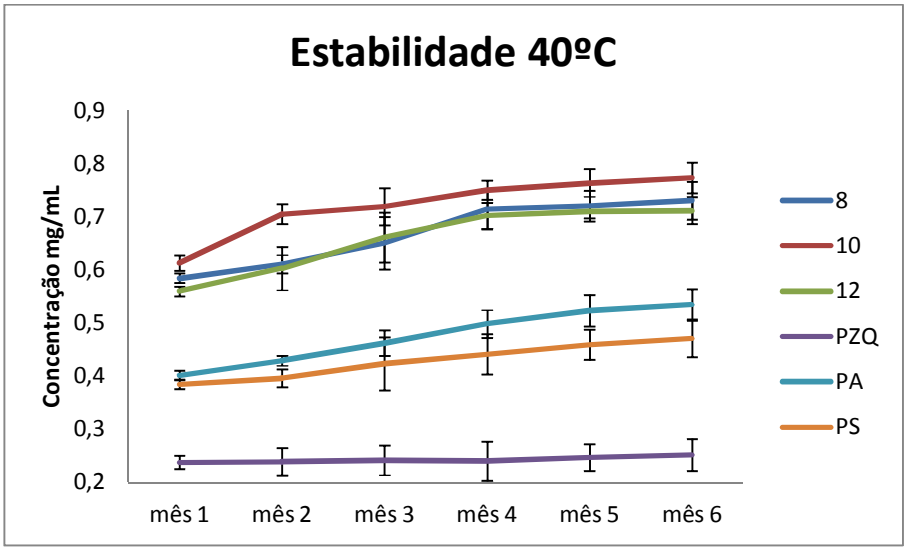


Figura 26 - Estabilidade acelerada pela solubilidade na temperatura de 40ºC. Desvio Padrão ≤5%.

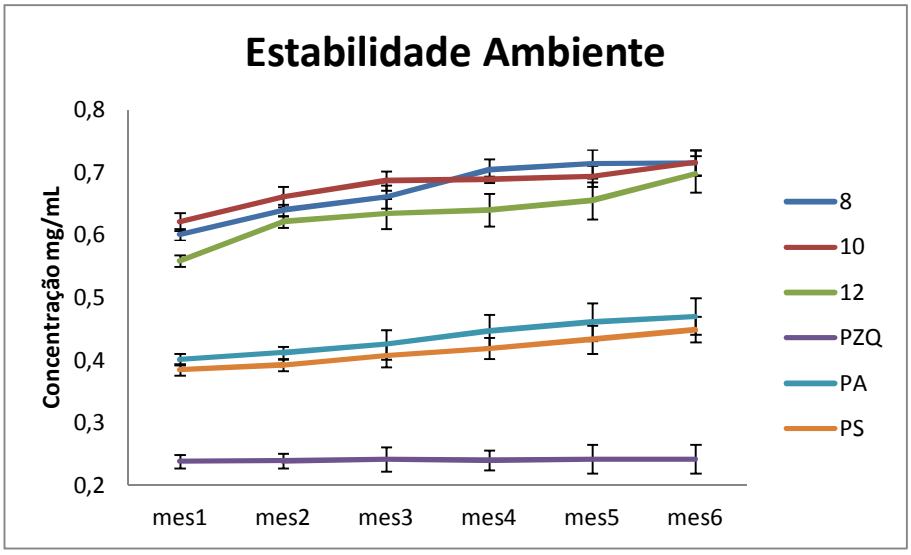


Figura 27 - Estabilidade acelerada pela solubilidade na temperatura ambiente. Desvio Padrão ≤5%.

A DSM 8 da estufa variou de 0,601mg/mL a 0,715mg/mL, o que corresponde a um aumento de 1,18 vezes em relação ao inicio do teste. Em relação ao PZQ puro, esse aumento foi de 2,52 vezes a 3,00 vezes, para essa amostra na temperatura ambiente, a variação foi de 1,16 vezes em relação ao inicio do teste e de 1,65 vezes a 1,91 vezes maior que a solubilidade do PZQ.

A DSM 10 da estufa apresentou uma variação na solubilidade de 0,621 a 0,715mg/mL, o que corresponde a um aumento de 1,15 em relação ao início do teste e 2,60 a 3,00 vezes maior que o PZQ sozinho.

Para a DSM 12 tivemos uma variação na solubilidade com o tempo que foi de 0,559 a 0,697mg/mL, que correspondeu a um aumento de 1,24 vezes em relação ao início do teste e 2,34 a 2,92 vezes em relação ao PZQ.

A amostra PA da estufa apresentou uma variação na solubilidade de 0,401 a 0,534 com o tempo, que correspondeu a um aumento de 1,33 vezes em relação ao inicio do teste e 2,11 vezes em relação ao PZQ puro, para essa mesma amostra armazenada na temperatura ambiente, esse aumento foi de 1,17 vezes em relação ao inicio e 1,94 vezes em relação ao PZQ.

A amostra PS apresentou uma variação na solubilidade de 0,385 a 0,471 o que correspondeu a um aumento de 1,22 vezes em relação ao inicio e 1,86 vezes em relação ao PZQ e para essa mesma amostra armazenada na temperatura ambiente esse aumento foi de 1,14 em relação ao inicio do teste e

1,85 em relação ao PZQ. Esses resultados de aumento solubilidade das DSMs aparentemente se relacionam a temperatura de secagem. Para melhor entendê-los é importante analisar os demais resultados obtidos no estudo de estabilidade acelerada, como DSC e Raios-X.

A Figura 28 mostra o cromatograma da DSM 12 no tempo de 6 meses, que apresentou tempo de retenção em 5,40 minutos, não apresentando nenhum outro pico ao longo do tempo de análise.

As análises feitas por CLAE mostraram também esse aumento da solubilidade das amostras com o tempo e não mostraram nenhum outro pico, durante o tempo de análise, nem no comprimento de 262nm nem em nenhum comprimento de onda, mostrando que este fenômeno não foi um problema de seletividade da técnica de UV/VIS, mas sim um aumento de fato na solubilidade das amostras, como podemos observar na Figura 29.

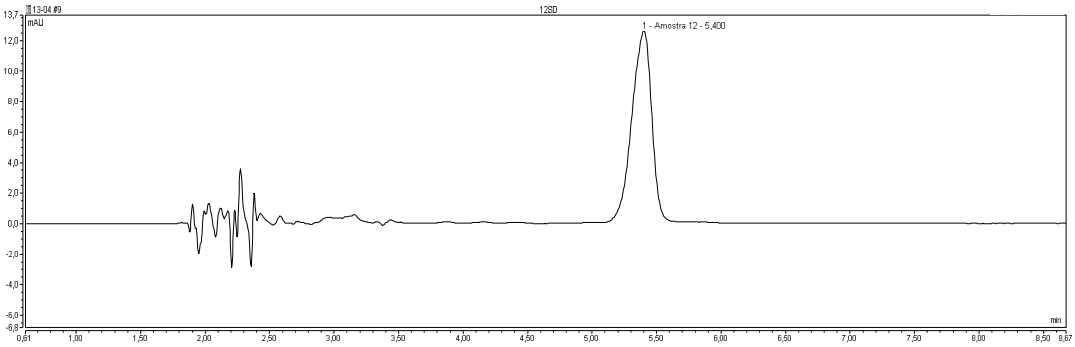


Figura 28 - Cromatograma da DSM 12 armazenada por 6 meses, sem picos de degradação.

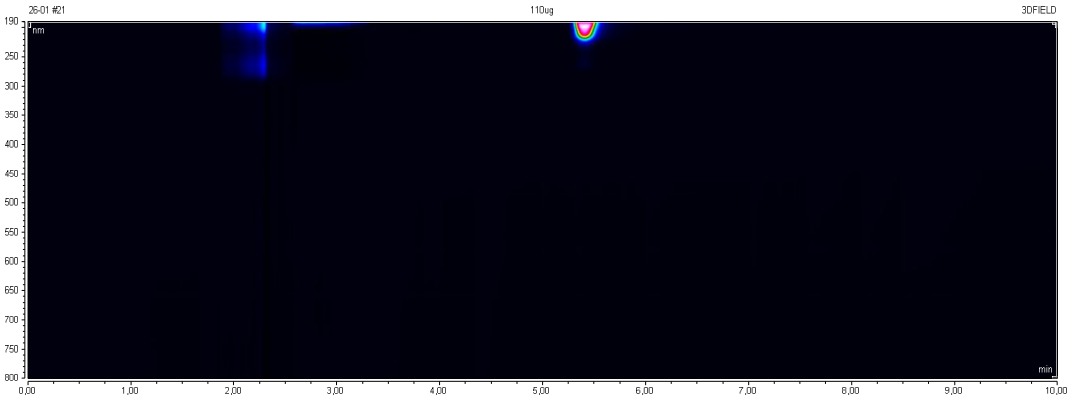


Figura 29 - Espectro de Varredura 3D da DSM 12 mostrando que não há picos de degradação.

Realizou-se também, pelo período de 12 meses de análise, o acompanhamento do aumento da solubilidade das amostras DSM 12, PS, PA e PZQsd, armazenados em estufa, por CLAE para avaliar se a metodologia de análise por UV/VIS pudesse estar escondendo algum outro composto que estivesse absorvendo em um mesmo comprimento de onda.

Analisando a Figura 30 podemos observar que a DSM 12 aumentou em relação ao tempo decorrido 1,39 vezes no tempo de 6 meses 1,43 vezes no tempo de 12 meses e em relação ao PZQsd aumentou 2,38 vezes no inicio e 3,02 vezes ao final do estudo.

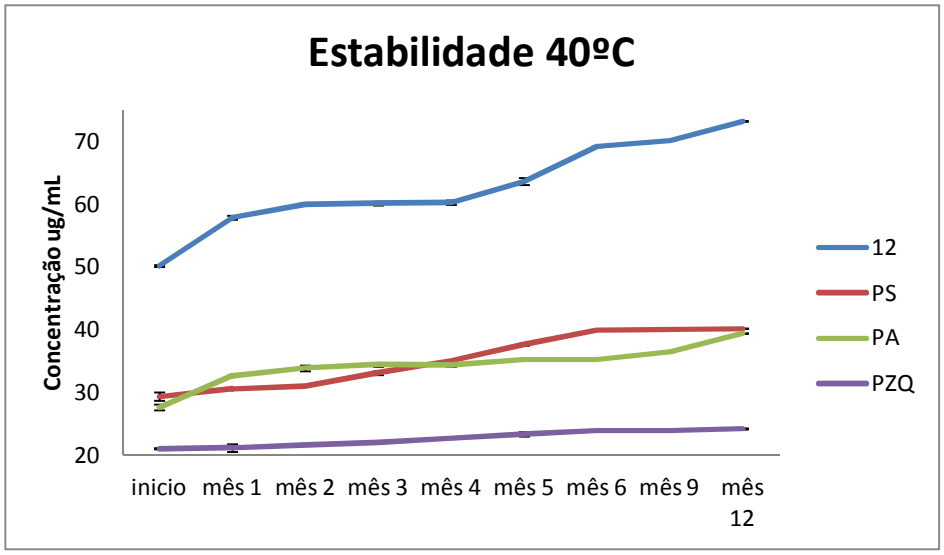


Figura 30 - Estabilidade acelerada pela solubilidade (por CLAE) das DSM 12, PS, PA e PZQsd. Desvio Padrão ≤5%.

A amostra PS aumentou em relação ao tempo decorrido 1,36 vezes no tempo de 6 meses 1,37 vezes no tempo de 12 meses e em relação ao PZQsd aumentou 1,39 vezes no inicio e 1,65 vezes ao final do estudo.

A amostra PA aumentou em relação ao tempo decorrido 1,31 vezes no tempo de 6 meses 1,38 vezes no tempo de 12 meses e em relação ao PZQsd aumentou 1,31 vezes no inicio e 1,58 vezes ao final do estudo.

A amostra PZQsd aumentou em relação ao tempo decorrido 1,13 vezes no tempo de 6 meses 1,51 vezes no tempo de 12 meses.

Observamos para esse estudo que houve também um pequeno aumento na solubilidade do PZQsd, amostra de PZQ que foi seca em *spray*

dryer na temperatura de 70ºC. Podemos avaliar com esse estudo que possivelmente a temperatura de secagem dessas amostras tenha sido responsável pela mudança das formulações que levou a esse fato, que será estudado e avaliado também por outros tipos de análises. Esse aumento da solubilidade com o tempo de armazenamento não foi encontrado em nenhum outro estudo de estabilidade de dispersões sólidas encontrados na literatura científica.

5.6.2 Avaliação Quiral

A Figura 31 mostra o cromatograma quiral do PZQ, com tempos de retenção de 10 e 12min para o (-)PZQ e (+)PZQ respectivamente. Na Figura 32 observamos o espectro de varredura 3d da DSM12 no tempo de 6 meses de estudo mostrando que não houve nenhum outro pico referente à degradação do fármaco.

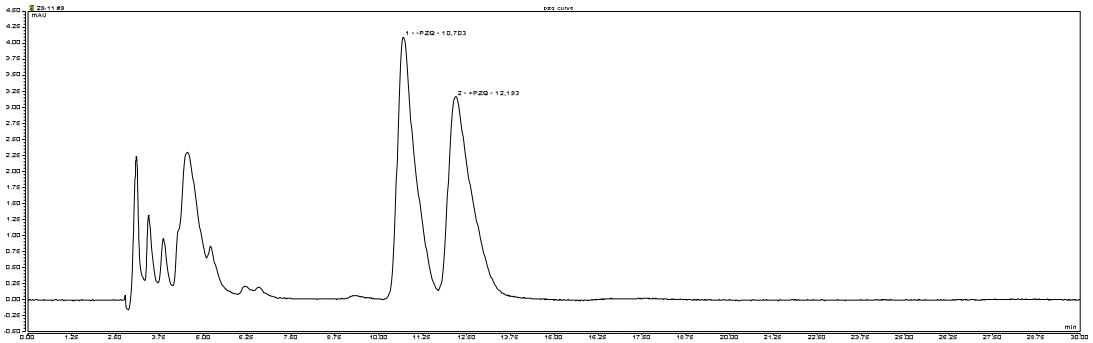


Figura 31 - Cromatograma do PZQ puro

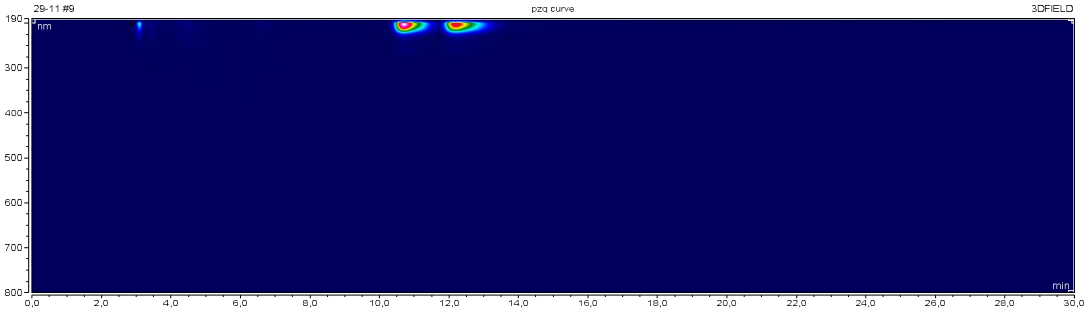


Figura 32 - Espectro de Varredura 3D da DSM 12 mostrando que não há picos de degradação.

A Figura 33 mostra a estabilidade quiral da solubilidade das amostras. Podemos observar que em relação à quiralidade, não houve nenhum tipo de alteração na forma racêmica do PZQ em nenhuma amostra, porém, corroborando os demais resultados, neste também observamos um aumento da solubilidade do PZQ com o tempo de estudo. Para a DSM12, esse aumento em relação ao tempo decorrido foi de 1,32 vezes, para a amostra PS esse aumento foi de 1,06 vezes, para a amostra PA 1,09 vezes e o PZQsd aumentou 1,13 vezes em relação ao tempo inicial.

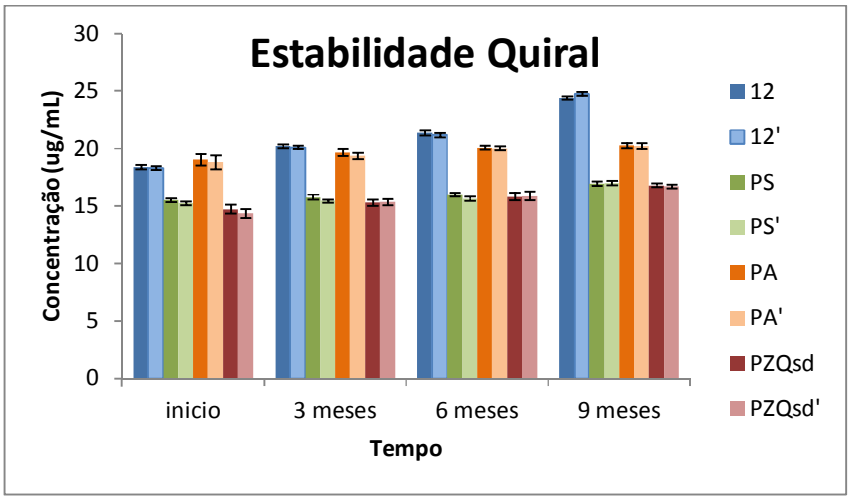


Figura 33 - Estabilidade Quiral das amostras DSM12, PS, PA e PZQsd. Desvio Padrão ≤5%.

5.6.3 Estudo de estabilidade térmica por DSC

Como podemos observar nas Tabelas 8 a 10 e nas Figuras 34 a 36, houve uma diminuição da cristalinidade de todas as amostras com o passar do tempo. As dispersões sólidas da estufa se estabilizaram no seu estado de menor cristalinidade, ou amorfo. Para as DSMs 8,10 e 12 observou-se o surgimento de um pequeno pico em torno de 80ºC, característico de transição vítrea.

Tabela 8 - Perfil calorimétrico da DSM 8

DSM 8	Pico de fusão	Entalpia	Pico de Fusão	Entalpia
8 t0 amb.	84,67ºC	-211,67	142,28ºC	-62,33
8 t3 amb.	61,03ºC	-102,21	141,34ºC	-36,28
8 t6 amb.	65,07ºC	-45,62	140,90ºC	-34,63
8 t0 estufa	84,67ºC	-211,67	142,28ºC	-62,33
8 t3 estufa	62,39ºC	-7,72	138,02ºC	-5,97
8 t6 estufa	67,77ºC	-1,11	138,79ºC	-0,98

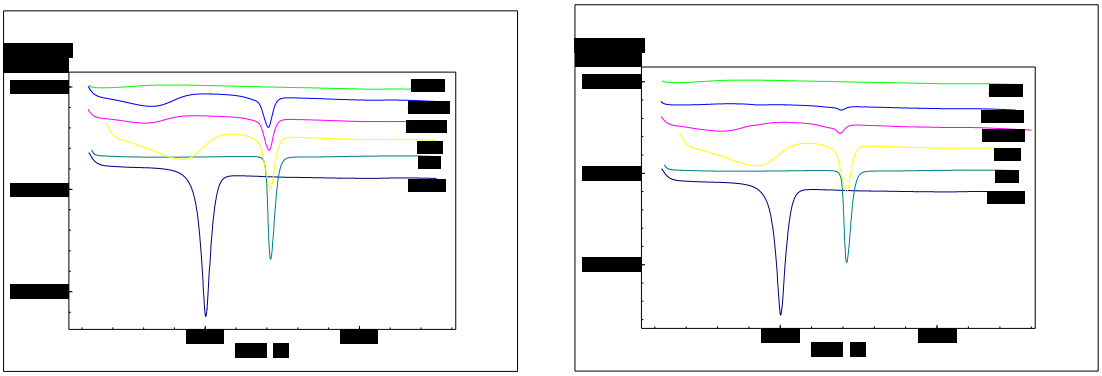


Figura 34 - a) estabilidade acelerada por DSC na temperatura ambiente e b) estabilidade acelerada por DSC na temperatura de 40ºC para a DSM 8 nos tempos de 0, 3 e 6 meses.

Tabela 9 - Perfil Calorimétrico da DSM 10

DSM 10	Pico de fusão	Entalpia	Pico de Fusão	Entalpia
10 t0 amb.	64,71ºC	-138,71	140,70ºC	-61,1
10 t3 amb.	75,88ºC	-116	141,44ºC	-54
10 t6 amb.	73,16ºC	-23,75	140,26ºC	-39,62
10 t0 estufa	75,88ºC	-113,35	142,28ºC	-54,02
10 t3 estufa	71,75ºC / 81,22	0,02171	138,10ºC	-18,79
10 t6 estufa	72,66ºC / 81,87	0,00451	138,11ºC	-12,3

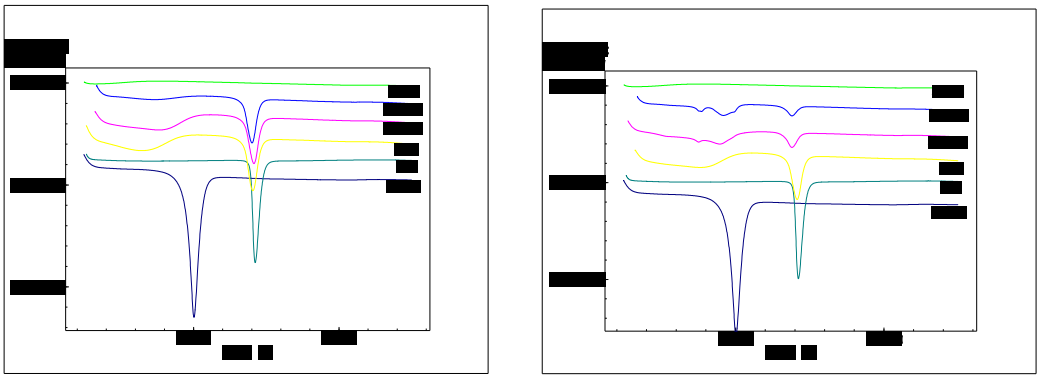


Figura 35 - a) estabilidade acelerada por DSC na temperatura ambiente e b) estabilidade acelerada por DSC na temperatura de 40ºC para a DSM 10 nos tempos e 0, 3 e 6 meses.

Tabela 10 - Perfil Calorimétrico da DSM 12

DSM 12	Pico de fusão	Entalpia	Pico de Fusão	Entalpia
12 t0 amb.	74,69ºC	-127,3	141,95ºC	-86,83
12 t3 amb.	79,21ºC	-107,1	141,98ºC	-43,17
12 t6 amb.	89,44ºC	-15,95	141,50ºC	-38,72
12 t0 estufa	74,69ºC	-97,61	141,95ºC	-87,15
12 t3 estufa	75,67ºC / 88,45	-0,1874	137,33ºC	-11,41
12 t6 estufa	77,01ºC / 82,43	-0,0075	137,46ºC	-5,69

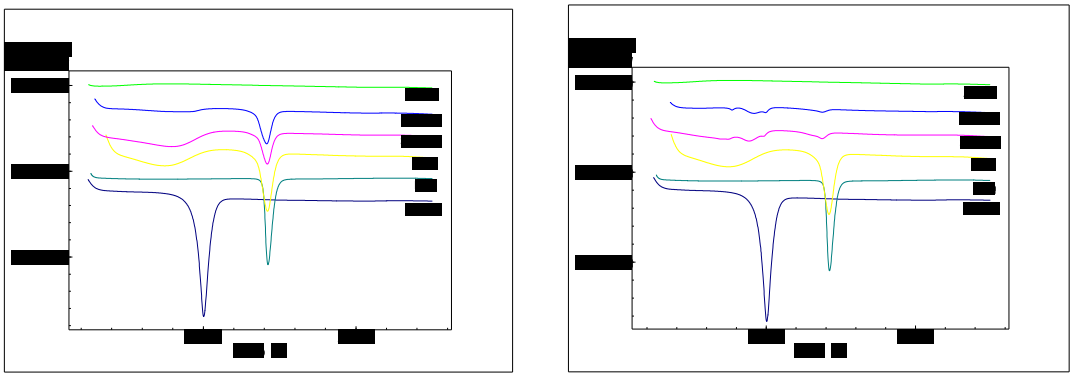


Figura 36 - a) estabilidade acelerada por DSC na temperatura ambiente e b) estabilidade acelerada por DSC na temperatura de 40ºC para a DSM 12 nos tempos de 0, 3 e 6 meses.

A Tabela 11 e a Figura 37 mostram o perfil calorimétrico da MF que apresentou o pico de fusão do sorbitol e do PZQ.

Tabela 11 - Perfil Calorimétrico da amostra MF

Amostra	Pico de fusão	Entalpia	Pico de Fusão	Entalpia
MF	96,98ºC	-18,26	138,99ºC	-11,47

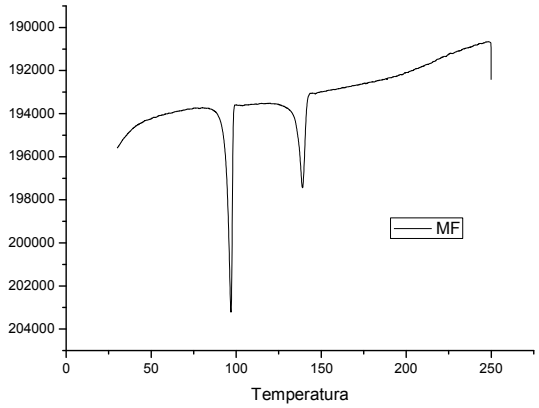


Figura 37 - DSC da amostra MF

Como pode ser visto nas Figuras 38 e 39 e na Tabela 12, para as amostras PA, PS e PZQsd também houve uma perda de cristalinidade, porém muito pequena. A amostra PZQsd,no tempo de 3 e 6 meses apresentou um novo e discreto pico na temperatura de 83,90ºC, de entalpia ΔH=-0,75, caracterizando-se possivelmente como um pico relativo à transição vítrea do fármaco.

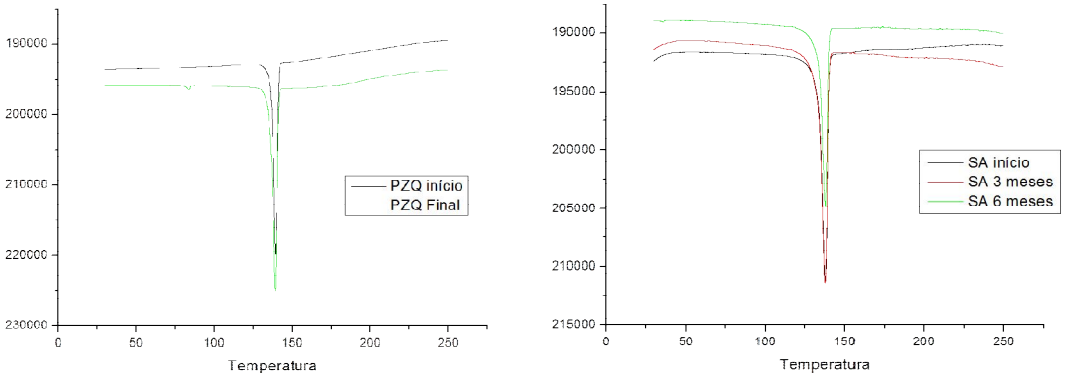


Figura 38 - a) DSC do PZQ no início e após 6 meses de teste. b) DSC da amostra PA no início, 3 meses e 6 meses de teste.

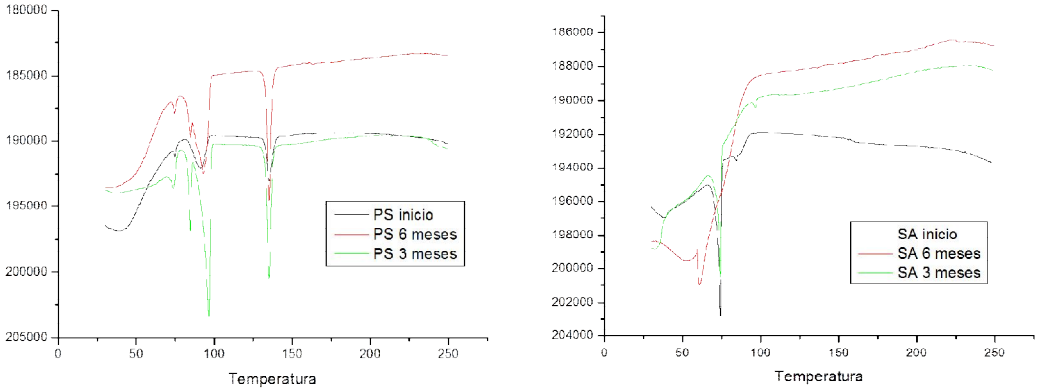


Figura 39 - a) DSC da amostra PS no início, 3 meses e após 6 meses de teste. b) DSC da amostra SA no início, 3 meses e 6 meses de teste.

Tabela 12 - Perfil Calorimétrico das amostras SA, PA, PS, PZQsd

Amostra	Pico de fusão	Entalpia	Pico de Fusão	Entalpia
SA início	23,64	-0,95	61,21	-8,07
SA 3 meses			74,21	17,26
SA 6 meses	21,41	-11,30	74,20	-13,68
PA inicio			138,0	-55,71
PA 3 meses			138,07	-55,21
PA 6 meses			137,78	-50,57
PS inicio	74,77	-3,41	135,19	-20,29
PS 3 meses	84,88	-1,71	135,10	-19,11
PS 6 meses	84,70	-0,98	135,05	-10,81
PZQsd início			139,27	-52,88
PZQsd 3 meses	83,90	-0,75	139,17	-50,01
PZQsd 6 meses	83,94	-0,69	139,08	-48,77

5.6.4 Difração de Raios-X

A Figura 40 mostra o difratograma da amostra MF, onde podemos observar os principais picos do PZQ e novamente o difratograma das amostras sorbitol, aerosil e PZQ para comparação. As Figuras 41 a 43 mostram os difratogramas das DSM 8, 10 e 12 armazenadas na temperatura ambiente (a esquerda) e em estufa (a direita). As curvas em vermelho mostram os difratogramas iniciais, em verde os difratogramas de 3 meses e em preto os difratogramas de 6 meses de análise. Podemos observar para todos eles que com o passar do tempo a cristalinidade foi diminuindo e as amostras da estufa, no último mês de análise, se encontram no estado amorfo.

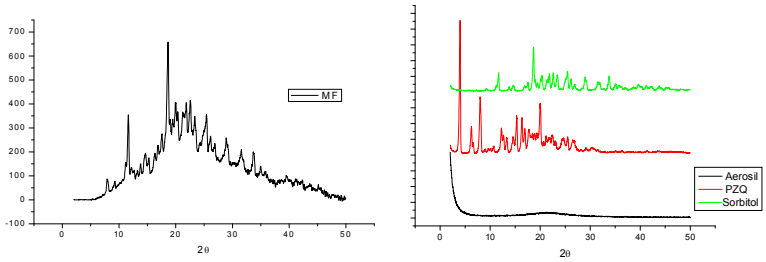


Figura 40 - Raio-X da amostra MF e Raios-x das amostras PZQ, aerosil e Sorbitol

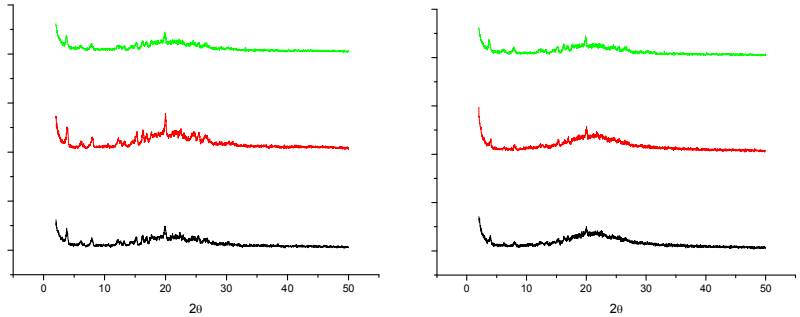


Figura 41 - a) estabilidade acelerada por difração de raios-x na temperatura ambiente e b) estabilidade acelerada por difração de raios-x na temperatura de 40ºC para a DSM 8 nos tempos de 0(vermelho), 3(verde) e 6 meses(preto).

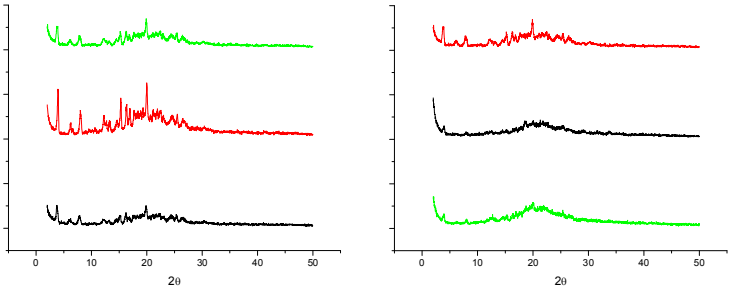


Figura 42 - a) estabilidade acelerada por difração de raios-x na temperatura ambiente e b) estabilidade acelerada por difração de raios-x na temperatura de 40ºC para a DSM 10 nos tempos de 0(vermelho), 3(verde) e 6 meses(preto).

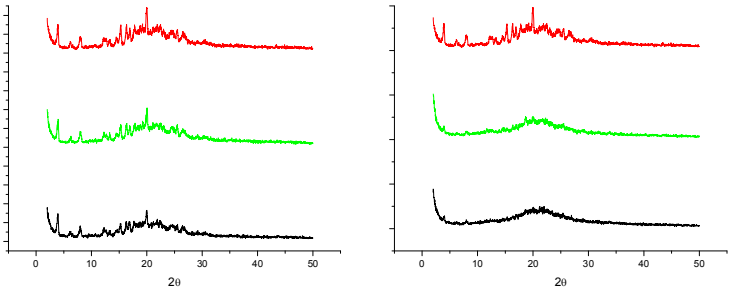


Figura 43 - a) estabilidade acelerada por difração de raios-x na temperatura ambiente e b) estabilidade acelerada por difração de raios-x na temperatura de 40ºC para a DSM 12 nos tempos de 0, 3 e 6 meses.

A Figura 44 mostra os difratogramas das amostras PA, PS, PZQsd e SA, no início, tempo de 3 meses e tempo de 6 meses respectivamente. Podemos observar os picos característicos do PZQ na amostra PZQsd mesmo após a secagem por *spray dryer*, e também na amostra PS, porém menos intensos. Para as amostras SA e PA observamos uma tendência a amorficidade.

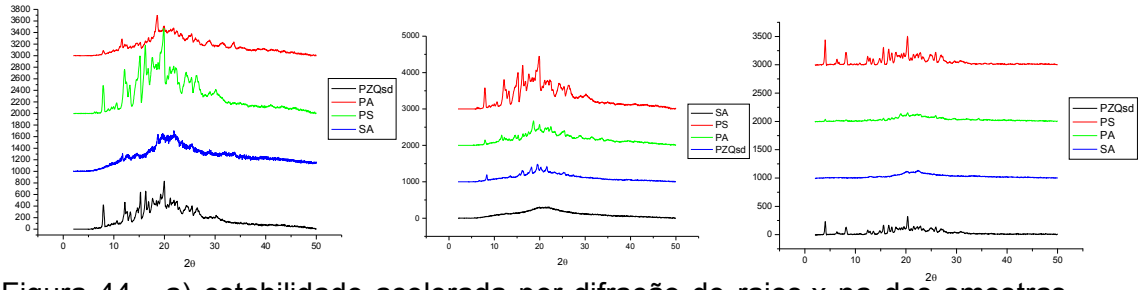


Figura 44 - a) estabilidade acelerada por difração de raios-x na das amostras PZQsd, PA, PS e SA no tempo 0, b) no tempo 3 meses e c) no tempo de 6 meses.

Bley, Fussnegger & Bodmeier, em 2010, encontraram resultados semelhantes em seu estudo sobre a estabilidade de dispersões sólidas de nifedipina com PEG1500/PVP12 obtidas pelo método de fusão. Essas dispersões tiveram uma diminuição da cristalinidade no período de 6 meses de estudo. Em 2011, Liu et. al também observou esse fenômeno em suas dispersões sólidas de Carbamazepina obtidas por *hot melt extrusion* e método da fusão.

5.6.5 Infravermelho

As Figuras 45 a 49 mostram os espectros de infravermelho das DSMs 8, 10 e 12 armazenadas em estufa e na temperatura ambiente no inicio da análise e após o período de 6 meses.

As Figuras 50 a 53 mostram os espectros de infravermelho das amostras PS, PA, SA e PZQsd nos tempos início e depois de6 meses de estudo. Como pode ser observado, não houve interações entre os carreadores utilizados e o praziquantel, verificou-se apenas uma diminuição na intensidade das bandas e sobreposição de algumas delas.

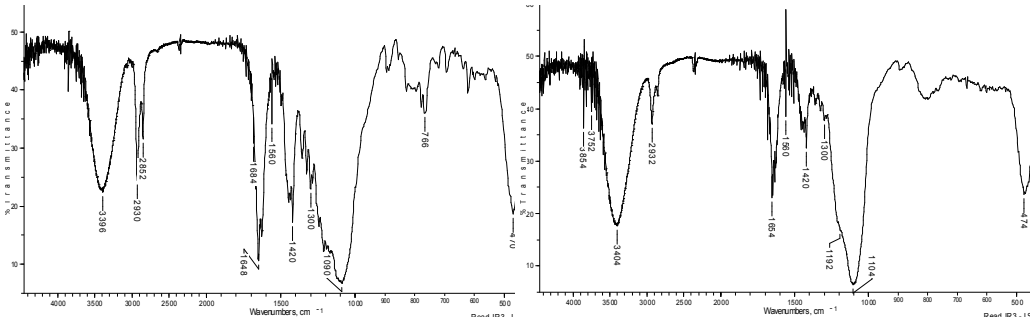


Figura 45 - espectroscopia de infravermelho DSM 8 – a) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 0 e b) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 6 meses.

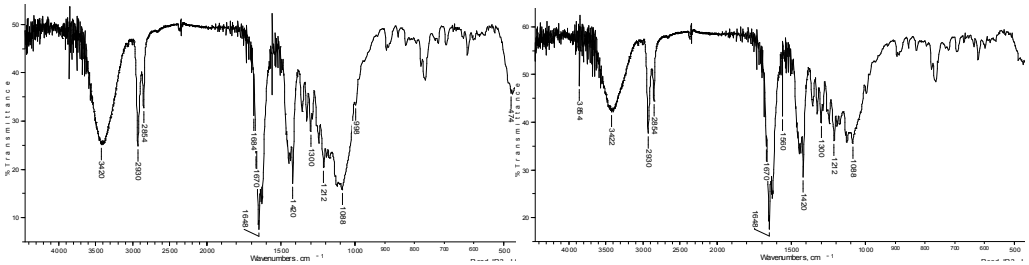


Figura 46 - espectroscopia de infravermelho DSM 10 – a) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura ambiente no tempo 0 e b) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura ambiente no tempo 6 meses

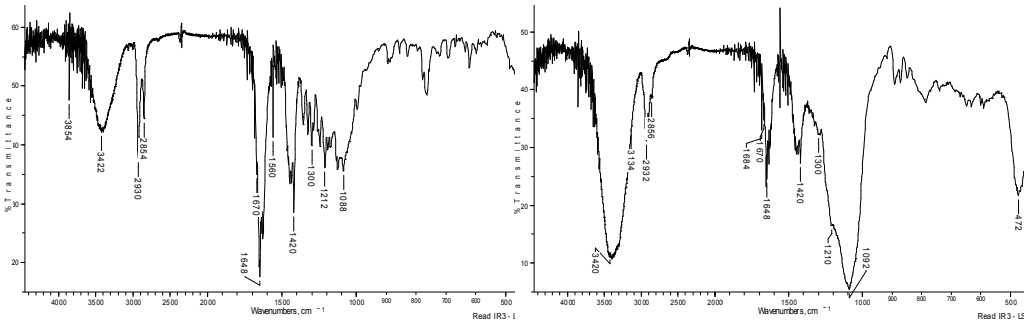


Figura 47 - espectroscopia de infravermelho DSM 10 – a) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 0 e b) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 6 meses.

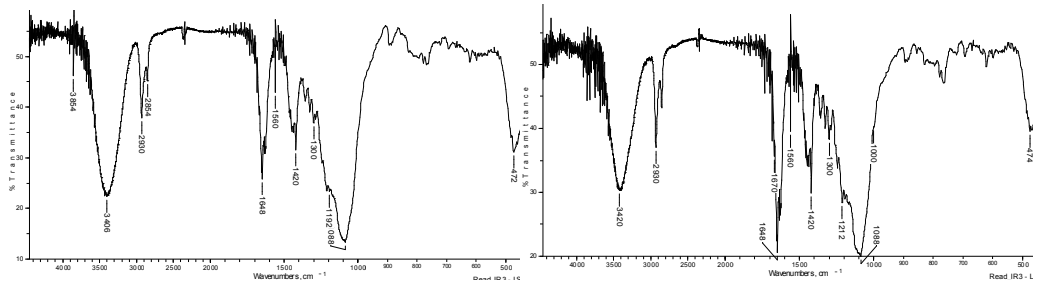


Figura 48 - espectroscopia de infravermelho DSM 12 – a) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura ambiente no tempo 0 e b) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura ambiente no tempo 6 meses.

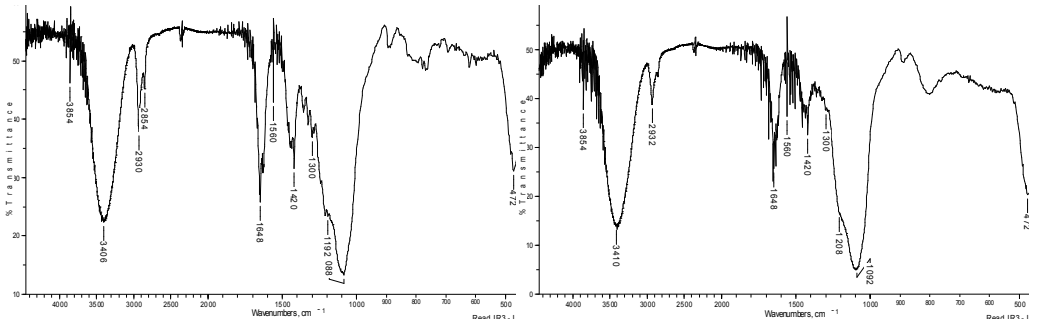


Figura 49 - espectroscopia de infravermelho DSM 12 – a) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 0 e b) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 6 meses.

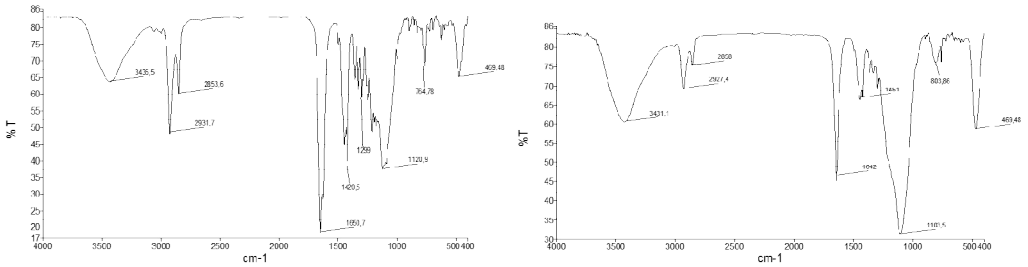


Figura 50- espectroscopia de infravermelho amostra PA – a) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 0 e b) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 6 meses.

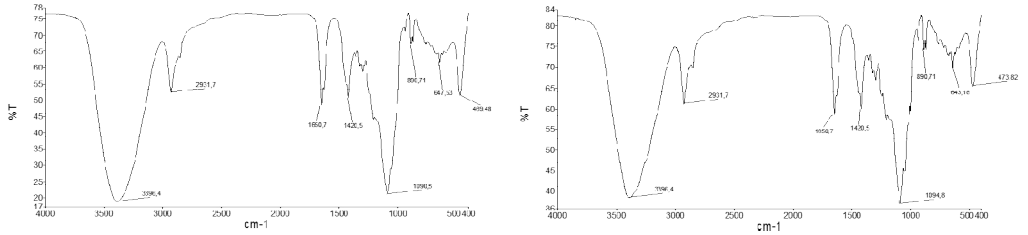


Figura 51 - espectroscopia de infravermelho amostra PS – a) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 0 e b) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 6 meses.

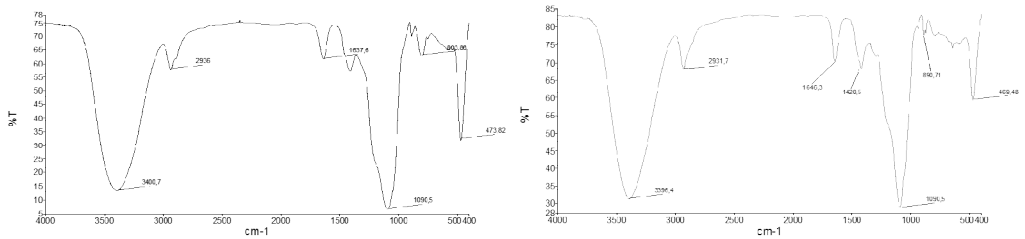


Figura 52 - espectroscopia de infravermelho amostra SA – a) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 0 e b) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 6 meses.

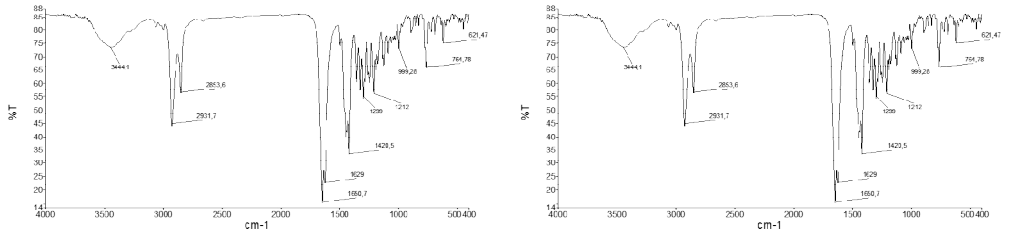


Figura 53 - espectroscopia de infravermelho amostra PZQsd – a) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 0 e b) estabilidade acelerada por espectroscopia de infravermelho na temperatura de 40ºC no tempo 6 meses.

Em um estudo sobre a estabilidade de dispersões sólidas de celcoxib-pvp, Kakumanu e Bansal também observaram uma alteração na temperatura de transição vítrea da dispersão sólida, porém a análise de FTIR também não mostrou nenhuma interação específica entre o celecoxib e o PVP, com isso eles concluíram que esse aumento na Tg foi devido apenas ao efeito anti-plastificante do PVP que promoveu uma diminuição na mobilidade molecular do sistema. Segundo Gaudin e colaboradores (2000), o sorbitol é um agente plastificante, porém dependendo da concentração em que é utilizado pode agir como um anti-plastificante, diminuindo a mobilidade molecular de um sistema.

A Figura 54 mostra o espectro de infravermelho da amostra MF que apresentou um encobrimento nas bandas devido à presença do Aerosil.

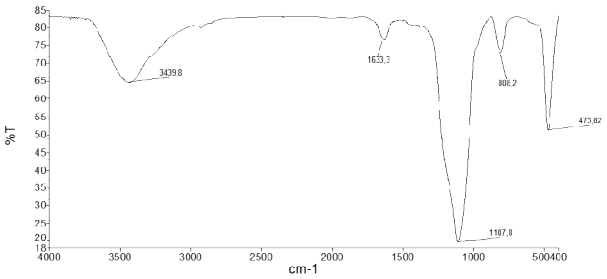


Figura 54-- espectroscopia de infravermelho amostra MF

5.6.6 Ensaios de Dissolução

Na Tabela 13 e Figura 55 podemos observar o perfil de dissolução das amostras DSM 12, PS, PA, MF e PZQ puro. Podemos observar que o PZQ puro liberou ao final do teste 14% de fármaco, a Mistura Física MF 17,53%, a amostra PA 61,52%, a amostra PS 68,52% e a DSM 12, 91,32%. Com esses valores pode-se calcular que a DSM 12 aumentou em 6,52 vezes a liberação do PZQ no tempo de estudo e 5,20 vezes em relação a sua mistura física, a amostra PA aumentou em 4,39 vezes em relação ao PZQ e a amostra PS 4,89 vezes em relação ao PZQ.

Essa diferença no perfil de dissolução da dispersão sólida 12 e sua mistura física se devem ao fato do tamanho reduzido de partícula obtido com a técnica de *spray dryer* em relação aos tamanhos de partícula das MF. Quando comparada apenas ao PZQ, além do fato do menor tamanho de partícula, temos o fato de que o fármaco se encontra disperso em um carreador hidrossolúvel, ocasionando uma solubilização do carreador e aumentando a taxa de molhabilidade do fármaco, como discutido por Martins (2010), que também encontrou um excelente resultado para o perfil de dissolução do seu estudo de dispersões sólidas de carbamazepina por *spray congealing*. Em 2013, Chaud e colaboradores aumentaram a taxa de dissolução de suas dispersões sólidas de PZQ em glicolato de sódio, para 88% no mesmo tempo de teste estudado neste trabalho. Zaparoli (2011) observou um aumento na taxa de dissolução de sua dispersão sólida de PZQ com Kollicoat IR, pela técnica de co-precipitação, de 70% em 60 min de teste. Lima (2009) notou, ao fim de 60 minutos de teste, um aumento de aproximadamente 90% na taxa de dissolução de sua dispersão sólida de PZQ com PVP K-30 1:1, 60% na

dispersão sólida de PZQ/PVP-K30 1:2, obtidas pela técnica de fluido supercrítico.

Esses resultados mostram que a técnica de obtenção de dispersões sólidas microparticuladas por *spray dryer* foi capaz de aumentar significativamente a taxa de dissolução do praziquantel, aerosil e sorbitol como carreadores, mostrando-se uma excelente técnica para estudos de melhoria de solubilidade e dissolução de fármacos de classe II.

Tabela 13 - Ensaio de Dissolução das amostras 12, PS, PA, MF e PZQ

Tempo	12	PS	PA	MF	PZQ
0	0	0	0	0	0
5	62,87±1,33	40,18±1,33	32,08±1,69	4,26±2,75	3,9±3,06
10	73,11±2,15	53,11±2,15	47,9±2,47	7,03±3,19	7,84±2,51
15	78,35±2,64	54,93±2,56	50,02±2,05	9,53±3,09	9,43±3,02
30	85,35±3,52	59,03±2,35	53,34±1,20	13,78±2,46	11,78+1,95
45	89,00±2,58	65,78±3,58	57,35±2,12	15,78±1,89	13,53±2,83
60	91,32±2,61	68,69±2,61	61,52±2,02	17,53±3,20	14,03±3,36

*porcentagens encontradas+-desvio padrão. Todas as amostras apresentaram CV%<5%. CV% = coeficiente de variância.

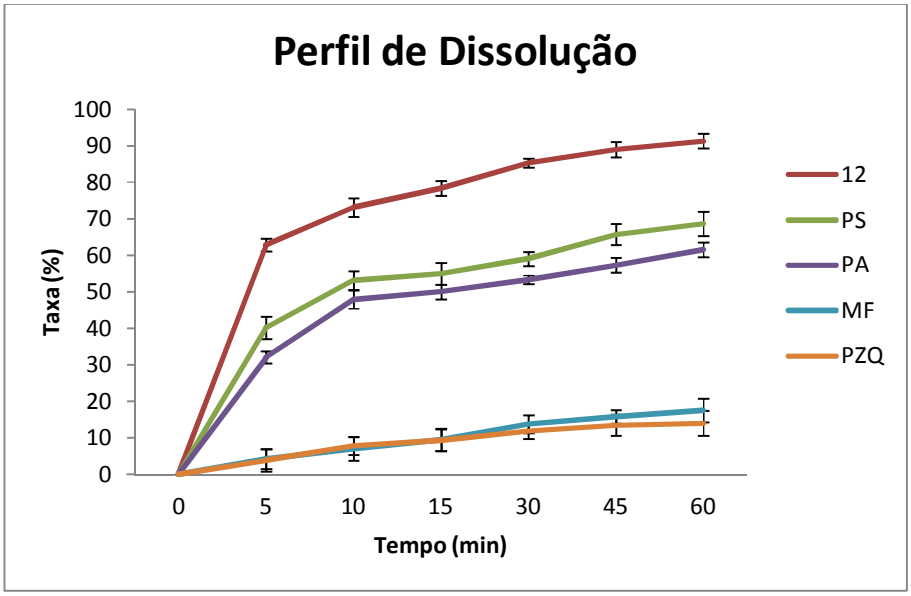


Figura 55 - Perfil de dissolução das amostras: DSM 12, PS, PA, MF e PZQ com desvio padrão ≤5%.

5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram obtidas fotomicrografias do PZQ e das dispersões sólidas 8, 10 e 12, nos aumentos de 100, 1500, 6000 e 10000x, conforme ilustra as Figuras 56 a 62.

Podemos verificar que o praziquantel encontra-se em sua forma de cristal acicular (em forma de agulha) bem definido, como já encontrado por Passerini e colaboradores, em 2006.

As fotomicrografias das micropartículas contendo dispersão sólida de PZQ, tanto para as realizadas no tempo 0, quanto para as realizadas no tempo de 6 meses armazenadas em estufa, apresentaram forma esférica de superfície porosa. Resultados semelhantes também foram reportados por Passerini e colaboradores (2006). Esse fato também pode ser explicado pela formação de um sistema matricial, em que o fármaco, está "espalhado" por toda a micropartícula, e não somente no seu interior, como é o caso das microcápsulas.

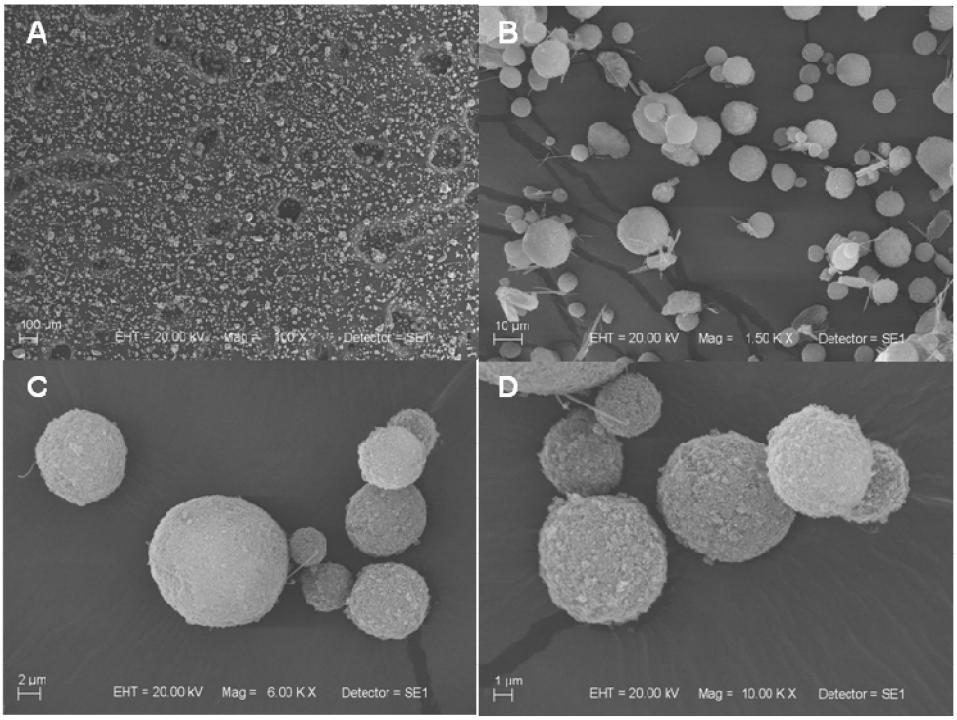


Figura 56 - Microscopia Eletrônica de Varredura da DSM 8 no início. A) aumento de 100x, b) aumento de 1,500x c) aumento de 6000x d) aumento de 10000x.

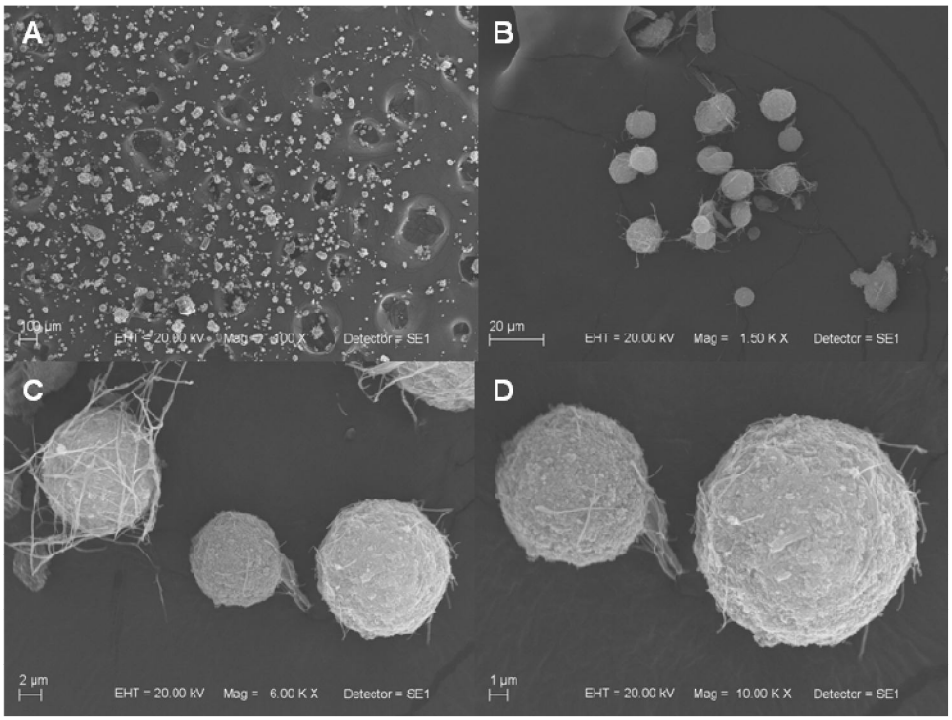


Figura 57 - Microscopia Eletrônica de Varredura da DSM 8 após 6 meses de teste em estufa a 40C. a) aumento de 100x, b) aumento de 1,500x c) aumento de 6000x d) aumento de 10000x.

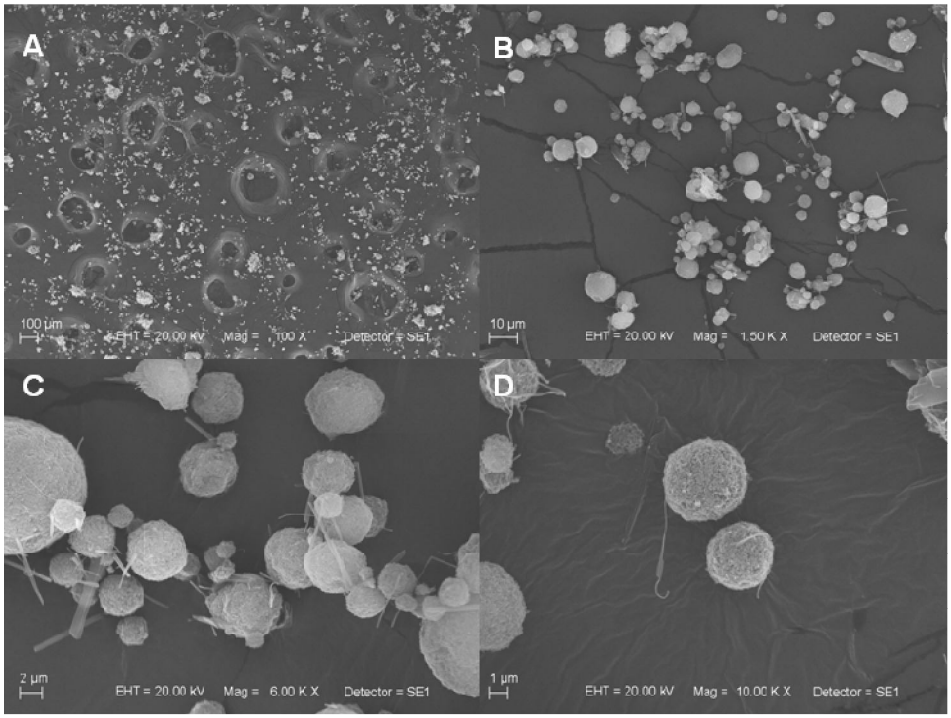


Figura 58 - Microscopia Eletrônica de Varredura da DSM 10 no início dos testes. a) aumento de 100x, b) aumento de 1,500x c) aumento de 6000x d) aumento de 10000x.

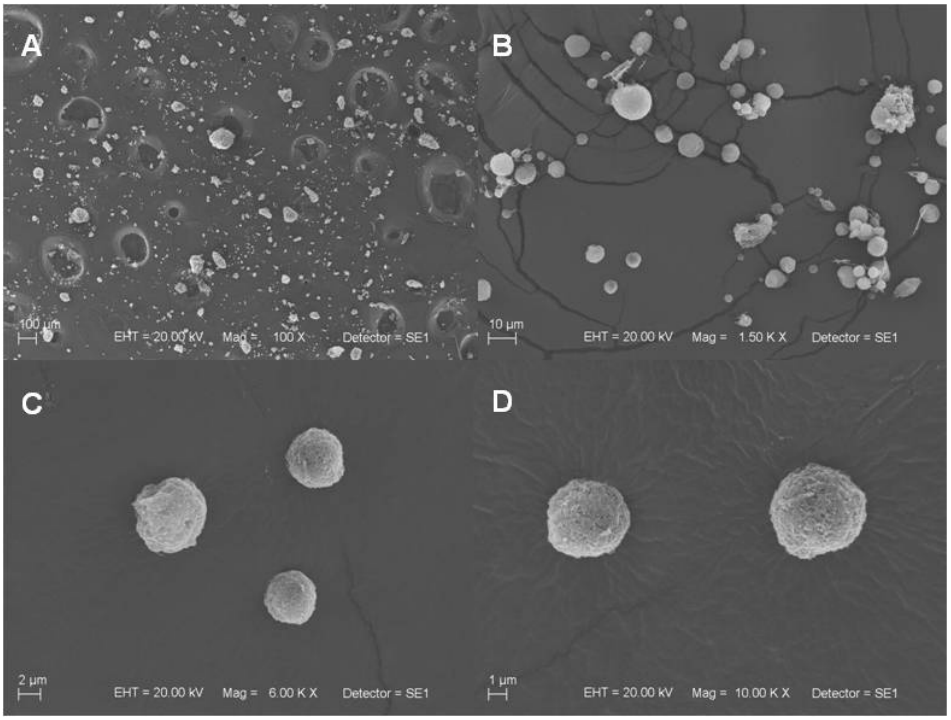


Figura 59 - Microscopia Eletrônica de Varredura da DSM 10 após 6 meses de teste em estufa a 40C. a) aumento de 100x, b) aumento de 1,500x c) aumento de 6000x d) aumento de 10000x.

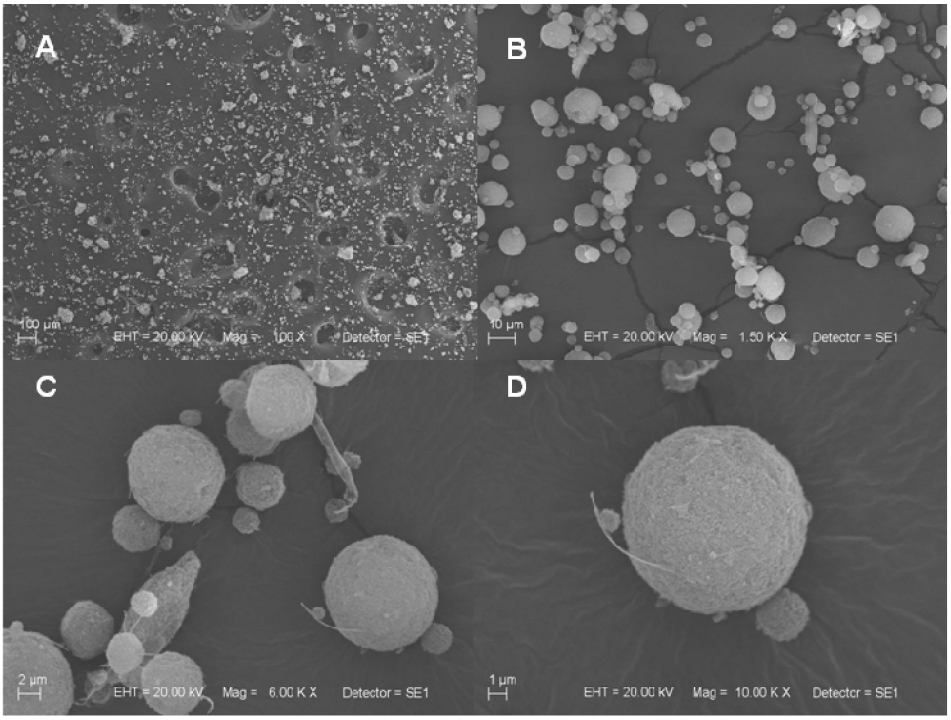


Figura 60 - Microscopia Eletrônica de Varredura da DSM 12 no início dos testes. a) aumento de 100x, b) aumento de 1,500x c) aumento de 6000x d) aumento de 10000x.

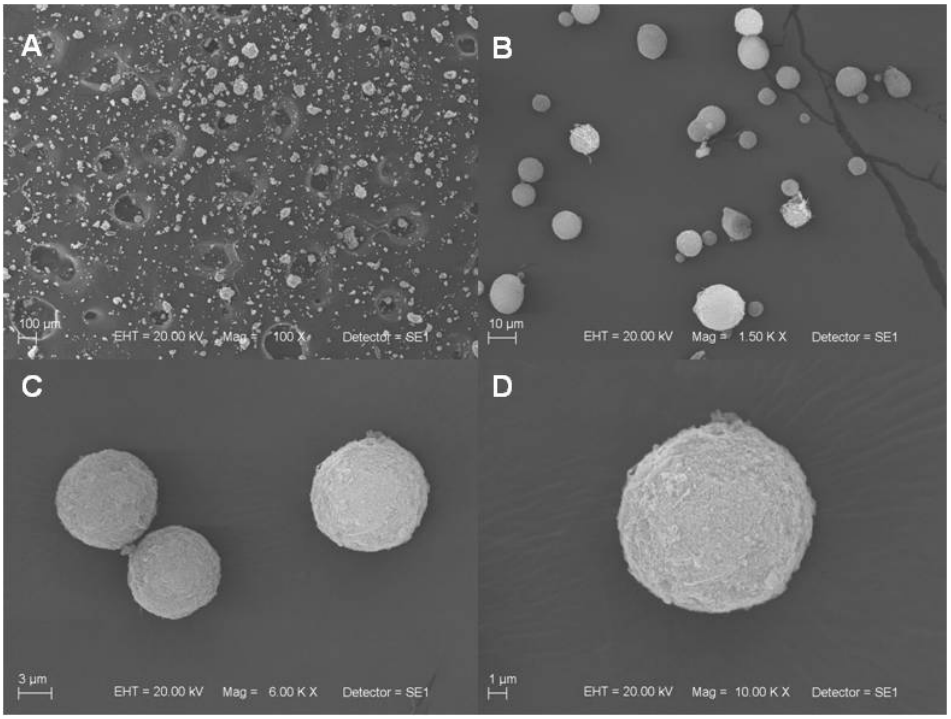


Figura 61 - Microscopia Eletrônica de Varredura da DSM 12 após 6 meses de teste em estufa a 40C. a) aumento de 100x, b) aumento de 1,500x c) aumento de 6000x d) aumento de 10000x.

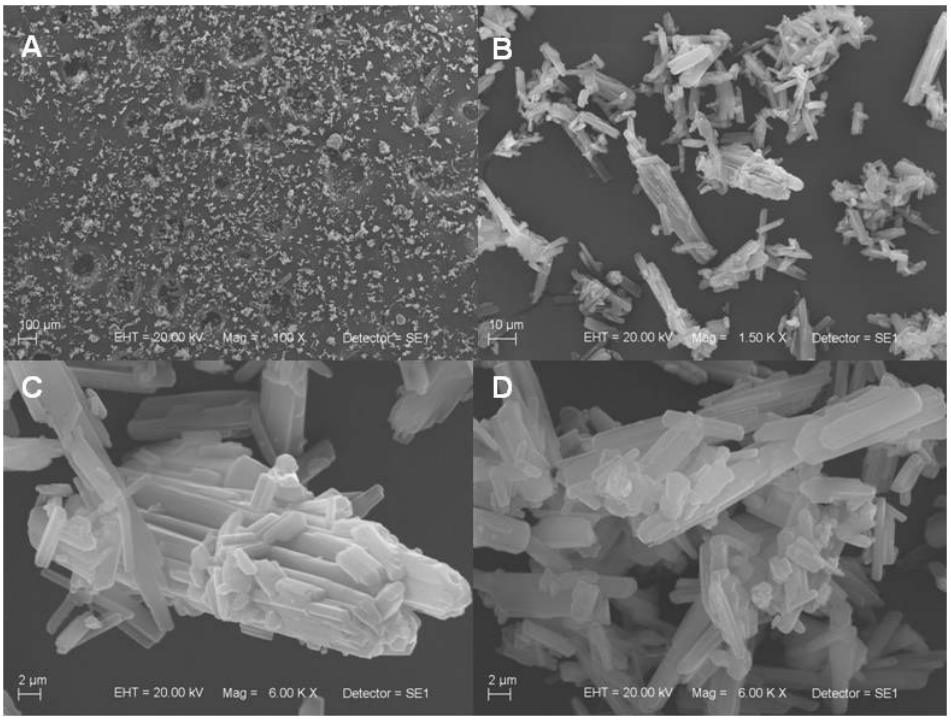


Figura 62 - Microscopia Eletrônica de Varredura do praziquantel. a) aumento de 100x, b) aumento de 1,500x c) aumento de 6000x d) aumento de 10000x.

5.8 Tamanho de Partícula

A Tabela 14 mostra os valores de Hd10, Hd50 e Hd90. O tamanho médio das misturas físicas variou de 1,39 a 4,05µm, o SPAN variou de 2,04 a 3,88. Para as DSMs, esse valor variou de 1,02a 2,75µm, o SPAN variou de 2,04 a 4,66. O PZQ seco em *spray dryer* das amostras 13 e 14 apresentaram valores médios de 2,14 e 2,05 respectivamente com SPAN 2,52 e 2,67. Em seu estudo de 2015 sobre secagem de Manitol por *spray* dryer, Guimarães e colaboradores encontraram tamanhos de partículas que variaram de 1,98 a 6,51µm e SPAN que variou de 1,25 a 3,00.

Nas Figuras 63 a 69 estão ilustrados os gráficos da distribuição de tamanho de cada micropartícula.

Tabela 14 - Distribuição do tamanho de partícula das MF, DSM e PZQ seco em *spray dryer*

Amostras	Hd10	Hd50	Hd90	SPAN
MF1	0,86	2,47	7,09	3,11
MF2	1,66	4,05	9,92	2,04
MF3	0,34	1,39	5,72	3,88
MF4	0,82	2,31	6,50	2,45
DSM5	0,85	2,34	6,45	2,40
DSM6	0,40	1,34	4,50	3,06
DSM7	0,46	1,66	5,94	3,30
DSM8	0,55	1,83	6,11	3,04
DSM9	0,58	1,84	5,87	2,88
DSM10	1,11	2,75	6,78	2,06
DSM11	0,21	1,02	4,98	4,66
DSM12	0,22	1,07	5,26	4,71
13	0,74	2,14	6,14	2,52
14	0,68	2,05	6,15	2,67

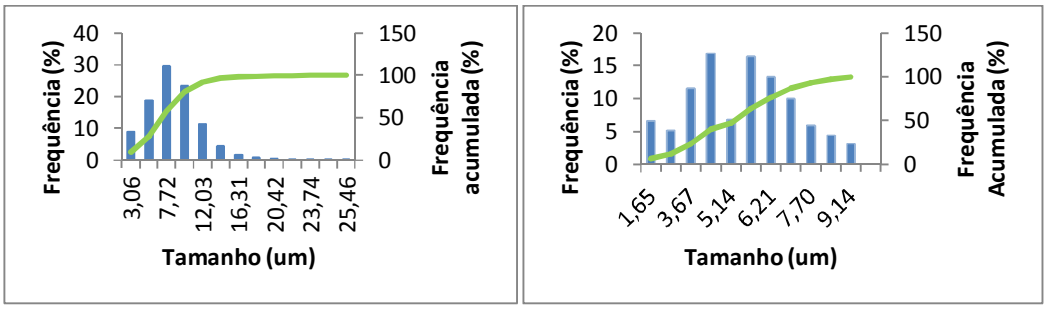


Figura 63 - Gráficos da distribuição de tamanho de partículas das amostras MF 1 e 2

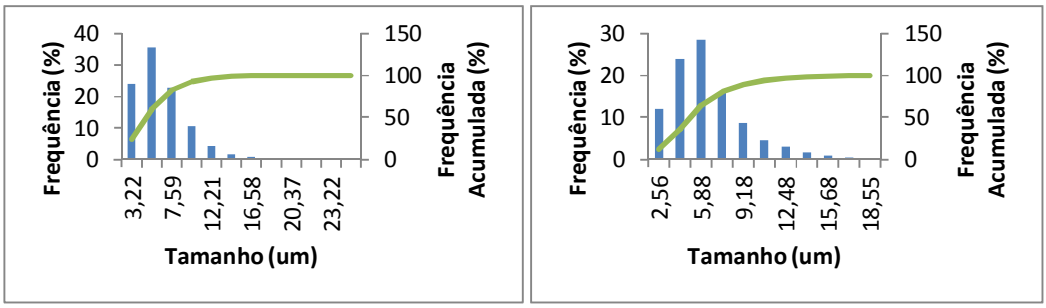


Figura 64 - Gráficos da distribuição de tamanho de partículas das amostras MF 3 e 4

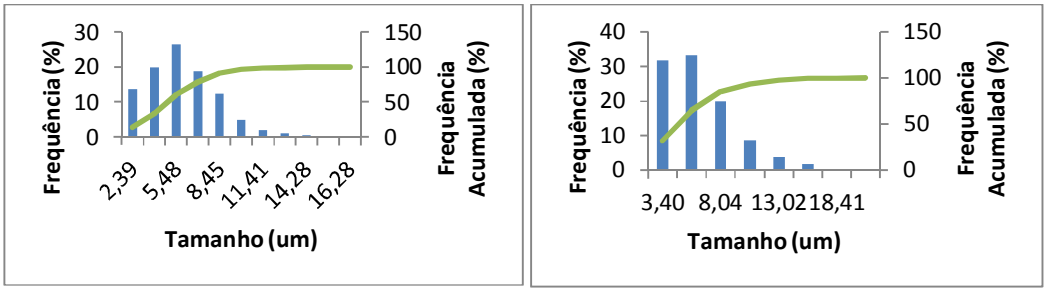


Figura 65 - Gráficos da distribuição de tamanho de partículas das amostras DSM 5 e 6

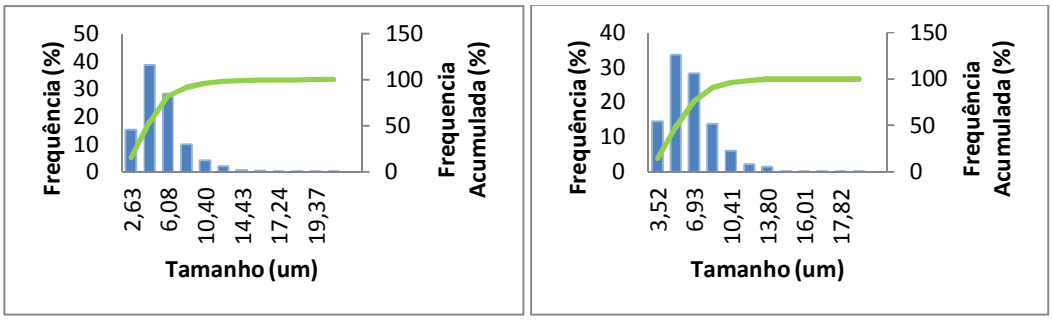


Figura 66 - Gráficos da distribuição de tamanho de partículas das amostras DSM 7 e 8

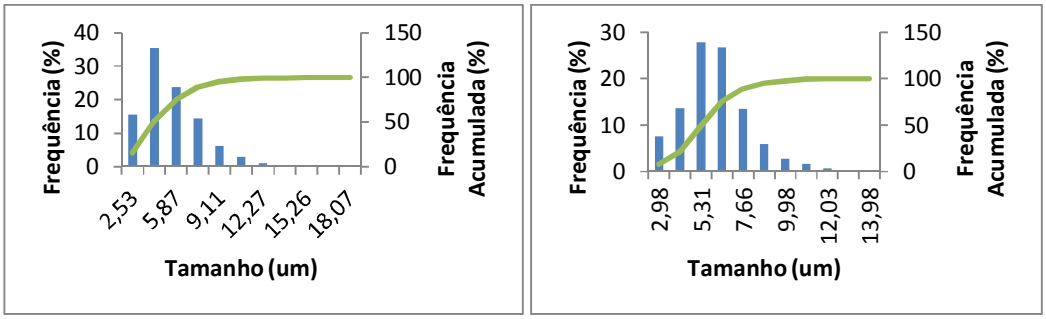


Figura 67 - Gráficos da distribuição de tamanho de partículas das amostras DSM 9 e 10

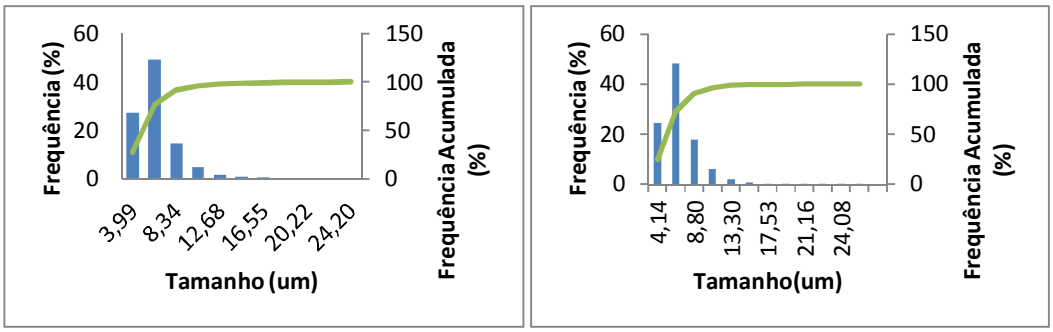


Figura 68 - Gráficos da distribuição de tamanho de partículas das amostras DSM 11 e 12

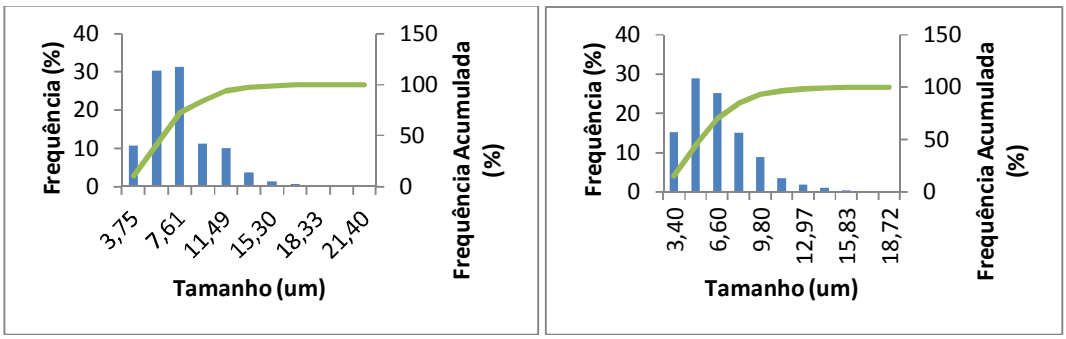


Figura 69 - Gráficos da distribuição de tamanho de partículas das amostras 13 e 14

5.9 Propriedades de Fluxo

A Tabela 15 apresenta os valores de fator de Hausner, índice de Carr e ângulo de repouso. O fator de Hausner variou de 1,16 a 1,23; o índice de Carr variou de 13,23 a 19,72 e o ângulo de repouso de 32,15 a 37,8º. Segundo Araujo (2010), esses valores estão numa faixa de bom a moderado, e estão de acordo com outros resultados encontrados na literatura. Esse fluxo de bom a moderado pode ser explicado pelo fato de o sorbitol possuir alta higroscopicidade, e segundo Moreira (2009) quanto menor a higroscopicidade dos pós obtidos, melhor é o fluxo.

Tabela 15 - Propriedades de Fluxo das DSM e PZQ seco em *spray dryer*

Amostra	FH	IC	AR
DSM5	1,22	18,43	37,80
DSM6	1,16	13,23	32,15
DSM7	1,21	17,35	36,68
DSM8	1,22	18,43	35,42
DSM9	1,16	13,23	32,78
DSM10	1,19	17,35	37,75
DSM11	1,16	13,23	32,54
DSM12	1,21	17,35	37,31
13	1,22	18,43	37,54
14	1,23	19,72	37,47

5.10 Ensaios *in vitro* de eficácia

5.10.1 Efeito *in vitro* do PZQ-12 e PZQ-C sobre vermes adultos de *S. mansoni*, linhagem BH.

Para avaliar a eficácia do tratamento com a DSM 12, realizou-se testes *in vitro* nas concentrações de 5 a 100µg/mL e o PZQ controle também foi utilizado, nas mesmas concentrações para meios de comparação (Tabela 16). A partir de 5µ/mL já é possível observar a morte de 100% dos vermes em 24h de estudo, tanto para a DSM 12 quanto para o PZQ. Os vermes que foram expostos a DSM 12 morreram com um menor período de incubação ao longo do teste. Além da mortalidade dos vermes, observou-se a motilidade, oviposição e separação dos casais. Os vermes expostos a DSM 12 e PZQ, em todas concentrações avaliadas - 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL - apresentaram redução significativa dos vermes após os primeiros 30 min de incubação quando comparados com o grupo controle, mantido em meio RPMI0-1640. O grupo controle negativo permaneceu durante todo o estudo com resultados insignificantes de mortilidade dos vermes, separação de casais e não apresentou alterações tegumentares. Em relação a oviposição observou-se ausência de ovos em todas as concentrações avaliadas até o final do experimento, ou seja, 24 horas. Quanto à separação de casais, observou-se que PZQ ocasionou uma taxa de 20% de separação após 1h de exposição. Em

relação as alterações morfológicas dos parasitas, observou-se que a partir dos primeiros 30 min de incubação, vermes, machos e fêmeas, apresentavam contração da musculatura e ausência parcial dos movimentos internos dos órgãos. Além disso, todos os vermes apresentaram uma intensa alteração no tegumento, sobretudo, os vermes machos (Figuras 71 e 72). A Figura 70 mostra a solubilidade das amostras no preparo do teste. Considerando que 25µg da amostra 12 (1(1PZQ:2Aerosil):1) possui uma concentração de PZQ de 4,16µg de PZQ, então concluímos que os resultados obtidos com as dispersões sólidas são muito superiores em relação ao PZQ controle deste estudo, uma vez que devemos então comparar o resultado de 25µg de DSM 12 com o de 5µg de PZQ, ou seja, tivemos melhores resultados para as dispersões sólidas mesmo com 1/6 da dose.

Neste estudo, com 10µg/mL de dispersão sólida já foi possível observar a morte de 100% dos vermes no período de 6 horas. Em estudos semelhantes realizados por Souza e colaboradores (2014), e Kolenyak-Santos e colaboradores (2014), ambos estudando nano partículas lipídicas sólidas de PZQ, observou-se 100% de morte dos vermes em 6horas para 25µg/mL. No estudo de Souza esse resultado foi encontrado tanto para as nano partículas lipídicas sem nenhum ativo quanto para as que tinham o PZQ incorporado. Na tentativa de usar outros ativos para o combate à esquistossomose, Oliveira e colaboradores (2012 e 2014) estudando a eficácia do óleo essencial de Baccharis trimera, e Moraes e colaboradores (2011) estudando a eficácia da piplartina, encontraram como valores de mortalidade de 30-48horas numa concentração de 130-91µg/mL e 2 a 72horas numa concentração de 472,7-9,5µg/mL, respectivamente. Porém, nesses estudos, o PZQ que foi usado como comparativo de eficácia, apresentou mortalidade dos vermes de 4 e 2horas respectivamente para a concentração de 10µg/mL. Com isso, pode-se concluir que a dispersão sólida de praziquantel obtida neste estudo foi muito eficaz também para a mortalidade dos vermes.

Tabela 16 - Efeito in vitro do PZQ -12 e PZQ- C sobre vermes adultos de *S. mansoni*, linhagem BH.

Amostras	Período de incubação (h)	Mortalidade dos vermes ♀♂ (%)	Separação dos casais de vermes	Alterações tegumentares (24 h) **Parcial**	**Intensa**
µg/mL					
DSM 12					
5 µg/mL	30’	0	0		I
	1h	40	0		I
	2h	40	0		I
	4h	60	0		I
	6h	80	0		I
	24h	100	0		
10 µg/mL	30’	0	0		I
	1h	40	0		I
	2h	60	0		I
	4h	60	0		I
	6h	100	0		I
	24h	100	0		
25 µg/mL	30’	0	0		I
	1h	40	0		I
	2h	40	0		I
	4h	80	0		I
	6h	100	0		I
	24h	100	0		
50 µg/mL	30’	0	0		I
	1h	80	0		I
	2h	100	0		I
	4h	100	0		I
	6h	100	0		I
	24h	100	0		I
100 µg/mL	30’	100	0		
	1h	100	0		I
	2h	100	0		I
	4h	100	0		I
	6h	100	0		I
	24h	100	0		
PZQ					

5 µg/mL	30’	0	0		I
	1h	0	0		I
	2h	20	20		I
	4h	40	20		I
	6h	60	20		I
	24h	100	20		
10 µg/mL	30’	0	0		I
	1h	40	0		I
	2h	40	0		I
	4h	40	0		I
	6h	80	0		I
	24h	100	0		
25µg/mL	30’	0	0		I
	1h	20	0		I
	2h	60	0		I
	4h	60	0		I
	6h	80	0		I
	24h	100	0		
50µg/mL	30’	0	0		I
	1h	60	0		I
	2h	60	0		I
	4h	60	0		I
	6h	80	0		I
	24h	100	0		
100 µg/mL	30’	0	0		
	1h	60	0		
	2h	60	0	-	-
	4h	80	0	-	-
	6h	100	0	-	-
	24h	100	0	-	-
Controle-RPMI					
	30’	0	0	-	-
	1h	0	0	-	-

PBS	2h	0	0	-	-
	4h	0	0	-	-
	6h	0	0	-	-
	24h	0	0		

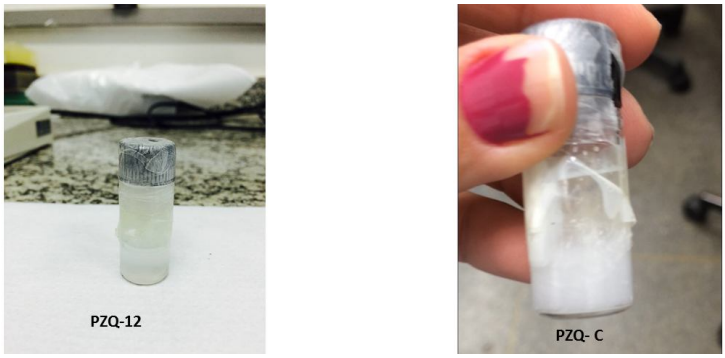


Figura 70 - Solubilidade das amostras DSM 12 e PZQ em PBS no preparo dos testes.

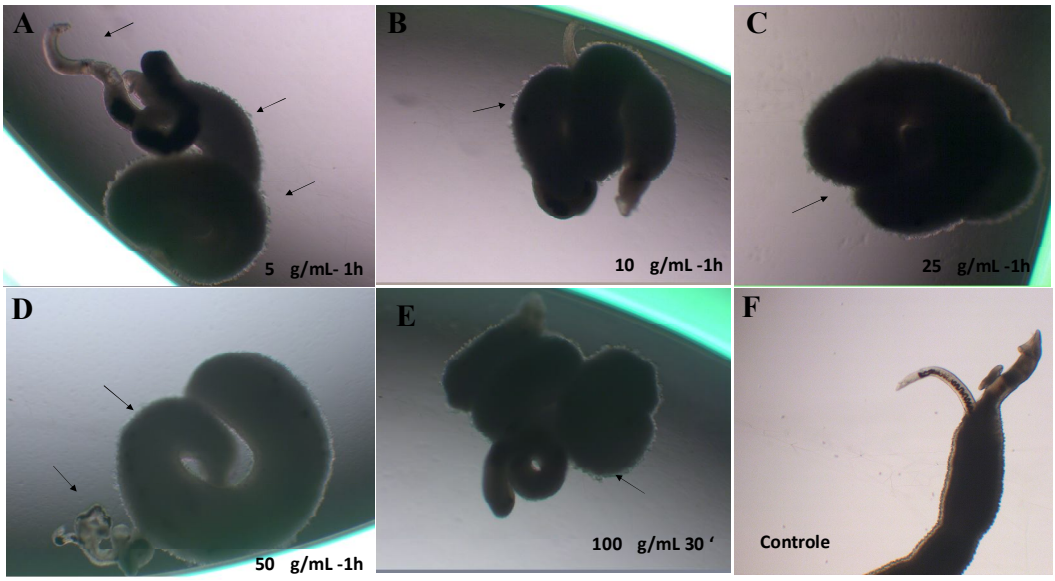


Figura 71 - Microscopia ótica dos vermes, machos e fêmeas, de *S. mansoni* após 30' e 1 hora de incubação na DSM 12 nas concentrações avaliadas de 5 a 100 µg/mL.Vermes machos e fêmeas apresentando contração da musculatura e descamação no tegumento bem como alterações nas ventosas oral e acetabular. Fig. F – Casal de vermes do grupo controle sem alterações morfológicas e tegumentares. Fotos observadas no aumento de 10x.

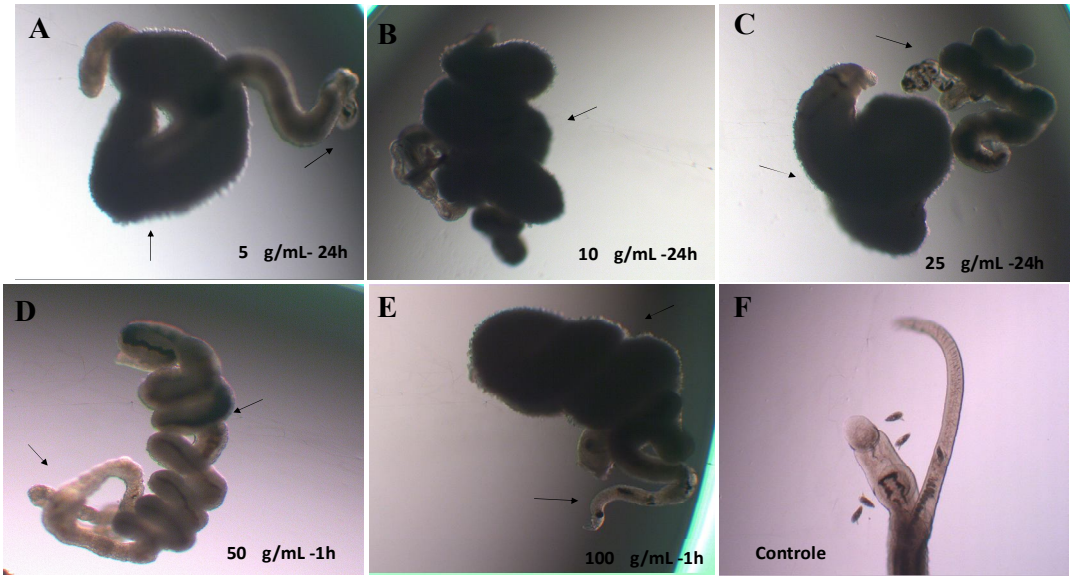


Figura 72 - Microscopia ótica dos vermes, machos e fêmeas, de *S. mansoni* após 30' e 1 hora de incubação em PZQ nas concentrações avaliadas de 5 a 100 µg/mL.Vermes machos e fêmeas apresentando contração da musculatura e descamação no tegumento bem como alterações nas ventosas oral e acetabular. Fig. F – Casal de vermes do grupo controle sem alterações morfológicas e tegumentares. Fotos observadas no aumento de 10x.

5.11 Ensaios *in vivo* de eficácia

5.11.1 Efeito dos tratamentos sobre a redução da carga parasitária dos animais

Após os tratamentos, observou-se diferenças na recuperação de casais, machos e fêmeas de *S. mansoni* (Figura 73). Em relação a redução total do número de vermes recuperados, os tratamentos realizados com DSM12 apresentaram 75.3% de redução, enquanto os tratamentos com PZQ apresentaram 68.9%, quando comparados com o grupo controle, infectado e não tratado (Figura 74). Porém devemos ressaltar que também nesse estudo a DSM 12 possui 1/6 da dose da amostra PZQ.

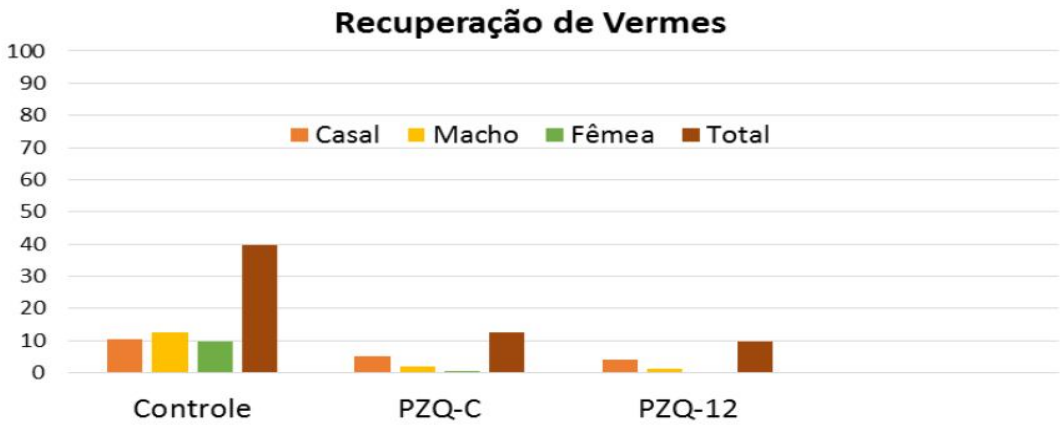


Figura 73 - Recuperação de casais, machos e fêmeas de *S. mansoni*, após tratamentos realizados 45 dias pós infecção em dose única de 200 mg/kg de PZQ.

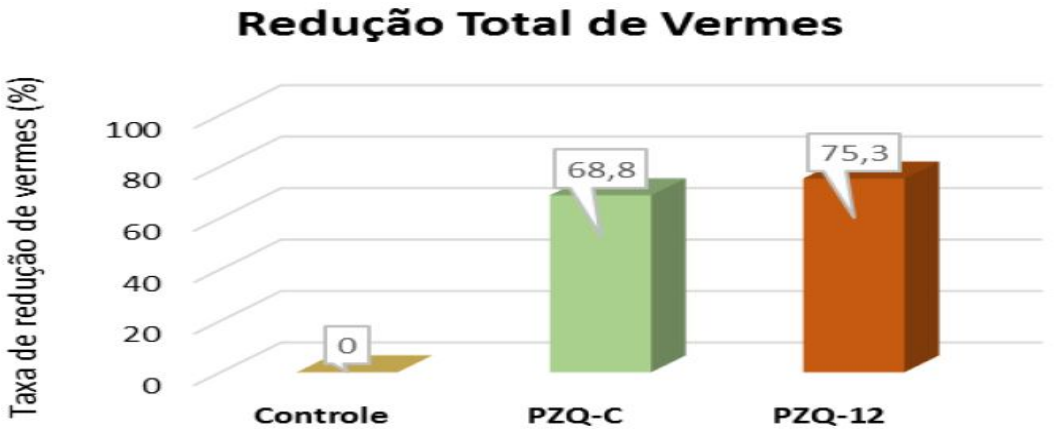


Figura 74 - Redução total do número de vermes recuperados após tratamentos realizados em dose única (200 mg/kg) de PZQ após 45 dias de infecção.

5.11.2 Efeito dos tratamentos sobre a oviposição de *S. mansoni*

Neste parâmetro, observou-se maiores porcentagens de ovos maduros para os tratamentos realizados com DSM 12, quando comparados com o controle, infectado e não tratado. Em relação a porcentagem de ovos mortos, observou-se pequena diferença entre os tratamentos com DSM 12 e PZQ (Figura 75).

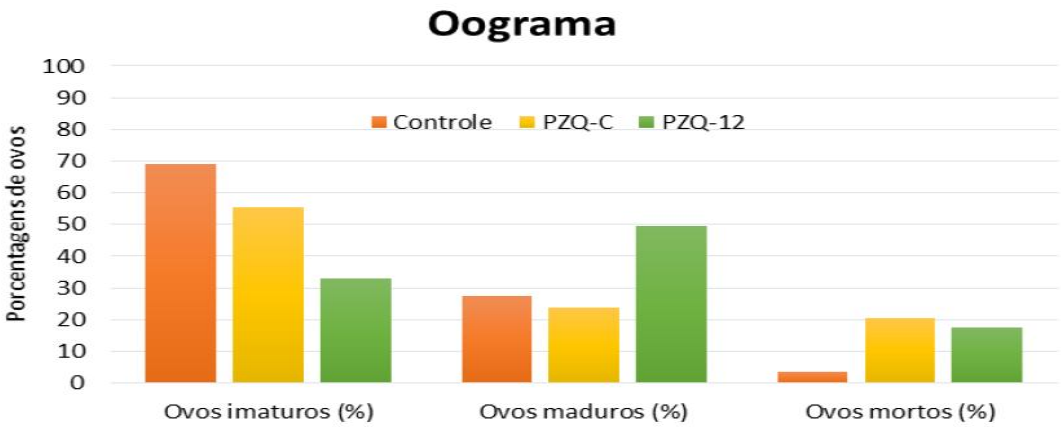


Figura 75 - Oograma- Porcentagem do número de ovos encontrados nas análises dos animais tratados 45 dias pós infecção, referente aos tratamentos em dose única (200 mg/kg) de PZQ. Ovos Imaturos (1º ao 4º estágio de desenvolvimento); Ovos Maduros (5º estágio de desenvolvimento); Ovos Maduros (5º estágio de desenvolvimento) e Ovos Mortos.

Esses resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* de eficácia confirmam os resultados obtidos no teste *in vitro* de dissolução, uma vez que na dissolução a DSM12 conseguiu um aumento na taxa em torno de 6x, nesses resultados observamos excelente eficácia da dispersão sólida que apresenta 1/6 da dose de PZQ.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os testes realizados mostraram que a técnica de preparo de dispersões sólidas por *spray dryer* pode ser considerada como uma ótima técnica para o aumento da solubilidade de fármacos de classe II como é o caso do praziquantel. O teste de estabilidade acelerada mostrou que com o passar do tempo a solubilidade das amostras foi aumentada até atingir um valor assintótico, o que é indesejável mas abre o desafio de acelerar a estabilização do valor máximo de solubilidade. Foi observada, nas análises de DSC e XRPD, uma diminuição da cristalinidade do fármaco, o que vem a corroborar os resultados de aumento de solubilidade uma vez que quanto menor a cristalinidade de uma substância, maior sua solubilidade. Este aumento pode ser explicado pela diminuição da cristalinidade. Esse fato, aparentemente foi ocasionado pela temperatura de secagem da mistura no *spray dryer*, porém, estudos com uma profundidade maior em análises devem ser feitos no futuro para demonstrar de forma mais clara o porquê dessa alteração, que não foi encontrada em nenhum outro trabalho científico sobre este tema. Para o ensaio de dissolução, as dispersões sólidas aumentaram a taxa de dissolução do fármaco para 91%, mostrando mais uma vez que essa técnica para a produção de dispersões sólidas atingiu seu objetivo. As análises de MEV mostraram que as dispersões ficaram esféricas com superfície rugosa. Nos estudos de eficácia *in vitro* e *in vivo* a DSM 12 apresentou ótimos resultados e mostrou-se cerca de 6x mais eficaz do que o PZQ puro, quando se leva em conta o teor de fármaco. Somando-se, então, todos os resultados das análises realizadas neste trabalho, podemos concluir que a produção dispersões sólidas de PZQ, com os carreadores estudados, pela técnica de secagem por nebulização foi eficaz no aumento da solubilidade e dissolução deste fármaco de classe II, e que é de fato importante estudar a estabilidade destes sistemas.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSAQABI, S.M.; LOTFY, W.M. Praziquantel: A Review. **Veterinary Science & Technology**, v. 5, n. 5, p. 1, 2014.

ANDRADE, T.C.; **Estudo da granulação por solidificação de materiais fundidos em leito fluidizado utilizando dispersão sólida de indometacina.** 2009. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

ANGELUCCI, F. et al. Mapping the catalytic cycle of Schistosoma mansoni thioredoxin glutathione reductase by X-ray crystallography. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 42, p. 32557-32567, 2010.

ARAUJO, R.R.; TEIXEIRA, C.C.C.; FREITAS, L.A.P. The preparation of ternary solid dispersions of an herbal drµg via *spray drying* of liquid feed. **Drying Technology**, v. 28, n. 3, p. 412-421, 2010.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Segunda Edição. Porto Alegre: Atmed, 2005. 677p.

BAIRD, J.A.; TAYLOR, L.S. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. **Advanced drµg delivery reviews**, v. 64, n. 5, p.396-421, 2012.

BLEY, H.; FUSSNEGGER, B.; BODMEIER, R. Characterization and stability of solid dispersions based on PEG/polymer blends. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 2, p. 165-173, 2010.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** RE n° 899, de 29 de maio de 2003, Brasília, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Vigilância da Esquistossomose Mansoni - Diretrizes Técnicas**. Quarta Edição, 2014.

BROADHEAD, J.; EDMOND R.S.K.; RHODES, C.T. The *spray drying* of pharmaceuticals. **Drµg Development and Industrial Pharmacy**, v. 18, n. 11-12, p. 1169-1206, 1992.

BROMAN, E.; KHOO, C.; TAYLOR, L. S. A comparison of alternative polymer excipients and processing methods for making solid dispersions of a poorly water soluble drµg. **International Journal of Pharmaceutics,** vol. 222, n. 1, p. 139-151, 2001.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 2, p. 575-586, 2010.

CAMPOS, D.R. et al. Eficácia de associações anti-helmínticas no controle de infecções naturais por Ancylostoma spp. em cães, Ancylostoma spp. e Toxocara cati em gatos. **Revista Brasileira de Nedicina Veterinária**. v. 32, Supl. 2, p. 85-89, 2013.

CHAN, J.D.; ZAROWIECKI, M.; MARCHANT, J.S. Ca^{2+} channels and praziquantel: a view from the free world. **Parasitology international**, v. 62, n. 6, p. 619-628, 2013.

CHAUD, M.V. et al. Solid dispersions with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 473-481, 2010.

CHAUD, M.V. et al. Development and evaluation of praziquantel solid dispersions in sodium starch glycolate. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 163-168, 2013.

CHIOU, W.L.; RIEGELMAN, S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 60, n. 9, p. 1281-1302, 1971.

CHO, C.S. et al. Stability-enhanced solid dispersion formulation of amorphous raloxifene hydrochloride. **Korean Journal of Chemical Engineering.** v. 27, n. 6, p.1906-1909, 2010.

CORREA, E.M. et al. Assessment of Solubility and Intestinal Absorption *In Vitro* of Praziquantel in Solid Dispersions of Polyethylene Glycol 6000. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.30; n.10; p. 1910-1915; 2011.

DELGADO, V. S. et al. Experimental chemotherapy ofSchistosoma mansoni with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drµgs on various strains and on both sexes of the parasite.**Parasitology research**, v. 78, n. 8, p. 648-654, 1992.

DOS SANTOS CAMPOS, F. et al. Effect of 70-kDa and 148-kDa dextran hydrogels on praziquantel solubility. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1-8.

ESTEVES, B.N. **Influência do processo de secagem por pulverização mecânica (*spray dryer*) no tamanho de partícula e densidade aparente do café solúvel** Dissertação de Mestrado da Universidade de São Paulo – São Paulo, 2006.

FERRARI, M.L.A. et al. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of Schistosoma mansoni infection: a controlled trial. **Bulletin of the World Health Organization** v. 81; n. 3; p. 190-196; 2003.

FOUAD, E.A. et al. The use of spray-drying to enhance celecoxib solubility. **Drµg development and industrial pharmacy**, v. 37, n. 12, p. 1463-1472, 2011.

GAUDIN, S. et al. Antiplasticisation and oxygen permeability of starch–sorbitol films. **Carbohydrate polymers**, v. 43, n. 1, p. 33-37, 2000.

GUIMARÃES, T.F. et al. A multivariate approach applied to quality on particle engineering of spray-dried mannitol. Advanced Powder Technology, v. 26, n. 4, p. 1094-1101, 2015.

HERMETO, M.V. et al. Oogram studies in mice infected with Schistosoma mansoni and treated with dexamethasone. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 36, n. 2, p. 99-103, 1994.

HUANG, Y.; DAI, W.G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drµgs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 18-25, 2014.

INGRAM, K.; ELLIS, W.; KEISER, J. Antischistosomal activities of mefloquine-related arylmethanols. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3207-3215, 2012.

JESUS, de M.B. et al. Theoretical and experimental study of a praziquantel and β-cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and 1H-nuclear magnetic resonance. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 41, n. 4, p. 1428-1432, 2006.

KAPOOR, B. et al. Solid Dispersion: An evolutionary approach for solubility enhancement of poorly water soluble drµgs. **Int. J. Recent Adv. Pharm. Res**, v. 2, p. 1-16, 2012.

KOLENYAK-SANTOS, F. et al. Nanostructured Lipid Carriers as a Strategy to Improve the *In Vitro* Schistosomiasis Activity of Praziquantel. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** v. 14; p.1–12; 2014.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drµg solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 50; p. 47-60; 2000.

LIANG, Y.-S. et al. Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni.* **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** v. l34; n. 2; p. 274-280; 2003.

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

LIMA, A.A.N. et al. Solid dispersion systems for increase solubility: Cases with hydrophilic polymers in poorly water soluble drµgs. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, p. 269-278, 2012.

LIU, X. et al. Improving the chemical stability of amorphous solid dispersion with cocrystal technique by hot melt extrusion. **Pharmaceutical research**, v. 29, n. 3, p. 806-817, 2012.

LIU, Y. et al. Structural characterization and enantioseparation of the chiral compound praziquantel. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 93, n. 12, p. 3039-3046, 2004.

MALHADO, M. et al. Preclinical pharmacokinetic evaluation of praziquantel loaded in poly (methyl methacrylate) nanoparticle using a HPLC–MS/MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 117, p. 405-412, 2016.

MANNECK, T. et al. Isothermal microcalorimetry to study drµgs against Schistosoma mansoni. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1217-1225, 2011.

MARTINS, R.M. **Desenvolvimento de disperses sólidas microparticuladas contendo carbamazepina por *spray congealing.*** 2010. 166f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

MARTINS, R.M. et al. Microparticulated Hydrochlorothiazide Solid Dispersion: Enhancing Dissolution Properties via Spray Drying. **Drying Technology**, vol 30,p. 959–967, 2012.

MARTINS, R.M. et al. Microstructured ternary solid dispersions to improve carbamazepine solubility. **Powder technology**, v. 215, p. 156-165, 2012.

MARTINS, R.M. et al. Engineering active pharmaceutical ingredients by *spray drying*: Effects on physical properties and in vitro dissolution. **Drying Technology**, v. 30, n. 9, p. 905-913, 2012.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. New York: John Wiley & Sons. 4th edition, 1985. 696p.

MASTERS K. **Spray drying in practice.** Charlottenlund: SprayDryConsult International ApS, 2002. 470p.

MORAES, J. et al. Schistosoma mansoni: *In vitro* schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology** v.127; p. 357–364; 2011.

MOREIRA, Germano Eder Gadelha et al. Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 641-645, 2009.

MOURÃO, S.C. et al. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. **International Journal of Pharmaceutics** v. 295; n. 1-2; p.157-62; 2005.

OLIVEIRA, S.M. et al. Resposta do *Schistosoma mansoni* Mantido In Vitro frente a Derivados Imidazolidinônicos. **Acta Farmacéutica Bonaerense** v. 23; n. 3; p. 343-348; 2004.

OLIVEIRA, R.N. et al. Schistosoma mansoni: *In vitro* schistosomicidal activity of essential oil of Baccharis trimera (less) DC. - **Experimental Parasitology.** v.132; p.135–143, 2012.

OLIVEIRA, R.N. et al. Anthelmintic activity *in vitro* and *in vivo* of Baccharis trimera (Less) DC 4 against immature and adult worms of Schistosoma mansoni. **Experimental Parasitology** v.139; p. 63–72; 2014.

OLIVIER, L.; STIREWALT, M.A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of parasitology**, v. 38, n. 1, p. 19-23, 1952.

PASSERINI, N. et al. 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.

PATEL, R.P.; PATEL M.P.; SUTHAR A.M. Spray drying technology: an overview. **Indian Journal of Science and Technology.** v.2, n.10, p.44-47, 2009.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Revista Brasileira Malariologia e Doenças Tropicais.** v. 8; p. 589– 597, 1956.

RÉ, M.I. Formulating drµg delivery systems by *spray drying*. **Drying Technology**, v. 24, n. 4, p. 433-446, 2006.

RÉ, M.I. Microencapsulation by Spray Drying. **Drying Technology**. v.16, n. 6, p. 1195-1236, 2007.

RIBEIRO, M.J. et al. A atomização como processo de obtenção de pós para a indústria cerâmica.**Revista Cerâmica Industrial**, v. 6, n. 5, 2001.

SANTOS, A.S. **Avaliação das propriedades de estado sólido de dispersões de hidroclorotiazida em polivinilpirrolidona.** 2008. 86f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

SEKIGUCHI, K.; OBI, N. Studies on Absorption of Eutectic Mixture. I. A Comparison of the Behavior of Eutectic Mixture of Sulfathiazole and that of Ordinary Sulfathiazole in Man. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 11, p. 866-872, 1961.

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E.; Solid dispersions: revival with greater possibilities and applications in oral drµg delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drµg Carrier Systems**, v. 20; n. 2-3; p. 215-247; 2003.

SHARMA, A.; JAIN, C.P. Solid dispersion: A promising technique to enhance solubility of poorly water soluble drµg. **International Journal of Drµg Delivery**, v. 3, n. 2, p. 149-170, 2011.

SHEN, S.C. et al. Stabilized amorphous state of ibuprofen by co-*spray drying* with mesoporous SBA-15 to enhance dissolution properties. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 4, p. 1997-2007, 2010.

SHEWEITA, S.A.; HASSAN, M.; BAHASHWAN, S. A. Schistosoma mansoni changes the activity of phase II drµg-metabolizing enzymes: role of praziquantel as antibilharzial drµg. **Drµg Metabolism Letters**. v. 4; n. 3; p. 134-8; 2010.

SILVA, A.A. **Preparação e caracterização de granulados contendo dispersão sólida de praziquantel obtidos por fusão/solidificação em leito de jorro fluidizado.** 2008. 158f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

SIX, K. et al. Clinical study of solid dispersions of itraconazole prepared by hot-stage extrusion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 24; n. 2-3; p. 179-186; 2005.

SOUZA, A.L.R. et al. *In vitro* evaluation of permeation, toxicity and effect of praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles against Schistosoma mansoni as a strategy to improve efficacy of the schistosomiasis treatment. **International Journal of Pharmaceutics.** v.463; p. 31–37; 2014.

USP 30 **UNITED STATES PHARMACOPEIA** – NF25. Rockville: The United States Pharmacopeial Convection, 2007. p. 242, 274, 643, 2999, 3000.

VITORINO, R.R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev Soc Bras Clín Méd**, p. 39-45, 2012.

WEUTS, I. et al. Salt formation in solid dispersions consisting of polyacrylic acid as a carrier and three basic model compounds resulting in very high glass transition temperatures and constant dissolution properties upon storage. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 25; n. 4-5; p. 387-393; 2005.

WEUTS, I. et al. Physicochemical properties of the amorphous drµg, cast films, and spray dried powders to predict formulation probability of success for solid dispersions: etravirine. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 1, p. 260-274, 2011.

WHO. World Health Organization. Schistosomiasis: A major public health problem. Disponível em <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Acesso em: 15 Set. 2015.

WHO. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. Disponível em <http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/>. Acesso em: 5 Jun. 2015.

WU, M.H. et al. Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levo-praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 45, n. 3, p. 345-349, 1991.

WUA, Y. et al. Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by *spray drying*. **Carbohydrate Polymers** v.102; p. 497–503, 2014.

ZAPAROLI, R.E.; **Dispersão sólida de praziquantel: caracterização do estado sólido e avaliação do perfil de dissolução.** 2011. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2011.