



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

César Corat Ribeiro Prado

**Desenvolvimento de um *self-emulsifying drug delivery system* (SEDDS) para
carreamento da ivermectina e avaliação da sua atividade sobre *Strongyloides
venezuelensis***

Campinas

2019

César Corat Ribeiro Prado

**Desenvolvimento de um *self-emulsifying drug delivery system* (SEDDS) para
carreamento da ivermectina e avaliação da sua atividade sobre *Strongyloides*
*venezuelensis***

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutor em Biologia Animal. Área
de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e
Parasitologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Silmara Marques Allegretti

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Andrade Santana

ESTE TRABALHO CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO CÉSAR
CORAT RIBEIRO PRADO E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
SILMARA MARQUES ALLEGRETTI.

Campinas

2019

P882d Prado, César Corat Ribeiro, 1983-
Desenvolvimento de um *self-emulsifying drug delivery system* (SEDDS) para carreamento da ivermectina e avaliação da sua atividade sobre *Strongyloides venezuelensis* / César Corat Ribeiro Prado. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Silmara Marques Allegretti.

Coorientador: Maria Helena Andrade Santana.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ivermectina. 2. Estrongiloidíase. 3. *Strongyloides venezuelensis*. 4. Sistemas de liberação de medicamentos. I. Allegretti, Silmara Marques, 1963-. II. Santana, Maria Helena Andrade, 1951-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for carrying ivermectin and evaluation of its activity on *Strongyloides venezuelensis*

Palavras-chave em inglês:

Ivermectin

Strongyloidiasis

Strongyloides venezuelensis

Drug delivery systems

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Doutor em Biologia Animal

Banca examinadora:

Silmara Marques Allegretti [Orientador]

Marlene Tiduko Ueta

Danilo Ciccone Miguel

Tarsila Ferraz Frezza

Maria Palmira Daflon Gremião

Data de defesa: 11-12-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4998-4333>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3757485355201081>

Campinas, 11 de dezembro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Membros titulares

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Profa. Dra. Tarsila Ferraz Frezza

Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Agradeço à luz que ilumina a todos, que cuida e promove a vida, que nos traz idéias, e inspirações, que nos alerta e intui para que façamos a nossa parte do todo.

Aos meus pais Mauro e Magali por me apoiarem nos momentos importantes e sempre estarem dispostos a me ajudar.

À Juliana, minha esposa e companheira em todos os momentos por todo amor, cuidado, paciência e fé em minhas escolhas. Sem sua presença, nada teria terminado ou começado. A pessoa que me deu o mais lindo presente: minha filha Elisa.

À minha avó materna Yolanda (*in memorian*), por fazer parte de meus pensamentos sendo exemplo de humanidade.

Aos amigos que colaboraram com meu aprendizado durante esse período: Sheila, Tiago, Paula, Danilo, Meylin e tantos outros que passaram.

À professora e orientadora Silmara Marques Allegretti, que tem todo meu respeito e admiração, por me acolher, e ensinar mais que conteúdo.

À professora e co-orientadora Maria Helena Andrade Santana, que também me acolheu com muito carinho e respeito, abrindo as portas de seu laboratório e orientando com muita dedicação minhas dificuldades.

À professora Marlene Tiduko Ueta por me ensinar a prática com os parasitos e os modelos.

À professora Mary Anne Heidi Dolder pelo profissionalismo, colaboração e apoio.

Ao Gilson Maia Junior, pela incrível amizade, ajuda com uma nova área de conhecimento e equipamentos, pela paciência e conversas.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

Resumo

A ivermectina é um fármaco amplamente utilizado no tratamento de diversas doenças parasitárias, entretanto uma das principais dificuldades é sua baixa solubilidade em água, o que acarreta o uso de concentrações mais elevadas para um tratamento eficaz. O objetivo deste trabalho foi desenvolver partículas contendo ivermectina a partir de formulações *Self-Emulsifying Drug Delivery System* (SEDDS), utilizando óleos e surfactantes de baixa toxicidade, assim melhorando sua solubilidade em água e conseqüentemente sua biodisponibilidade. A partir de ensaios de capacidade de solubilização, de compatibilidade de excipientes, Z-average e índice de polidispersão das partículas formadas, foi observado que duas das formulações 1) Peceol (fase oleosa), BRIJ CS12 e Transcutol (surfactantes) e 2) Labrafac Lipophile (fase oleosa), Gelucire 48/16 e Renex PEG 400 (surfactantes) apresentaram resultados que indicam partículas dispersas, sem separação de fases e Z-average de 63,17 e 52,93, respectivamente. Posteriormente foram realizados ensaios *in vitro* com fêmeas parasitas de *Strongyloides venezuelensis* submetidas às formulações e ensaios *in vivo* em ratos infectados. Os resultados obtidos indicaram que as formulações de SEDDS contendo ivermectina avaliadas neste trabalho apresentaram-se mais eficazes do que os resultados observados nos controles farmacológicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, indicando uma nova alternativa para posteriores estudos para o uso em outros modelos experimentais.

Palavras-chave: Ivermectina, estrogiloidíase, *Strongyloides*, SEDDS.

Abstract

Ivermectin is a widely used drug in the treatment of various parasitic diseases, however one of the main difficulties being its low solubility in water, which leads to the use of higher concentrations for effective treatment. The objective of this work was to develop ivermectin-containing particles from SEDDS (Self-Emulsifying Drug Delivery System) formulations using low toxicity oils and surfactants, thus improving their water solubility and consequently their bioavailability. From the solubilization capacity, excipient compatibility, Z-average and polydispersity index tests of the formed particles, it was observed that two of the formulations 1) Peceol (oil phase), BRIJ CS12 and Transcutol (surfactants) and 2) Labrafac Lipophile (oil phase), Gelucire 48/16 and Renex PEG 400 (surfactants) showed results that indicate dispersed particles, with no phase separation mostly and Z-average of 63.17 and 52.93, respectively. Subsequently, *in vitro* assays were performed with female parasites of *Strongyloides venezuelensis* submitted to the formulations and *in vivo* assays using infected rats. The results indicated that the ivermectin-containing SEDDS formulations evaluated in this study were more effective than the results observed in pharmacological controls, both *in vitro* and *in vivo*, indicating a new alternative for further studies for use in other experimental models.

Key word: Ivermectin, strongyloidiasis, *Strongyloides*, SEDDS.

Sumário

1	Introdução.....	10
1.1	Doenças Tropicais Negligenciadas causadas por Parasitos.....	10
1.2	Estrongiloidíase.....	10
1.2.1	Tratamento	12
1.3	Melhoramento de fármacos.....	14
1.3.1	Self-Emulsifying Drug Delivery Systems.....	15
2	Objetivos.....	19
2.1	Objetivos específicos	19
3	Justificativa	20
4	Material e Métodos	21
4.1	Material	21
4.2	Metodologia.....	21
4.2.1	Escolha dos componentes para a formulação dos SEDDS	22
4.2.1.1	Curva de clibração.....	22
4.2.1.2	Ensaio de dissolução.....	22
4.2.2	Caracterização físico-química dos SEDDS.....	24
4.2.2.1	Estabilidade das formulações	24
4.2.2.2	Diâmetro médio e potencial zeta	24
4.2.3	Estabilidade no Sistema Digestivo.....	25
4.2.3.1	Estabilidade no Sistema Digestivo.....	25
4.2.4	Morfologia dos SEDDS.....	27
4.2.5	Cinética de liberação <i>in vitro</i>	28
4.2.6	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito de SEDDS em <i>Strongyloides venezuelensis</i>	29
4.2.7	Morfologia dos parasitos submetidos ao tratamento com SEDDS 2 e SEDDS 19	30
4.2.8	Avaliação de SEDDS 2 e SEDDS 19 <i>in vivo</i>	31
4.3	Análise estatística	34
5	Resultados e Discussão.....	34
5.1	Quantificação de ivermectina por espectrofotometria UV/Vis	34
5.1.1	Curva de calibração.....	34
5.1.2	Ensaio de Dissolução	34
5.1.3	Estabilidade das formulações	36
5.1.4	Diâmetro médio e Potencial Zeta.....	37

5.2	Estabilidade dos SEDDS nos Fluídos Gástrico e Intestinal Simulados	4040
5.3	Morfologia dos SEDDS por microscopia eletrônica de transmissão	40
5.4	Cinética de liberação <i>in vitro</i>	41
5.4.1	Ensaio de liberação	41
5.5	Ensaio biológicos.....	43
5.5.1	Avaliação dos SEDDS In vitro em <i>Strongyloides venezuelensis</i>	43
5.5.2	Morfologia dos parasitos.....	48
5.5.3	Avaliação dos SEDDS <i>in vivo</i>	51
6	Conclusão	599
7	Referências.....	60
8	Anexos.....	67
8.1.	Certificado CEUA/Unicamp 4400-1.....	67
8.2.	Certificado CEUA/Unicamp 4400-1(A).....	68
8.3.	Declaração de direitos autorais.....	69

1 Introdução

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas causadas por Parasitos

Infecções parasitárias causadas por nematódeos acometem mais de 1/3 de toda população humana (Holden-Dye e Walker, 2007), sendo a maioria dessas está localizada em países do hemisfério Sul e com baixos índices de desenvolvimento humano, como na África subsaariana, América do Sul e Ásia Meridional (Birmani et al., 2012; CDC, 2011). Devido a esses motivos e ao baixo investimento em melhorias em saneamento básico e ambiental, doenças como a ascaridíase, filariose linfática, ancilostomíase entre outras são consideradas pela Organização Mundial da Saúde como Doenças Tropicais Negligenciadas (Hotez et al., 2007).

De acordo com World Health Organization (2006), a quimioterapia preventiva é uma ferramenta utilizada para o tratamento de diversas parasitoses em áreas endêmicas, porém os fármacos utilizados nem sempre são específicos, o que gera uma resposta inconstante ao tratamento (Shalaby, 2013).

1.2 Estrongiloidíase

Dentre as parasitoses, a estrongiloidíase, causada principalmente pelo parasito do gênero *Strongyloides*, espécie *stercoralis*, Família Strongyloididae, Ordem Rhabditida, Classe Secernentea (Chromadorea), Filo Nematoda, Reino Animal, e é considerada como a mais negligenciada das doenças tropicais negligenciadas, acometendo de 30 a 100 milhões de pessoas no mundo (Olsen et al., 2009, Bisoffi et al., 2013).

A infecção por estrongiloidíase ocorre através na penetração ativa da pele por larvas filaróides presentes no solo. As larvas filarióides migram para os vasos sanguíneos, são levadas para os pulmões onde penetram o espaço alveolar, e posteriormente, as larvas migram para a faringe onde são deglutidas, chegando no trato digestório. No intestino delgado completam seu desenvolvimento, tornando-se fêmeas partenogenéticas adultas. As fêmeas eliminam ovos na mucosa intestinal que são levados para o lúmen onde eclode a larva rhabditóide (Grove, 1996; Viney e Lok, 2011).

Um indivíduo infectado elimina em suas fezes larvas rhabditoides e no solo se dará o desenvolvimento até a chegada ao estágio infectante (filaróide), prosseguindo assim o ciclo deste parasita. No entanto, em casos onde os indivíduos apresentam redução da resposta imune, como pacientes em tratamentos com imunossupressores como corticosteroides (doenças autoimunes ou pós-transplantes), alcoolistas e portadores de outras doenças como HTLV, é possível que ocorra um quadro de autoinfecção, onde as larvas rhabditoides se desenvolvem em filarióides antes de serem eliminadas nas fezes, reinfectando o paciente. Essa autoinfecção comumente leva à forma disseminada da doença, uma vez que os parasitas migram para outros órgãos, causando severas complicações que podem levar à morte do indivíduo (De Bona e Basso, 2008; Fardett et al., 2007; Lim et al., 2004; Viney e Lok, 2011). A figura 1 apresenta de forma sucinta o ciclo de *Strongyloides stercoralis*.

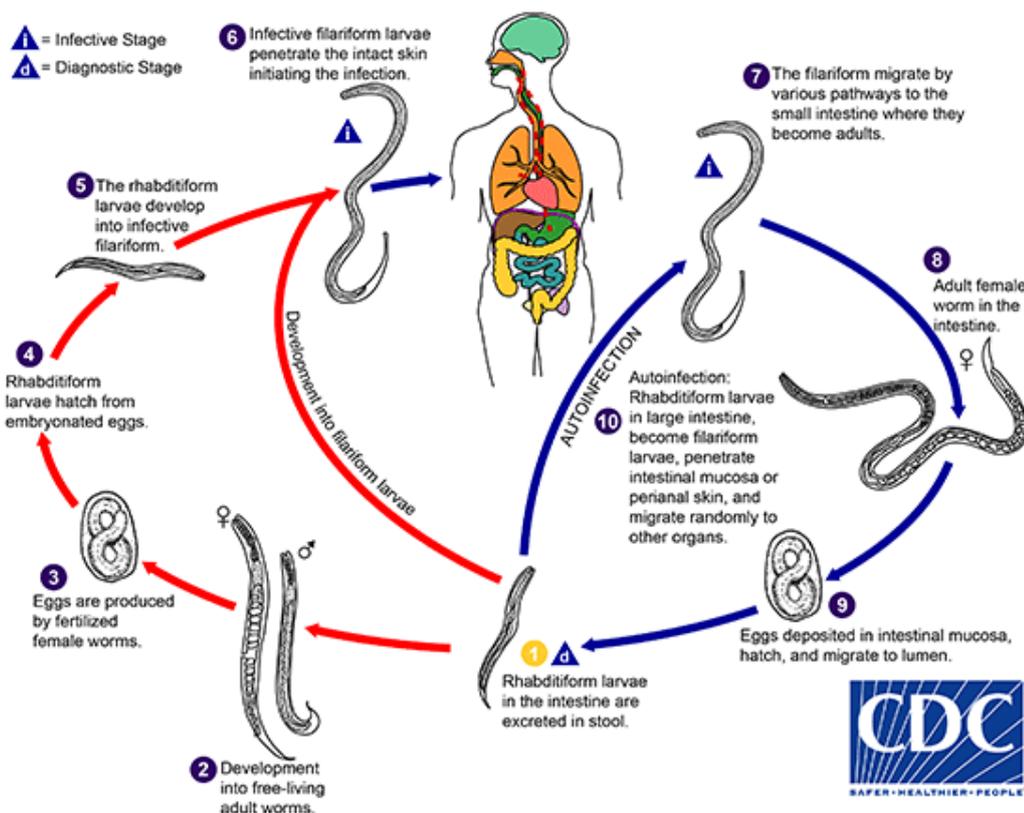


Figura 1. Ciclo de vida de *Strongyloides stercoralis*, retirado de <https://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/biology.html> (acessado em 04/06/2017)

Há cerca de 30 anos, relaciona-se a presença do vírus HTLV com inúmeras doenças sistêmicas, dentre elas a estrogiloidíase. O HTLV-1 (vírus linotrófico de células T humano tipo 1) é endêmico de vários países, inclusive do Brasil, e acomete cerca de 2,5 milhões de pessoas ao redor do mundo (Poiesz et al., 1980). Há relatos desse vírus estar relacionado com várias doenças, incluindo o linfoma cutâneo de células T, a estrogiloidíase, escabiose, hanseníase e tuberculose (Verdonck et al., 2007).

O aumento da prevalência da estrogiloidíase em indivíduos parasitados também pelo vírus HTLV-1 está relacionado com a interferência na resposta imune contra *Strongyloides stercoralis*. A presença do vírus estimula a proliferação de linfócitos secretores de citocinas tipo 1, desloca o equilíbrio Th1 / Th2 em favor de uma resposta Th1 com consequente aumento na produção de Intérféron- γ (INF- γ) (Pays, 2011). Os níveis elevados de INF- γ diminuem os níveis de Interleucina-4, Interleucina-5 e Interleucina-13 e Imunoglobulina E (IgE) necessárias para a resposta contra o parasita. Devido à essas moléculas estarem relacionadas aos mecanismos de defesa contra *S. stercoralis*, a sua diminuição permite a autoinfecção e redução da mortalidade do parasito, ocasionando hiperinfecção com disseminação de *S. stercoralis* para outros tecidos, a forma mais grave da doença (Carvalho e Porto, 2004; Gotuzzo et al., 1999, Pays, 2011).

1.2.1 Tratamento

Para o tratamento da estrogiloidíase, a Organização Mundial da Saúde sugere o uso de ivermectina e albendazol, podendo, como alternativa serem utilizados outros benzimidazóis como mebendazol, tiabendazol e cambendazol (WHO 2006, Mendes et al, 2017).

A ivermectina foi desenvolvida por William C. Campbell e Satoshi Omura a partir do actinomiceto *Streptomyces avermitillis* e, desde a década de 1980, tem sido o fármaco de primeira escolha no tratamento da estrogiloidíase (Campbell et al., 1983; Mendes et al, 2017).

A ivermectina é oriunda da mistura de 22,23-dihidroavermectina H2B1a (C₄₈H₇₄O₁₄ de massa molecular 875,1 g/mol) e 22,23-dihidroavermectina H2B1b

(C₄₇H₇₂O₁₄ de massa molecular 861,1 g/mol) em proporções maiores que 90% H2B1a e menores que 10% de H2B1b (Campbell et al., 1983). A molécula do fármaco se liga aos canais de cloreto mediados por glutamato presentes na membrana dos invertebrados, bloqueando os neurotransmissores GABA, o que causam aumento da permeabilidade para ions cloreto resultando em hiperpolarização de células nervosas e musculares, levando a paralisia e morte(Campbell et al., 1983).

Atualmente é um dos fármacos recomendados e mais utilizados para o tratamento da estrogiloidíase e outras doenças causadas por nematódeos e ectoparasitas (WHO, 2006), no entanto há restrições quanto ao seu uso. Vários autores descrevem a possibilidade de efeitos neurotóxicos em crianças menores de 5 anos ou 15 quilos, mulheres grávidas, lactentes, pacientes com doenças no sistema noervoso central (Lawrence et al., 2005; Ottesen e Campbell, 1994; Pacque et al., 1990) Pacque et al. (1990) e Mendes et al. (2017) descrevem ainda efeitos menos severos como transtornos gástricos, dor abdominal, fadiga e reações na pele semelhantes à urticária, contribuindo para que sejam menos recomendadas por profissionais da área médica.

A ivermectina apresenta também problemas quanto à sua eficácia, apresentando taxas de cura variáveis. Experimentalmente, Amato-Neto et al. (1997) avaliaram sua atividade em ratos infectados com *Strongyloides venezuelensis*, onde os resultados obtidos também foram inconstantes, variando entre 59 e 98% de cura. De maneira similar, a eficácia da ivermectina é inconstante em doentes imunocompetentes infectados com *S. stercoralis*, variando entre 55 e 100% (Bisoffi et al. 2013; Panic et al., 2014; Luvira et al, 2014), tornando o tratamento incerto.

Com relação à absorção da ivermectina, Fox (2006) relata que a quantidade de ivermectina que é absorvida varia entre 50 e 60%, sendo essa quantidade detectado no plasma após uma hora de ingestão (via oral) e atinge pico plasmático em 4 a 5 horas após o uso. A metabolização da ivermectina ocorre no fígado e seus metabólitos são excretados na bile, sendo a meia vida em sua forma original de 12 a 56 horas. Seus metabólitos têm meia vida de 3 dias (Basáñez et al., 2008; Fox, 2006; Luna et al., 2007).

O albendazol, fármaco da classe dos benzimidazóis tem seu mecanismo de ação por meio de múltiplas alterações metabólicas, os quais estão envolvidos em sua

maioria na produção de energia do parasita (Lacey, 1988). Hardman et al. (2001) e McEvoy et al. (2006) descrevem que, primariamente, ocorre a inibição da polimerização de microtúbulos, uma vez que o fármaco se liga à beta-tubulina livre, levando à inibição da captação de glicose, além da inibição da enzima fumarato-redutase mitocondrial.

O mebendazol, pertencente à mesma classe do albendazol e desenvolvido por Banerjee et al. (1971) foi produzido industrialmente pela farmacêutica canadense Janssen Inc. em 1975, aprovada para uso em humanos. Segundo Köhler e Bachmann (1981), o mebendazol atua na inibição da tubulina intestinal, levando à redução da captação de glicose pelo nematódeo.

Ainda na classe dos benzimidazóis, é importante citar o tiabendazol e o cambendazol como possíveis tratamentos, sendo que agem de maneiras diferentes no parasito, onde o primeiro atua no sistema reprodutivo de *S. stercoralis* (Grove, 1982) e o cambendazol atua principalmente nas larvas que migraram para os tecidos, em especial nos músculos, de acordo com ensaio realizado por Grove e Northern (1986).

Embora albendazole e os seus análogos sejam utilizados como alternativas à ivermectina no tratamento de *S. stercoralis*, as suas taxas de cura também são bastante variáveis. Albendazole apresenta taxas de cura de 38 a 87%, mebendazole 67 a 98% e tiabendazol 52 a 100% (Panic et al., 2014). Outro problema da classe dos benzimidazóis, é a presença comum de efeitos secundários como náusea, vômito, anorexia, astenia e diarreia, além de sintomas neurológicos como tonturas, sono e desorientação (Mendes et al, 2017).

1.3 Melhoramento de fármacos

Uma considerável quantidade dos fármacos existentes, bem como os citados anteriormente, apresentam problemas quanto a sua biodisponibilidade, uma vez que a maioria deles são pouco hidrossolúveis e a sua solubilidade em água é um dos pré-requisitos para a absorção intestinal (Amidon et al., 1995; Gursoy e Benita, 2004; Severino et al., 2012; Williams et al., 2013). Buscando resolver tal problema, atualmente vêm sendo desenvolvidos sistemas que visam a melhoria na solubilização

de fármacos, como *Self-Emulsifying Drug Delivery Systems* (SEDDS), Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Carreados Lipídicos Nanoestruturados, os quais também facilitam a absorção e distribuição do fármaco pela presença dos lipídeos nas nanopartículas e nas membranas celulares, havendo inclusive uma grande quantidade de fármacos nesta forma no mercado (Pardeshi et al., 2012; Attivi et al., 2010, Dixit et al., 2010; Ekambaram et al., 2012; Gursoy e Benita, 2004; Mahapatra et al., 2014; Singh et al., 2009).

Além de aumentar a solubilidade em água para melhorar a distribuição de fármacos antihelmínticos, vários autores sugerem a entrega desses fármacos ao sítio específico de absorção. Nanopartículas poliméricas carreando albendazol foram desenvolvidas por Jain et al. (2004) e por Emeje et al. (2009), visando uma melhor liberação no cólon intestinal. Gandhi et al. (2010) desenvolveram partículas poliméricas para o mesmo alvo, porém para o carregamento de ivermectina, no entanto, ambos relataram apenas a produção das partículas, caracterização e cinética de liberação do fármaco, mas não realizaram ensaios em parasitos.

1.3.1 Self-Emulsifying Drug Delivery Systems

De acordo com Krstić et al. (2018), o uso de formulações com fases oleosas para a solubilização de fármacos lipofílicos apresenta inúmeras vantagens, como uma maior estabilidade das partículas e melhor interação com o sítio de absorção (cólon intestinal).

Dentre as alternativas para a melhoria da solubilização de fármacos pouco solúveis em água, destacam-se os *Self-Emulsifying Drug Delivery System* – SEDDS, classificado por Pouton (1985) como Tipo II, onde os lipídeos, tensoativos e co-tensoativos originam uma formulação altamente dispersa, a qual origina uma mistura óleo-água através da movimentação dos seus componentes pelo trato digestório. Esse tipo de formulação fornece proteção do fármaco frente ao ambiente gástrico e intestinal acarretando proteção a fármacos sensíveis, melhor biodisponibilidade oral, controle eficiente do perfil de liberação do fármaco, capacidade de carregamento de grandes quantidades de fármaco, alta eficiência no carregamento e possibilidade de formulação líquida ou sólida (Chatterjee et al., 2016; Mahapatra et al., 2014; Swati et al., 2016).

De acordo com Pujara (2012), SEDDS geralmente são compostos por uma fase oleosa de triglicerídeos de cadeia média ou longa de valor de HLB (balanço hidrofílico-lipofílico) próximos a 1, o qual solubiliza o fármaco (lipofílico) e uma fase contendo um ou mais tensoativos (co-tensoativo), que recobrem a fase oleosa e conferem estabilidade à partícula, sendo estes componentes, em parte, responsáveis por controlar a velocidade da liberação do fármaco.

Atualmente, vários produtos farmacêuticos são formulados em SEDDS, conforme descrito na tabela 1. É possível observar a ausência de fármacos comerciais em soluções, uma vez que são mais estáveis antes do processo de emulsificação. Comumente são encontrados em cápsulas moles de gelatina, pois o processo de emulsificação origina partículas que pouco se alteram no trato digestivo, reduzindo o custo de produção.

Tabela 1. Fármacos comercializados formulados em SEDDS (Singh et al., 2009).

Nome comercial (Marca)	Princípio ativo	Solubilidade e em água	Tipo de formulação	Excipientes	Estocagem
Neoral® (Novartis)	Ciclosporina A	0.00953 mg/mL	Cápsulas moles de gelatina (10, 25, 50, 100 mg); Solução oral (100 mg/mL)	Cremophor RH 40	Temperatura ambiente
Sandimmune® (Novartis)	Ciclosporina A	-	Cápsulas moles de gelatina (10, 25, 50, 100 mg); Solução oral (100 mg/mL)	Labrafil M 2125 CS Labrafil M 1944 CS	Temperatura ambiente
Gengraf® (Abbott)	Ciclosporina A	-	Cápsulas moles de gelatina (25 e 100 mg);	Cremophor EL e polysorbate 80	Temperatura ambiente
Cyclosporine® capsules (Sidmak)	Ciclosporina A	-	Cápsulas moles de gelatina (100 mg)	Labrafac, Labrasol, Cremophor EL	Temperatura ambiente
Kaletra® (Abbott)	Lopinavir e Ritonavir	Lopinavir (0,00192 mg/mL) Ritonavir (0,00126 mg/mL)	Lopinavir em cápsulas moles de gelatina (133,3 mg) e ritonavir (33,3 mg) Solução oral de liponavir (80	Cremophor EL Cremophor RH 40 e óleo de menta	2°C-8°C ou à temperatura ambiente por até de 2 meses

			mg/mL) e de ritonavir (20 mg/mL)		
Norvir® (Abbott)	Ritonavir	0,00126 mg/mL	Cápsulas moles de gelatina (100 mg)	Cremophor EL	2°C-8°C ou à temperatura ambiente por até de 2 meses
Fortovase® (Roche)	Saquinavir	0,00247 mg/mL	Cápsulas moles de gelatina (200 mg)	Mono e diglicerídeos de cadeia média e dl- α -tocopherol	2°C-8°C ou à temperatura ambiente por até de 2 meses
Aptivus® (Boehringer Ingel-heim)	Tipranavir	0,000207 mg/mL	Cápsulas moles de gelatina (200 mg)	Cremophor EL e mono e diglicerídeos de cadeia média	2°C-8°C após a abertura do frasco ou à temperatura ambiente por até 60 dias
Fenogal® (Genus)	Fenofibrato		Cápsulas duras de gelatina (200 mg)	Gelucire 44/14	Temperatura ambiente
Lipirex® (Sanofi Aventis)	Fenofibrato		Cápsulas duras de gelatina	Gelucire 44/14 e PEG 2000	Temperatura ambiente
Infree® (Eisai Co.)	Indometacina	0,0024 mg/mL	Cápsulas moles de gelatina (200 mg)	Cremophor RH 60, óleo hidrogenado e gliceril monooleato	Temperatura ambiente
Agenerase® (GaxoSmithKline)	Amprenavir	0,0491 mg/mL	Cápsulas moles de gelatina	TPGS (12%), PEG 400 (17%), Propilenoglicol (55%) e cloreto de sódio	Temperatura ambiente
Solufen® (Sanofi-Aventis)	Ibuprofeno	0,0684 mg/mL	Cápsulas duras de gelatina	Gelucire 44/14	Temperatura ambiente
Accutane® (Roche)	Isotretinoína	0,00477 mg/mL	Cápsulas moles de gelatina (10, 20 e 40 mg)	Cera de abelha, BHA, EDTA, óleo de soja hidrogenado em flocos, óleos vegetais hidrogenados, óleo de soja	Temperatura ambiente

A utilização de SEDDS para aumento da biodisponibilidade pode, não só levar a um aumento da eficácia de um fármaco, mas também pode levar à redução da concentração necessária para tratamento, havendo a possibilidade de gerar menos efeitos colaterais. Desta maneira, se faz necessário a pesquisa pelo aumento da

biodisponibilidade da ivermectina, principalmente através de alternativas que envolvam um processo simples de emulsificação do fármaco, como os *self-emulsifying drug delivery systems*, já utilizados na indústria farmacêutica.

2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral melhorar a biodisponibilidade de ivermectina, aumentando a sua solubilidade com a técnica de *Self-Emulsifying Drug Delivery Systems* (SEDDS), avaliando essa melhoria através de ensaios envolvendo a estabilidade das formulações, tamanho das partículas, a cinética de liberação do fármaco e a atividade biológica *in vitro* e *in vivo*.

2.1 Objetivos específicos

- Triar possíveis componentes SEDDS, selecionar as fases oleosas com maior capacidade de solubilização (fármaco, tensoativos e co-tensoativos), com baixa toxicidade e que confirmam boa estabilidade ao SEDDS.
- Investigar a velocidade de liberação de ivermectina.
- Avaliar, por meio de ensaios *in vitro* a atividade das partículas em fêmeas partenogênicas de *Strongyloides venezuelensis* quanto à motilidade e mortalidade em diferentes proporções de fase oleosa/tensoativo/co-tensoativo, bem como diferentes concentrações de ivermectina,
- Avaliar, por meio de ensaios *in vivo* a eficácia das partículas no tratamento de camundongos infectados com *S. venezuelensis* através da quantidade de ovos por grama de fezes.

3 Justificativa

Devido à alta prevalência e ampla distribuição da estrogiloidíase no Brasil, somado ao fato de ser uma Doença Negligenciada, não se pode ignorar a possibilidade desta parasitose atingir regiões ainda indenes. Contudo, apesar da existência de fármacos como a ivermectina para o tratamento, até o momento não existe um fármaco que atue de modo eficiente em diferentes esquemas terapêuticos e para diferentes indivíduos, em consequência da variabilidade de resposta ao tratamento. Neste panorama, é desejável que se conduzam estudos para melhoria da biodisponibilidade da ivermectina para o tratamento da estrogiloidíase, visando, sobretudo, uma melhor eficácia sobre os estágios larvários e vermes adultos.

Sendo os SEDDS uma tecnologia já utilizada na indústria farmacêutica, sua formulação leva em conta componentes que apresentam baixa toxicidade e que não causem alterações permanentes nos sistemas biológicos, como no caso dos tensoativos, porém que desempenham papel importante na absorção e adesão do fármaco encapsulado às membranas biológicas.

4 Material e Métodos

4.1 Material

Foi utilizada ivermectina obtida de Sigma-Aldrich (I8898, St. Louis, MO), óleos super-refinados de Rícino, Oliva, Amendoin, Gergelim e de Algodão gentilmente doados por Croda (Campinas, Brasil), além de Peceol, Labrafac Lipophile e Labrafac PG, cedidos por Gattefossé (Nanterre, França). Os tensoativos Cithrol GMS 40, Cithrol DGMS, Brij CS12, Adinol CT95, Cirrasol G1284 e Cithrol 10MS foram cedidos por Croda (Campinas, Brasil) e Labrafil M1944CS, Labrafil M2130, Labrasol, Gelucire 48/16 e Tefose 63 foram doados por Gattefossé (Nanterre, França). Os co-tensoativos Compritol 888ATO e Transcutol HP foram cedidos por Gattefossé (Nanterre, França) e Renex PEG 400 foram adquiridos de Croda (Campinas, Brasil). O metanol utilizado para a curva de solubilidade foi adquirido de Sigma-Aldrich (St, Louis, MO). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Metodologia

A metodologia adotada neste trabalho foi dividida em oito etapas principais começando na escolha dos componentes para a produção dos SEDDS até à avaliação da sua eficácia no tratamento de *S. venezuelensis in vivo* (figura 2).

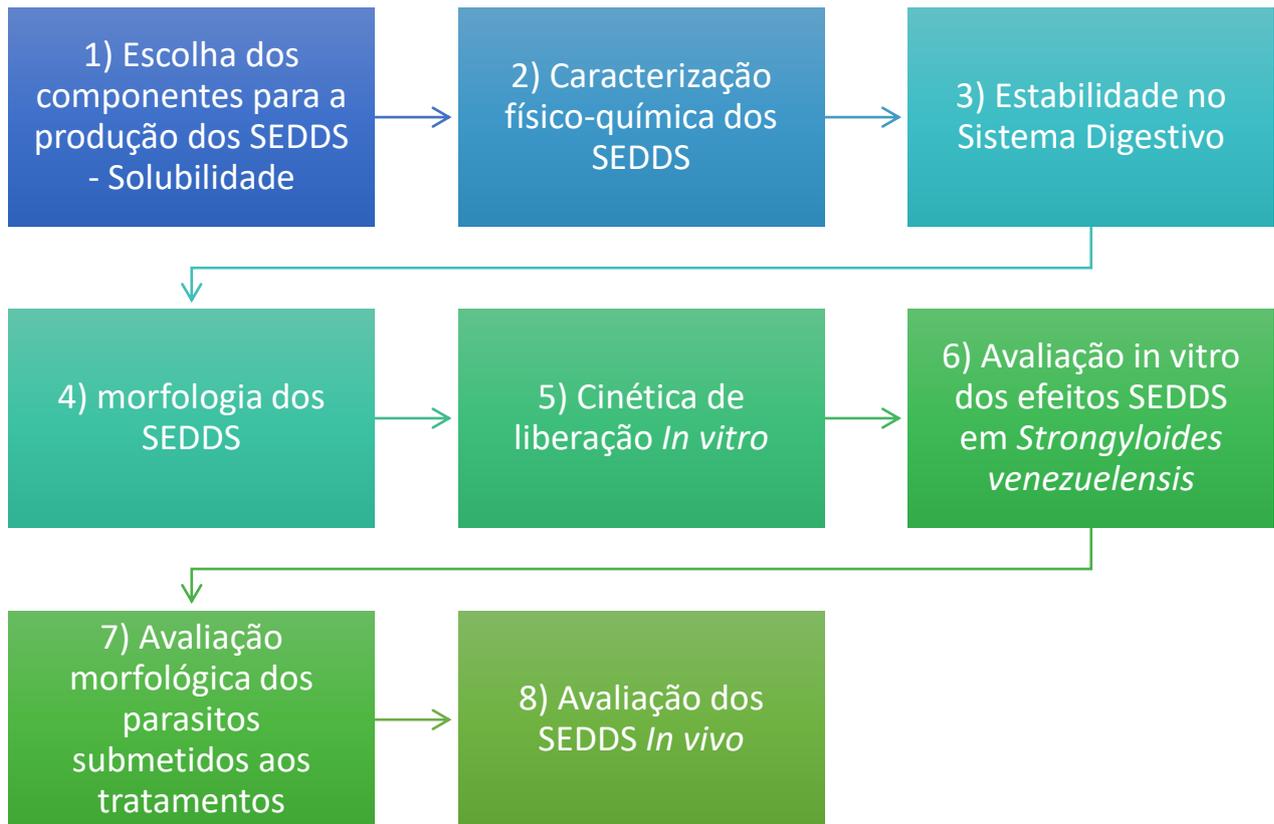


Figura 2 – Fluxograma da metodologia para produção de SEDDS e sua avaliação

4.2.1 Escolha dos componentes para a formulação dos SEDDS

Para a seleção dos componentes que compõem uma formulação, vários fatores são levados em conta, sendo capacidade de solubilizar ivermectina (ensaio de dissolução) um dos mais importantes. Para avaliar a quantidade máxima de fármaco que é solubilizada por cada componente, faz-se necessário a elaboração de uma curva de calibração com a ivermectina solubilizada em um solvente orgânico, e a partir desta curva, quantificar a ivermectina presente em cada um dos possíveis componentes da formulação.

4.2.1.1 Curva de calibração

Foi obtida uma curva de calibração da concentração de ivermectina por espectrofotometria UV-Vis utilizando uma solução de 0,2 mg/mL de ivermectina em metanol (Chomwal e Goyal, 2013). Inicialmente foi realizado uma varredura em

espectrofotômetro UV-Vis (Genesys 6, Thermo Scientific), onde foi observado um pico a 245 nm, conforme descrito por Campbell (1989), Dal Bosco (2012) e Ghandi et al. (2010). A linha de tendência foi obtida no Software Microsoft Excel 2013®, e ajustada aos pontos uma regressão linear entre os valores de absorvância e concentração, com um índice de correlação de Pearson, incluindo valores de absorvância entre 0 e 1 em 5 concentrações diferentes (ANVISA, 2003).

4.2.1.2 Ensaio de Dissolução

As fases oleosas, os tensoativos e os co-tensoativos (tabela 2) foram avaliados quanto à sua capacidade de solubilizar a ivermectina, sendo este um pré-requisito para a seleção de possíveis componentes para a formação dos SEDDS, principalmente das fases oleosas com maior capacidade de solubilização.

Tabela 2 – Óleos (fase oleosa), tensoativos e co-tensoativos testados para a produção de SEDDS

Óleos	Tensoativos	Co-tensoativos
Algodão	Cithrol GMS 40	Transcutol HP
Amendoim	Cithrol DGMS	Compritol 888ATO
Gergelim	Brij CS12	Renex PEG 400.
Labrafac Lipophile	Adinol CT95	
Labrafac PG	Cirrasol G1284	
Oliva	Cithrol 10MS	
Peceol	Labrafil M1944CS	
Rícino	Labrafil M2130	
	Labrasol	
	Gelucire 48/16	
	Tefose 63	

A dissolução da ivermectina nas fases oleosas, tensoativos e co-tensoativos foi determinada individualmente, conforme metodologia adaptada de Cui et al. (2009). Foi adicionada 0,1 g de ivermectina a 5 mL de cada óleo, tensoativo ou co-tensoativo e homogeneizados em Vortex (Phoenix AP-56) durante 1 minuto e submetidos à agitação constante em shaker orbital (Tecnal TE039i) a 300 rpm durante 72 horas a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm (11773 G ou

RCF) por 10 minutos (Centrífuga Eppendorf 5415-C) e filtradas em membrana de acetato-celulose (Millipore 0,45 μm). A leitura do filtrado foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS, utilizando como padrão a curva de calibração descrita no item anterior a fim de quantificar a ivermectina solubilizada no componente analisado. Uma amostra contendo a mesma quantidade de cada componente, porém sem a ivermectina, foi utilizada como branco e o solvente para a solubilização e posterior leitura foi o mesmo utilizado na curva de calibração (metanol).

4.2.2 Caracterização físico-química dos SEDDS

4.2.2.1 Estabilidade das formulações

Após selecionados os componentes a partir de suas características de solubilização da ivermectina (as fases oleosas e os co-tensoativos com maior capacidade de dissolução) e tensoativos com uma maior, intermediária e menor capacidade de solubilização, foram realizados ensaios referentes à estabilidade das possíveis combinações entre fase oleosa, tensoativo e co-tensoativos.

Essa estabilidade considerou a separação ou não de fases em solução aquosa, turbidez (visualmente) e o diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta das partículas formadas em *Dymanic Light Scattering* (DLS).

Para as fases oleosas selecionou-se Peceol, Labrafac Lipophile e Labrafac PG. Como tensoativos selecionaram-se Labrafil M2130, Brij CS12 e Gelucire 48/16 e como co-tensoativos selecionaram-se Compritol 888ATO, Transcutol HP e Renex PEG 400.

A fim de obter uma solução (fase oleosa + fase aquosa, estabilizada com tensoativos e co-tensoativos) contendo partículas em escala nanométrica, os componentes da formulação foram avaliados quanto à ausência de separação de fases e a formação de uma solução translúcida. As combinações testadas foram descritas na tabela 3.

A fim de obter uma formulação estável com uma menor quantidade de tensoativos, os componentes foram avaliados em diferentes concentrações. As proporções utilizadas de fase oleosa, tensoativo e co-tensoativo foram, respectivamente, 40:42:18; 30:49:21; 20:56:24; 10:63:27 e 5:67:28. Após a adição da

água Milli-Q (100 mL para cada 10 mL do total dos componentes, submeteu-se a agitação suave (8 RPM) em um homogeneizador de tubos (Fanem, modelo 270-T), durante 2 horas. Após 24 horas foi observado o aspecto das formulações, a manutenção das fases ou a sua separação.

Tabela 3 – Formulações de SEDDS (fase oleosa + tensoativo + cotensoativo) testadas.

	Fase oleosa	Tensoativo	Co-tensoativo
SEDDS 1	Peceol	Labrafil M 2130	Compritol 888 ATO
SEDDS 2	Peceol	Brij CS12	Transcutol HP
SEDDS 3	Peceol	Brij CS12	Renex PEG 400
SEDDS 4	Peceol	Gelucire 48/16	Transcutol HP
SEDDS 5	Peceol	Gelucire 48/16	Renex PEG 400
SEDDS 6	Peceol	Labrafil M 2130	Transcutol HP
SEDDS 7	Peceol	Labrafil M 2130	Renex PEG 400
SEDDS 8	Labrafac PG	Labrafil M 2130	Compritol 888 ATO
SEDDS 9	Labrafac PG	Brij CS12	Transcutol HP
SEDDS 10	Labrafac PG	Brij CS12	Renex PEG 400
SEDDS 11	Labrafac PG	Gelucire 48/16	Transcutol HP
SEDDS 12	Labrafac PG	Gelucire 48/16	Renex PEG 400
SEDDS 13	Labrafac PG	Labrafil M 2130	Transcutol HP
SEDDS 14	Labrafac PG	Labrafil M 2130	Renex PEG 400
SEDDS 15	Labrafac Lipophile	Labrafil M 2130	Compritol 888 ATO
SEDDS 16	Labrafac Lipophile	Brij CS12	Transcutol HP
SEDDS 17	Labrafac Lipophile	Brij CS12	Renex PEG 400
SEDDS 18	Labrafac Lipophile	Gelucire 48/16	Transcutol HP
SEDDS 19	Labrafac Lipophile	Gelucire 48/16	Renex PEG 400
SEDDS 20	Labrafac Lipophile	Labrafil M 2130	Transcutol HP
SEDDS 21	Labrafac Lipophile	Labrafil M 2130	Renex PEG 400

4.2.2.2 Diâmetro médio e Potencial Zeta

O diâmetro médio e potencial zeta foram determinados pelo método DLS - *Dynamic Light Scattering* (modelo ZetaSizer Nano ZS, Malvern) utilizando 1 mL de cada formulação de SEDDS diluído na proporção 1:100 em água Milli-Q.

4.2.3 Estabilidade no Sistema Digestivo

Após a seleção das composições mais estáveis (que não apresentaram separação de fases, com menor tamanho de partículas e baixo índice de

polidispersidade), considerando que a sua administração será via oral, a estabilidade das diferentes formulações de (SEDDS) foi avaliada quando exposta a fluidos gastrintestinais.

Quando expostos ao pH extremamente baixo e as enzimas presentes no estômago, deseja-se que a partícula de SEDDS formada seja estável o suficiente para não liberar o fármaco nesse trajeto, pois sua absorção se dá no intestino.

Dentre as 21 possíveis combinações de fases oleosas, tensoativos e co-tensoativos em diferentes concentrações, as selecionadas para prosseguirem com os ensaios por serem as melhores avaliadas foram: Peceol + Brij CS12 + Transcutol HP (foi a 2ª. avaliada, indicada como “SEDDS 2”) e Labrafac Lipophile + Gelucire 48/16 + Renex PEG 400 (foi a 19ª. avaliada, indicada como “SEDDS 19”), ambas na proporção de fase oleosa, tensoativo e co-tensoativo 10:63:27, respectivamente. Esta proporção foi escolhida por apresentar menor separação de fases e turbidez no ensaio de estabilidade das formulações.

A estabilidade foi avaliada comparando o tamanho e a polidispersidade das partículas dos SEDDS submetidas aos fluidos gástrico e intestinal simulados e em água (solução).

4.2.3.1 Ensaio de estabilidade gastrintestinal

Uma vez que os fármacos podem interagir com os fluidos gástricos e intestinais e, em consequência, sofrer alterações estruturais, foi realizado um ensaio de estabilidade. Formulações selecionadas de SEDDS foram submetidas à ação de fluidos gástrico e intestinal simulados sugeridos pela United States Pharmacopeia 33-28NF/2010, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4 – Composição dos Fluidos Gástrico e Intestinal Simulados, de acordo com McClements e Li (2010)

Fluído Gástrico Simulado	
NaCl	0,032 g
Pepsina	0,05 g

HCl 1N		1,4 mL
Água Milli-Q		6,6 mL
pH a 25°C		1,2
Fluído Intestinal Simulado		
A	KH ₂ PO ₄	0,11 g
	Água Milli-Q	4 mL
B	NaOH	0,01 g
	Água Milli-Q	9,23 mL
C	Pancreatina	0,32 g
	A+B+C	
	Água Milli-Q	2,77 mL
	pH a 25°C	6,8

A concentração de SEDDS utilizado no ensaio foi de 0,1:100 e o tempo de digestão utilizado foi o sugerido por Minekus et al. (2014). As formulações foram submetidas à agitação suave (8 RPM) e distribuídas conforme tabela 5.

Tabela 5 – Descrição dos tempos e temperatura de digestão dos solventes utilizados para o ensaio de estabilidade gastrointestinal.

Grupo	Solvente	Tempo	Temperatura
A	Água	2 horas	37°C
B	Fluído Gástrico Simulado	2 horas	37°C
C	Grupo B (após as 2 horas e filtrado em 0,45µm) + Fluído Intestinal Simulado	2 horas	37°C
D	Água	4 horas	37°C

Após a digestão, as formulações foram avaliadas em relação ao diâmetro médio e polidispersidade das partículas.

4.2.4 Morfologia dos SEDDS

A caracterização morfológica das partículas formadas nos SEDDS 2 e SEDDS 19, foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão. A proporção utilizada foi a de 10:63:27 (fase oleosa:tensoativo:co-tensoativo), uma vez que foi a proporção mais estável no ensaio de estabilidade das formulações. Alíquotas de 50 µL de cada SEDDS em solução (10 µg/mL de ivermectina) foram adicionadas em grades de cobre

de 300 mesh com filme-suporte de parlódio 1%. A contrastação negativa foi realizada com solução de acetato de uranila 2% e as imagens obtidas com o microscópio eletrônico de transmissão modelo LEO-906 (Carl Zeiss) a 60 kV.

4.2.5 Cinética de liberação *in vitro*

A fim de estimar o tempo *in vitro* para a liberação do princípio encapsulado, foi realizado um ensaio de liberação, onde as SEDDS 2 e SEDDS 19 nas proporções de 10:63:27 (fase oleosa:tensoativo:co-tensoativo) foram acondicionadas em membranas de diálise de 3500 dalton (Spectrum®, mod. 132725) conforme a Tabela 6. A proporção foi utilizada devido à maior estabilidade observada em ensaios anteriores,

Tabela 6. Descrição dos meios utilizados no ensaio de liberação. No meio de liberação o próprio co-tensoativo em concentração maior para a solubilização da ivermectina e posterior leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 245 nm.

SEDDS 2		SEDDS 19	
Meio doador	Meio de liberação	Meio doador	Meio de liberação
7 mg Ivermectina	198,9 mL água Milli-Q	7 mg Ivermectina	265,74 mL água Milli-Q
134 µL Peceol	10,86 mL Transcutol	172 µL Labrafac Lipophile	15,36 mL Renex PEG 400
844 µL Brij CS12		1083,6 µL Gelucire 48/16	
362 µL Transcutol HP		464,4 µL Renex PEG 400	
13,26 mL água Milli-Q		17,02 mL água Milli-Q	

A cada intervalo de tempo (6 horas, 12 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias e 6 dias), 1 mL do meio de liberação era coletada para a análise da concentração da ivermectina liberada através de espectrofotometria UV/Vis. Esse ensaio foi realizado em triplicata e calculado o desvio padrão das leituras. Para evitar qualquer degradação no meio de liberação, este foi substituído a cada 24 horas, uma vez que a ivermectina livre é estável somente por 33 horas (Camargo et al., 2010).

4.2.6 Avaliação *in vitro* do efeito de SEDDS em *Strongyloides venezuelensis*

Após a caracterização e seleção das melhores formulações (SEDDS 2 e SEDDS 19), foram realizados os ensaios *in vitro* com o intuito de testar a atividade contra *S. venezuelensis*.

Modelo experimental

Como modelo experimental para os testes *in vitro*, foram utilizadas fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* mantidas no laboratório de Biologia Animal/Parasitologia da Unicamp em *Rattus norvegicus* machos, linhagem Wistar com 30 dias de idade, oriundos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (Cemib-Unicamp) com aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Unicamp (protocolo: 4400-1/2016, Anexo 3).

Infecção do modelo animal

Larvas filarióides (L3) foram obtidas por coprocultura. Para esse efeito, foram coletadas fezes de ratos previamente infetados com *S. venezuelensis*. As fezes foram maceradas e homogeneizadas com água deionada, sendo em seguida adicionado carvão animal numa proporção 1:2 (fezes:carvão) e incubados numa estufa a 27° C por 48 h.

As larvas foram isoladas utilizando a técnica de Rugai, Matos, Brisola. (1954). Os ratos foram infectados por injeções subcutâneas contendo aproximadamente 1500 larvas L3 na região do abdômen.

Coleta de fêmeas parasitas

Após eutanásia, os ratos foram dissecados. Uma porção do intestino delgado do animal de aproximadamente 15 cm foi seccionada e aberta longitudinalmente para exposição da mucosa intestinal (figura 3). Esse segmento foi lavado com solução fisiológica para retirada de sujidades e transferido para placa de Petri contendo meio RPMI 1640 e mantido em estufa a 37° C por um período de 1 hora. Após esse período

as fêmeas livres no meio de cultura foram coletadas e lavadas 3 vezes em meio RPMI e foram colocadas 2 fêmeas por poço de placas de cultura de 24 poços.



Figura 3: Secção longitudinal de um fragmento de 15 cm do intestino delgado do hospedeiro para obtenção de fêmeas parasitas.

Ensaio *in vitro*

Os parasitos foram acondicionados em placas de cultura de 24 poços contendo meio de cultura RPMI 1640 suplementado com streptomomicina/pinincilina 0.01%, conforme descrito anteriormente. Foram realizados ensaios com quatro concentrações diferentes de ivermectina encapsulada (120, 60, 30 e 15 ug/mL) e respetivo controles (partícula sem o fármaco, apenas os tensoativos e apenas o meio de cultura). Cada concentração testada em 6 fêmeas sendo realizadas duas repetições (n=12). As placas foram incubadas a 37° C numa atmosfera de 5% de CO₂. Foram realizadas observações quanto à motilidade e mortalidade após 12, 24, 48 e 72 horas.

Para cada SEDDS, foram avaliados a atividade em diferentes proporções de componentes da formulação, sendo a) 30:49:21; b) 20:56:24 e c) 10:63:27 (proporção fase oleosa:tensoativo:co-tensoativo).

4.2.7 Morfologia dos parasitos submetidos ao tratamento com SEDDS 2 e SEDDS 19

Após o ensaio *in vitro*, foram coletados os parasitos logo que observado sua morte e submetidos ao processo de fixação para análise por microscopia eletrônica

de varredura, a fim de observar possíveis alterações morfológicas e estruturais decorrentes do tratamento.

Para a fixação dos parasitas, foi utilizado o fixador Karnovsky (5 mL de Glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M adicionado à 5 mL de Formaldeído 4% diluído no mesmo tampão). As amostras permaneceram em fixação por 48 horas, e a pós-fixação foi realizada utilizando Tetróxido de Ósmio 2% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 10 minutos e seguido por mais 3 trocas de tampão a cada 10 minutos a fim de remover todo o Tetróxido de Ósmio que não estiver aderido à amostra (Hayat, 1970).

Em seguida, as amostras foram desidratadas em Etanol em concentrações crescentes de 50%, 70%, 95%, 100% e 100% em intervalos de 10 minutos cada. Na última concentração (100%) as amostras permaneceram 15 minutos em etanol. A secagem das amostras se deu por Ponto Crítico (Modelo CPD-030, Balzers) e a metalização em ouro foi realizada em equipamento *Sputter Coater* (SCD-050, Balzers) (Hayat, 1970, Bozzola et al., 1999; Souza, 2007).

A obtenção de imagens de microscopia eletrônica de varredura foi realizada por equipamento modelo JSM 5800LV (Jeol). Os equipamentos acima utilizados pertencem ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

4.2.8 Avaliação de SEDDS 2 e SEDDS 19 *in vivo*

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) linhagem Balb/c AnUnib obtidos do CEMIB-Unicamp Unicamp e com aprovação da CEUA-Unicamp (protocolos: 4400-1/2016 e 4400-1^a/2017, Anexo 3). Larvas filarióides de *S. venezuelensis* foram obtidas por coprocultura como descrito anteriormente. Camundongos fêmeas com 30 dias de idade foram infectados com 1500 larvas via subcutânea e separados em 8 grupos contendo 10 animais cada (tabela 7).

Tabela 7 – Descrição dos grupos experimentais do ensaio *in vivo*

Grupo	Nome	Descrição
Grupo 1	Controle da infecção	Camundongos infectados e sem tratamento
Grupo 2	Controle farmacológico	0,2 mg/kg de ivermectina
Grupo 3	SEDDS 2	0,1 mg/kg de ivermectina encapsulada em SEDDS 2 na proporção 10:63:27
Grupo 4	SEDDS 2 vazia	SEDDS 2 na proporção 10:63:27 sem ivermectina (controle da formulação)
Grupo 5	SEDDS 19	0,1 mg/kg de ivermectina encapsulada em SEDDS 19 na proporção 10:63:27
Grupo 6	SEDDS 19	SEDDS 19 na proporção 10:63:27 sem ivermectina (controle da formulação)
Grupo 7	Componentes do SEDDS 19 sem Renex PEG 400 com ivermectina	0,1 mg/kg de ivermectina encapsulada em Labrafac Lipophile e Gelucire 48/16 na proporção 86:14
Grupo 8	Componentes do SEDDS 19 sem Renex PEG 400	Labrafac Lipophile e Gelucire 48/16 na proporção 86:14

O tratamento dos camundongos foi realizado via gavagem, em dose única, 48 h após a infecção. Após a administração do fármaco, diariamente, foram coletadas fezes de cada animal e o número de ovos foi contado utilizando a técnica de McMaster (Gordon e Whitlock, 1939). A contagem foi feita até não serem encontrados mais ovos nas fezes. Todas as contagens foram realizadas em triplicata e calculada média e desvio padrão.

4.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 7.

Os resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) comparando as médias dos diferentes tratamentos, onde os resultados foram considerados significativamente diferentes se $p < 0,05$.

Com o intuito de saber se a redução do número de ovos nas fezes no ensaio in vivo estava relacionada com a liberação do fármaco, foi utilizado o teste de correlação não paramétrico de Spearman, onde, se significativo ($p < 0.05$), $r > |0,9|$ representa uma correlação muito forte; $|0,7| > r > |0,9|$ representa uma correlação forte; $|0,5| > r > |0,7|$ representa uma correlação moderada e $r < |0,5|$ representa uma correlação fraca a desprezível. Valores negativos de r representam uma correlação negativa, ou seja, quando um valor aumenta outro diminui.

Os gráficos foram realizados utilizando o programa Excel (Microsoft Office) e o programa GraphPad Prism 7.

5 Resultados e Discussão

5.1 Quantificação de ivermectina por espectrofotometria UV/Vis

5.1.1 Curva de calibração

A figura 4 mostra a curva de calibração obtida para a determinação da concentração de ivermectina. Os dados de concentração *versus* absorvância apresentaram uma boa correlação linear, com coeficiente de determinação $R^2=0,9841$.

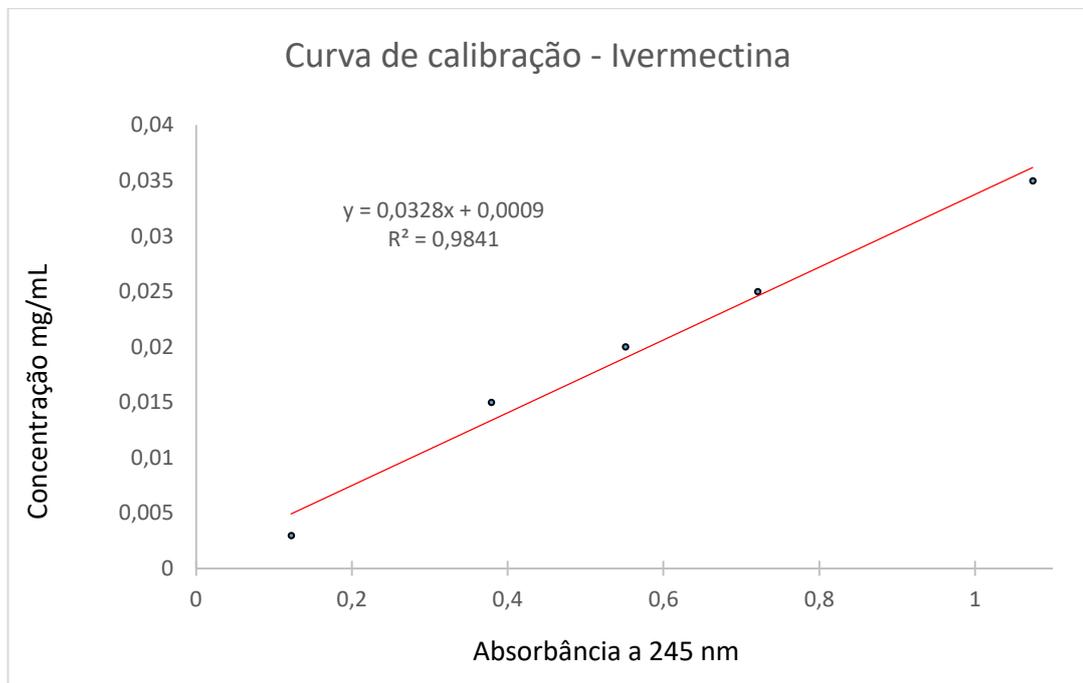


Figura 4. Curva de calibração da ivermectina no comprimento de onda 245 nm. No eixo Y a concentração do fármaco em mg/mL.

5.1.2 Ensaio de Dissolução

As fases oleosas que apresentaram maior capacidade de solubilização da ivermectina foram Labrafac Lipophile (40 mg/mL), Labrafac PG (40,9 mg/mL) e Peceol (54 mg/mL), os quais foram selecionados para os ensaios subseqüentes, uma vez que pretendeu-se manter o fármaco no interior da partícula, solubilizado no óleo (Figura 5).

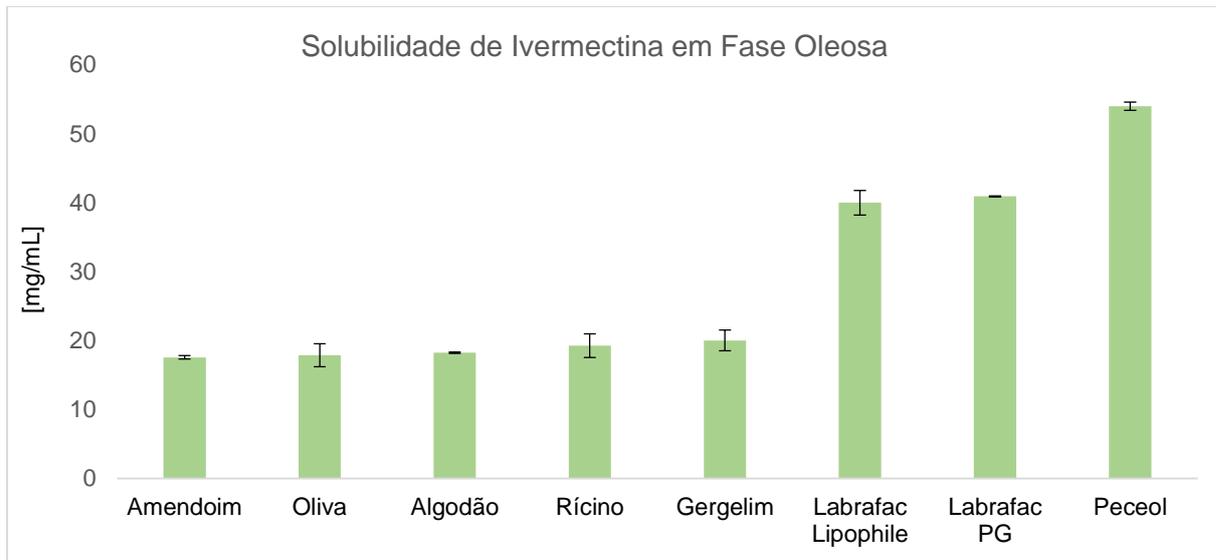


Figura 5. Capacidade de Solubilização da ivermectina nas fases oleosas avaliadas. Valores em mg/mL (n=5 e desvio padrão).

Buyukozturk et al. (2013) relata a importância da escolha das fases oleosas na solubilização de fármacos, uma vez que estes são essenciais não somente pela dissolução, mas também pela facilitação do transporte dos fármacos lipofílicos pelas vias linfáticas. É consenso que se buscam alternativas para compor formulações com menores custos e com óleos já utilizados na indústria de alimentos, como os de origem vegetal (Savale, 2015). No entanto, esses óleos geralmente apresentam pouca capacidade de solubilizar quantidades significativas da maioria dos fármacos lipofílicos e realizar uma emulsificação eficiente, sendo as fases oleosas sintéticas e semi-sintéticas utilizadas em diversos casos (Pujara, 2012).

Os tensoativos e co-tensoativos também foram selecionados a partir de sua capacidade de solubilizar a ivermectina, onde foram selecionados tensoativos que solubilizaram maior quantidade do fármaco (Gelucire 48/16), menor (Labrafil M2130) e um tensoativo com valor intermediário de solubilização (Brij CS12) (Figura 5). Os Co-tensoativos selecionados foram os dois com maior capacidade de solubilização (Transcutol HP e Renex PEG 400) e o co-tensoativo com menor capacidade de solubilização (Compritol 888ATO) (Figura 6).

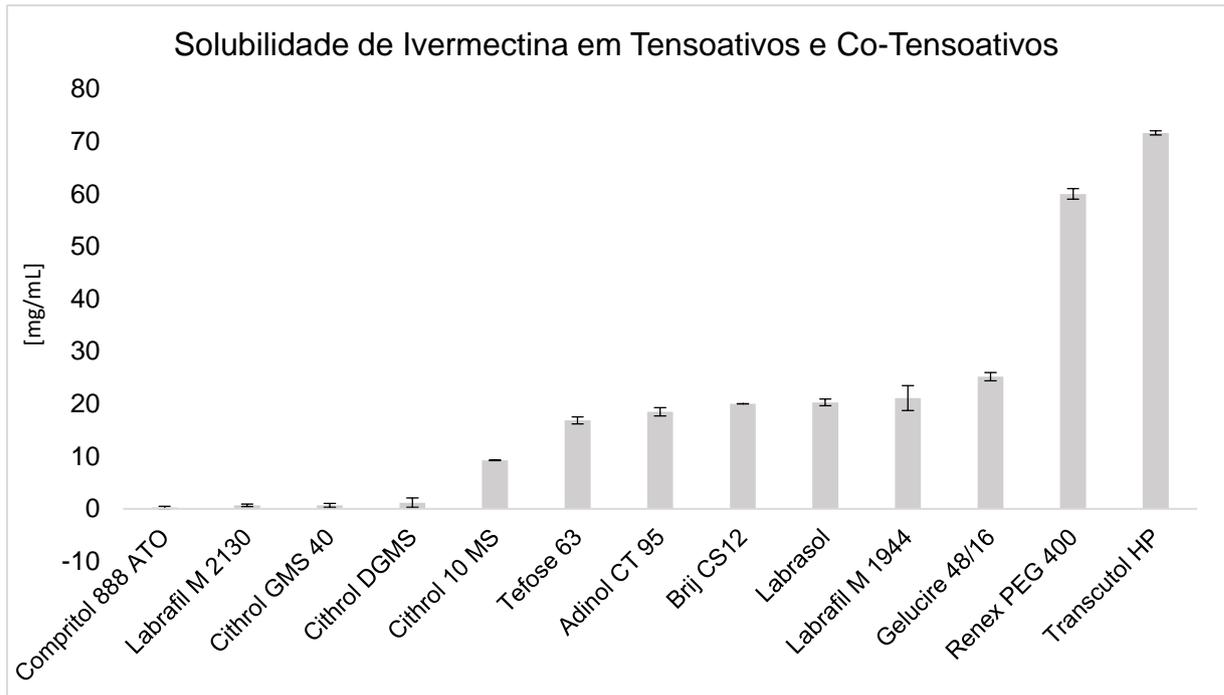


Figura 6. Capacidade de Solubilização da ivermectina nos tensoativos e co-tensoativos. Valores em mg/mL (n=5 e desvio padrão)

Mohsin et al. (2012) sugere que as formulações de SEDDS apresentem a menor quantidade possível de tensoativo, rondando até 60% do total de componentes, uma vez que podem causar irritações gástricas, além de serem preferencialmente formulados utilizando tensoativos não iônicos, como os utilizados neste trabalho, uma vez que estes apresentam menor toxicidade e provocam alterações temporárias de permeabilidade da mucosa intestinal (Gursoy e Benita, 2004).

Outra dificuldade na escolha do tensoativo/co-tensoativo é o baixo número aceitos e aprovados para formulações orais, sendo este um fator determinante para a escolha dos tensoativos das formulações (Cerpnjak et al., 2013).

5.1.3 Estabilidade das formulações

A partir dos resultados do ensaio de dissolução, onde foram selecionados as fases oleosas com maior capacidade de solubilização da ivermectina (Peceol, Labrafac PG e Labrafac Lipophile), tensoativos com diferentes capacidades de solubilização do fármaco (Labrafil M2130, Brij CS12 e Gelucire 48/16) e Co-tensoativos (Compritol 888ATO, Transcutol HP e Renex PEG 400), foram submetidos ao ensaio de estabilidade. Também a fim de encontrar uma formulação estável e com

a menor quantidade de tensoativo, diferentes proporções de fase oleosa:tensoativo:co-tensoativo foram avaliadas (40:42:18; 30:49:21; 20:56:24; 10:63:27 e 5:67:28, respectivamente).

As formulações mais estáveis (sem separação de fases) e com menor turbidez (provável tamanho menor de partículas), foram as amostras 2 (Peceol, Brij CS12 e Transcutol HP) e 19 (Labrafac Lipophile, Gelucire 48/16 e Renex PEG 400), sendo as mais estáveis aquelas com maiores concentrações de tensoativos e co-tensoativos (Figura 7). Portanto, com o objetivo de utilizar a menor quantidade possível de tensoativos nas formulações, foram selecionadas as formulações SEDDS 2 e 19 na proporção 10:63:27 (Figura 7.A IV e 6.B IV).

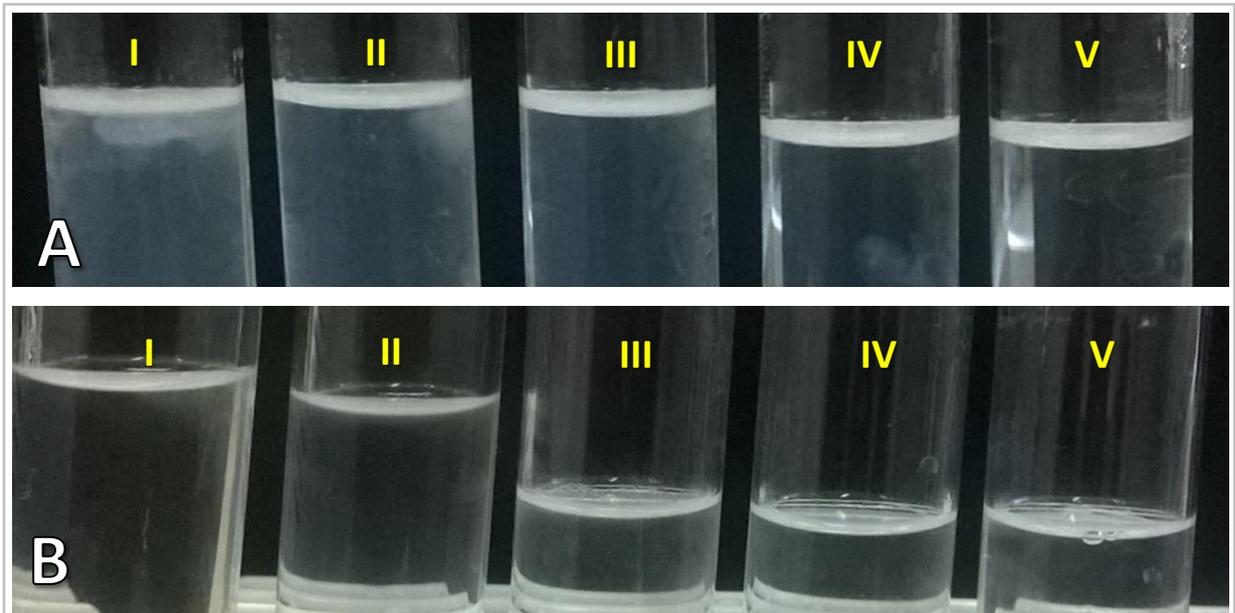


Figura 7. Ensaio de estabilidade. A) SEDDS 2 – Peceol, Brij CS12 e Transcutol HP nas proporções: I) 40:42:18, II) 30:49:21, III) 20:56:24, IV) 10:63:27 e V) 5:67:28. B) SEDDS 19 – Labrafac Lipophile, Gelucire 48/16 e Renex 400 PEG, nas mesmas proporções citadas para o SEDDS 2.

5.1.4 Diâmetro médio e Potencial Zeta

O diâmetro médio em termos de Z-average, o índice de polidispersidade e o potencial zeta são apresentados na Tabela 8. Tanto o SEDDS 2 quanto o SEDDS 19 apresentaram valores de Z-Average próximos (63,17 e 52,93 nm, respectivamente),

indicando um tamanho nanométrico que pode apresentar vantagens em relação à sua absorção no cólon intestinal, uma vez que uma partícula sendo menor, maior a área de superfície de contato com o sítio de absorção.

Tabela 8. Valores de diâmetro médio (Z-Average - nm), Índice de Polidispersidade (PDI) e Potencial zeta (mV)

SEDDS	Z-Average	PDI	Potencial Zeta
2	63,17	0,435	-12,4
19	52,93	0,401	-11,1

Os valores de Potencial Zeta obtidos indicam, em ambas as formulações, que a carga exposta ao meio é negativa e de baixa intensidade. Essas características conferem às partículas estabilidade moderada quanto à agregação, e baixa repulsão em relação à membrana intestinal, também negativa, não prejudicando expressivamente sua interação eletrostática. No entanto é possível que outros fatores, como a composição da formulação, por exemplo, afetem também sua capacidade de mucoadesão (Bogataj et al., 2004).

A figura 8 mostra as distribuições populacionais dos diâmetros das partículas de SEDDS 2 e SEDDS 19, em termos de intensidade de luz espalhada, distribuição I, cuja intensidade é proporcional ao diâmetro elevada à sexta potência ($I \propto d^6$). Essa distribuição fornece nos seus picos todos os diâmetros presentes na amostra, a partir dos quais são calculados o diâmetro médio (Z-average) e o índice de polidispersidade (PDI). Portanto, em ambas as amostras estão presentes populações com diâmetros da ordem de 6-10 nm, 70 nm e 2500 nm, resultando em polidispersidade média da ordem de 0,4.

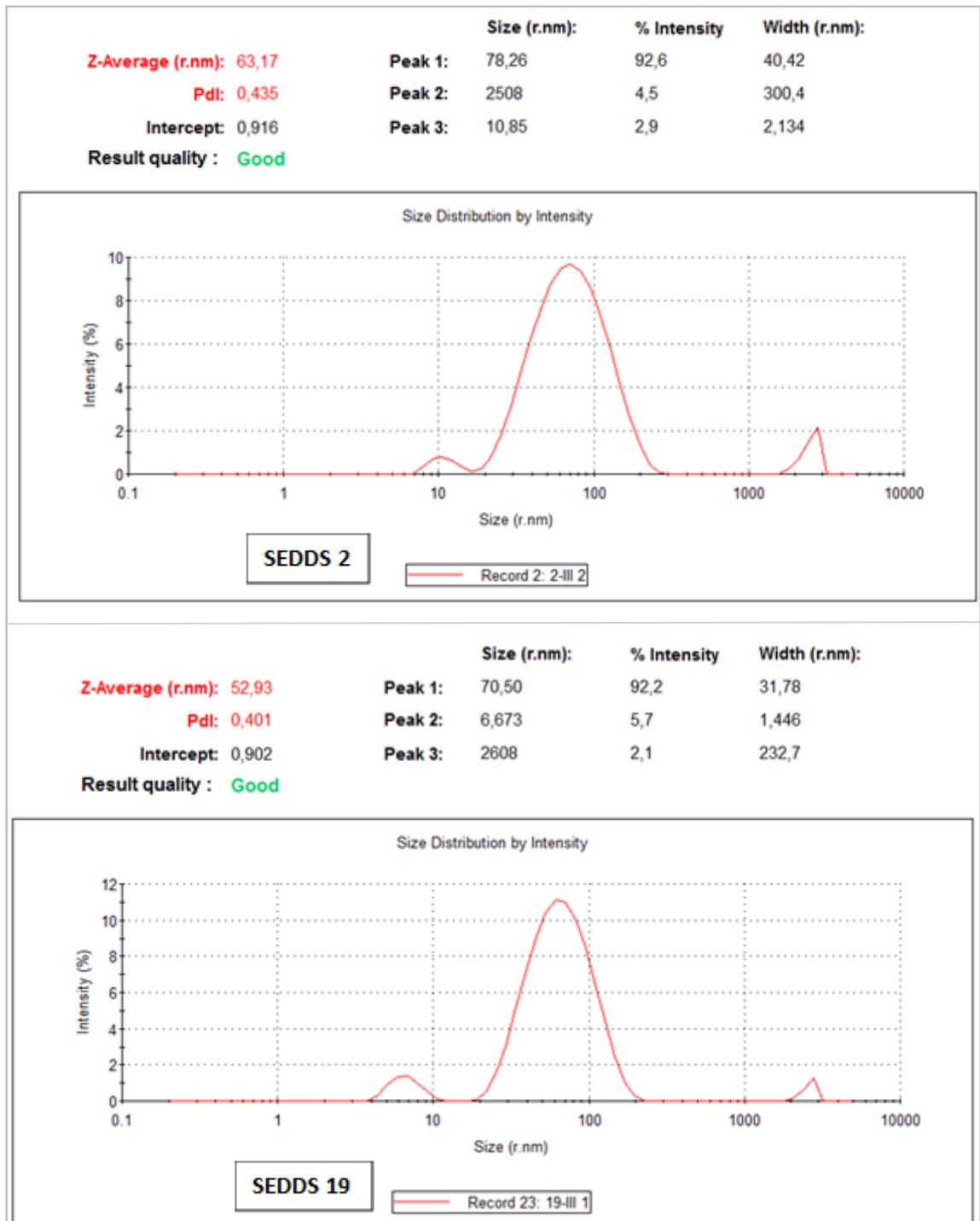


Figura 8. Diâmetro médio e Índice de Polidispersão de SEDDS 2 e SEDDS 19.

5.2 Estabilidade dos SEDDS nos Fluídos Gástrico e Intestinal Simulados

A figura 9 apresenta os resultados do ensaio de estabilidade gastrointestinal, onde é evidente o tamanho maior das partículas mesmo quando somente submetida aos meios simulados sob agitação suave. Tal fato pode estar relacionado com a agregação devido à exposição aos ambientes gástrico e intestinal. Comparando os controles, observa-se que as partículas permaneceram íntegras durante 2 e 4 horas em água. Quando expostas ao fluido gástrico, a formulação SEDDS 2 foi sensível, enquanto que a SEDDS 19 não sofreu alteração. A maior alteração foi observada no efeito cumulativo de exposição nos fluídos gástrico (2 horas) e intestinal (mais 2 horas), a qual foi semelhante para ambas as formulações. Portanto, as formulações, principalmente a SEDDS 2, devem ser administradas em cápsulas gastrorresistentes a fim de reduzir os efeitos de instabilidade.

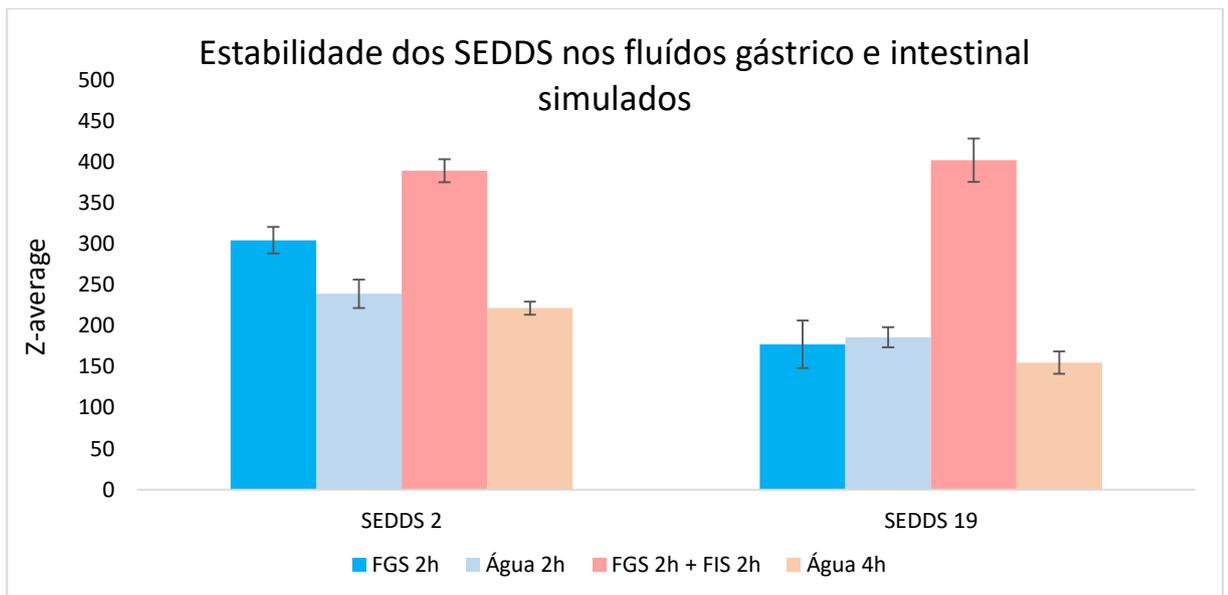


Figura 9. Ensaio de estabilidade dos SEDDS 2 e 19 frente aos fluídos gástrico (FGS) e intestinal (FIS) simulados. Relação entre o Z-average das partículas e o tempo de exposição aos fluídos (n=3 e desvio padrão)

5.3 Morfologia dos SEDDS por microscopia eletrônica de transmissão

As imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de transmissão corroboram com os resultados obtidos por DLS. Na figura 10, as partículas formadas

com o SEDDS 2 apresenta tamanho próximo a 100 nm, confirmando o resultado do ensaio DLS, no qual o diâmetro médio predominante das partículas foi de 78 nm. O mesmo se observa na imagem de microscopia do SEDDS 19, com tamanho próximo ao observado em DLS, de aproximadamente 70 nm.

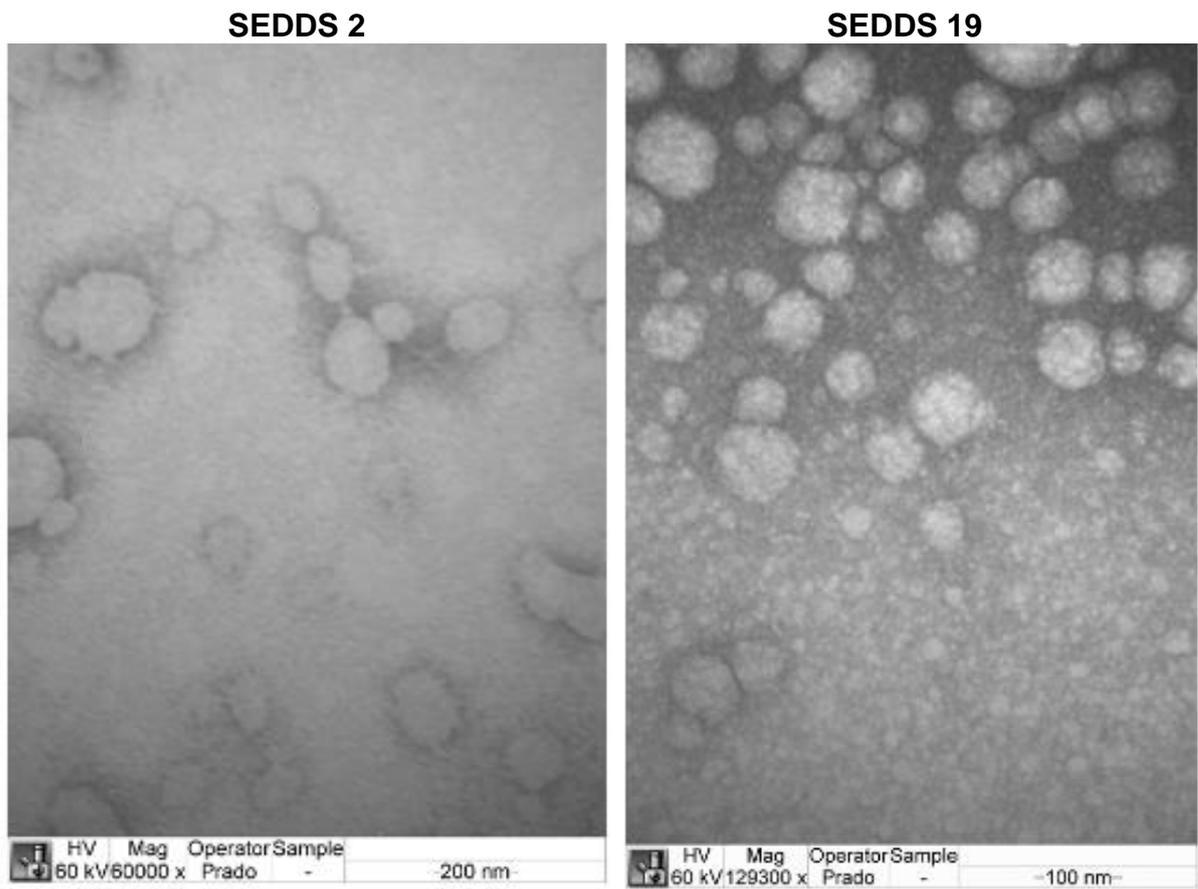


Figura 10. Imagens das partículas SEDDS 2 e SEDDS 19 obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, operado em 60 kV e em magnificação de 60000 a 129300x.

5.4 Cinética de liberação *in vitro*

5.4.1 Ensaio de liberação

A liberação da ivermectina em ambas formulações (SEDDS 2 e SEDDS 19) foi bastante retardada, sendo que no intervalo entre o terceiro e o quinto dia foi quando houve maior liberação de ivermectina (Figura 11 A e B).

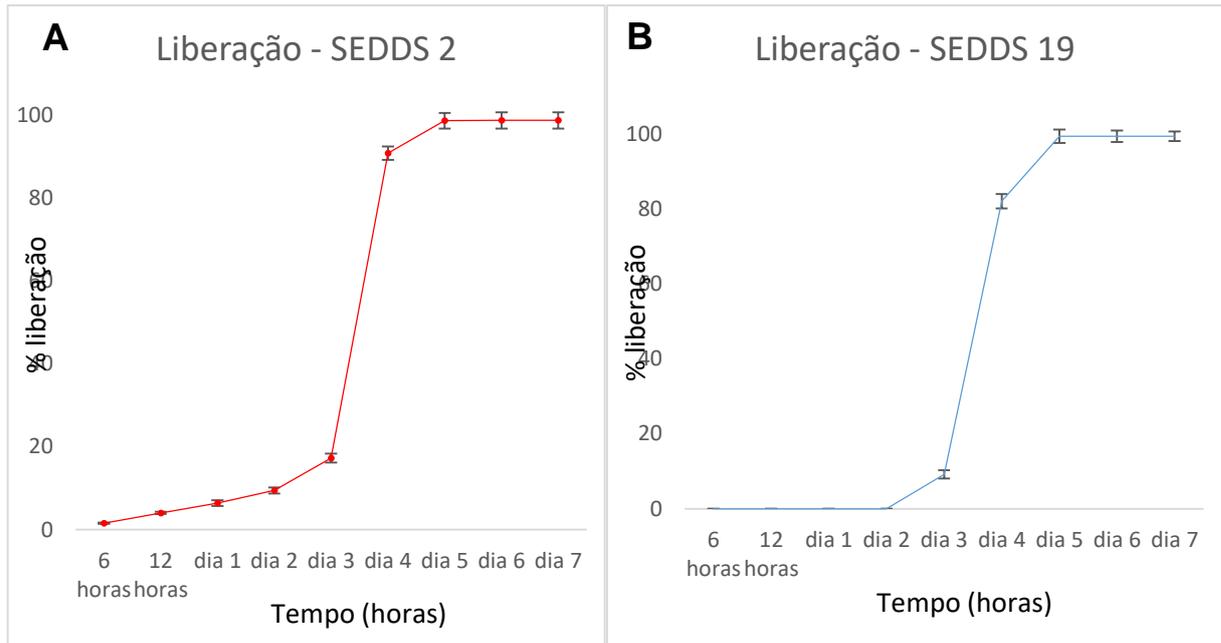


Figura 11. Perfil de liberação *in vitro* de SEDDS 2 (A) e SEDDS 19 (B). No eixo Y, os valores em porcentagem de liberação do fármaco. No eixo X, o tempo (n=3 e desvio padrão).

Os resultados obtidos para o SEDDS 2 sugerem que a liberação se iniciou nas primeiras horas, porém mantendo valores mínimos, onde quase a totalidade foi liberada entre o 4º. e o 5º. dia. Com relação ao SEDDS 19, a liberação iniciou-se apenas após 72 horas (3º. dia) e a maior parte foi liberada após as 96 horas (4º. dia).

Ambas as formulações apresentaram resultados semelhantes quanto à velocidade da liberação, mostrando uma liberação controlada e em tempo suficiente para as partículas alcançarem seu sítio de absorção, o cólon intestinal. Camargo et al. (2010) desenvolveram partículas poliméricas visando retardar a liberação da ivermectina, obtendo uma liberação lenta em algumas formulações avaliadas, conforme objetivava. Vários autores desenvolveram partículas e emulsões, utilizando diferentes metodologias e diferentes fármacos anti-helmínticos com o objetivo de liberar as partículas após um determinado intervalo de tempo para serem absorvidas no intestino (Baviskar et al., 2004; Emeje et al., 2009; Ghandi et al., 2010; Jain et al., 2004).

5.5 Ensaios biológicos

5.5.1 Avaliação dos SEDDS *In vitro* em *Strongyloides venezuelensis*

A ivermectina em sua forma livre apresentou pouca atividade nas 72 horas de duração do ensaio e em nenhuma das concentrações avaliadas foi observada morte de parasitos, nem foi observada nenhuma redução significativa de motilidade quando comparada com o grupo controle (Two-way ANOVA) (Figura 12). Camargo et al. (2010) relatam que a ivermectina é rapidamente liberada *in vitro* e tende a agregação, podendo nessas condições, tornar-se menos biodisponível, fato que explicaria os resultados *in vitro* diferentes do *in vivo*, uma vez que a ivermectina ainda é o fármaco mais eficaz contra a estrogiloidíase. Nas placas de cultura do presente trabalho foram observadas formação de cristais pela agregação do fármaco em todas as concentrações avaliadas.

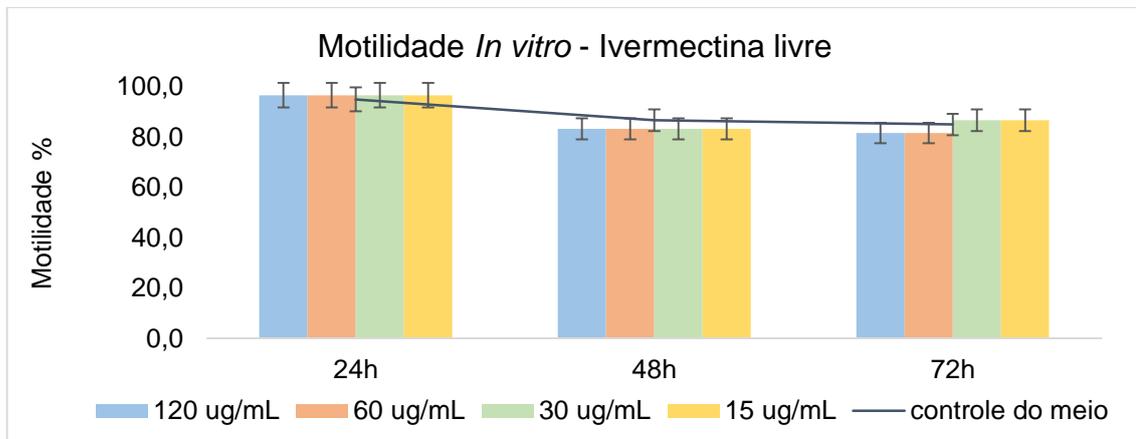


Figura 12. Ensaio de avaliação da motilidade *in vitro* de *Strongyloides venezuelensis* exposto a diferentes concentrações de ivermectina.

SEDDS 2 (Peceol, Brij CS12 e Transcutol HP) foi a formulação que apresentou melhor atividade no ensaio *in vitro* (Figura 13 e 15), em especial na proporção 10:63:27 utilizando a concentração de ivermectina de 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 72 horas de exposição registrou-se 100% de mortalidade dos parasitos (Figura 15). As concentrações de fármaco de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ também apresentaram resultados bastante semelhantes, gerando 96,6% de mortalidade dos parasitos no mesmo

período. A motilidade também teve uma redução significativa ($p < 0,05$, Two-way ANOVA) para todas as proporções testadas quando comparando com o grupo de controle se fármaco (controle do meio).

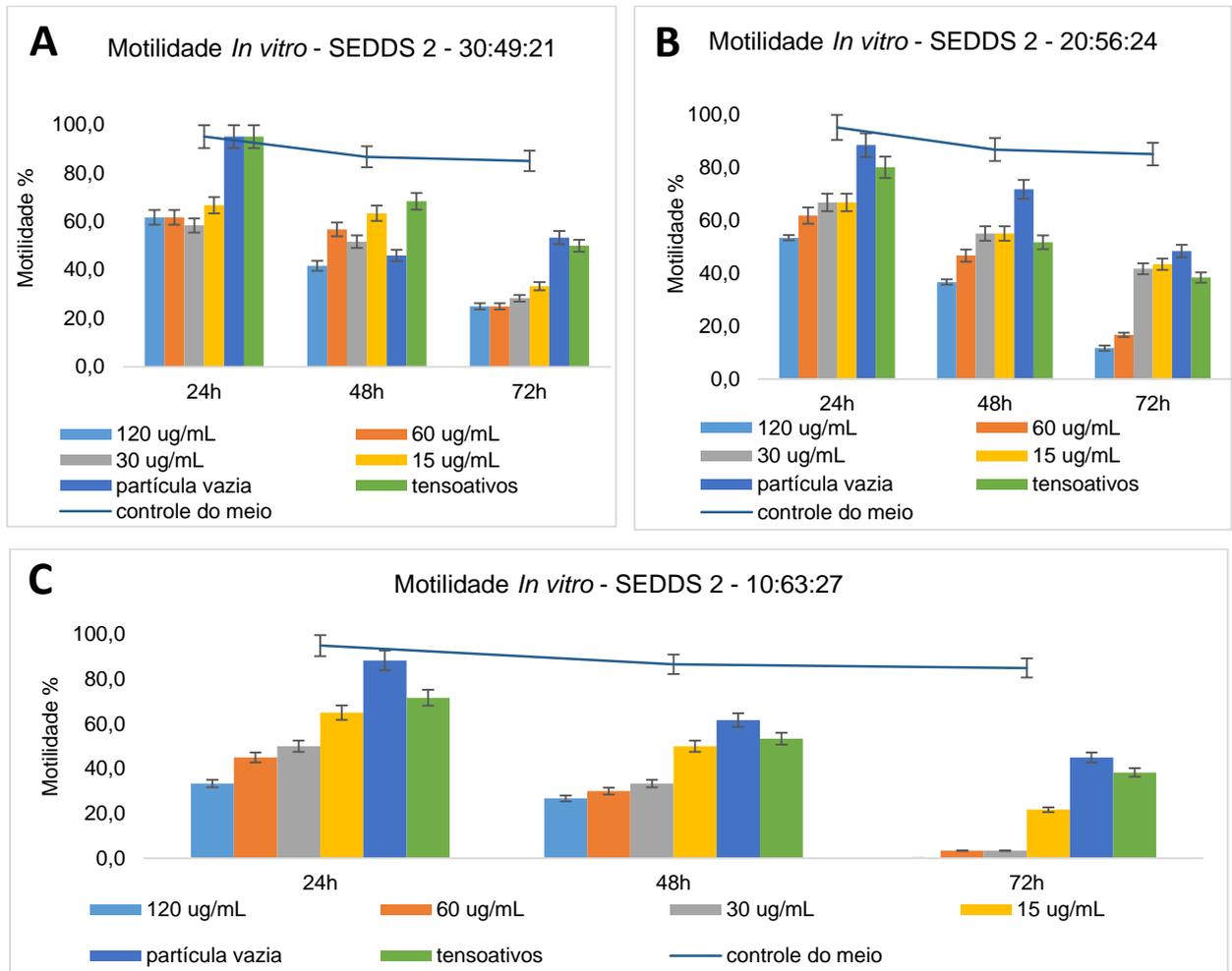
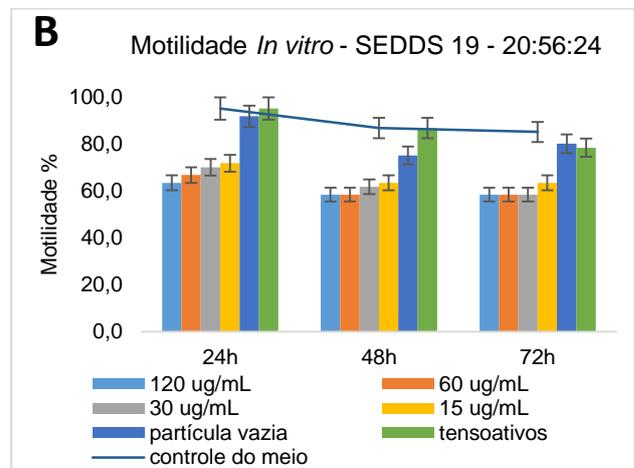
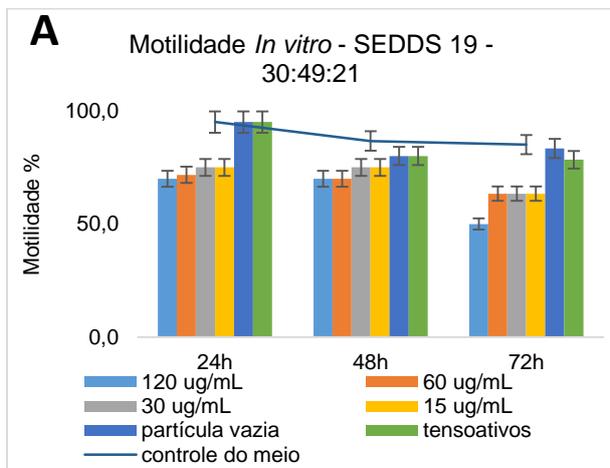


Figura 13. Ensaio de avaliação da motilidade *in vitro* de *Strongyloides venezuelensis* frente às formulações SEDDS 2 em diferentes concentrações de fármaco e diferentes proporções de fase oleosa (Peceol), tensoativo (Brij CS12) e co-tensoativo (Transcutol HP). A) Proporção de 30:49:21; B) Proporção de 20:56:24 e C) Proporção de 10:63:27.

Uma das características de *Strongyloides* spp. é a presença de uma cutícula bastante espessa no revestimento do parasito, o qual é impermeável a muitas substâncias. Em estudos envolvendo outro helminto que apresenta cutícula espessa (*Onchocerca volvulus*), Cross et al. (1997) relatam a presença da ivermectina em

parasitos de pacientes tratados, havendo portanto a possibilidade da entrada do fármaco através da ingestão pelo parasito. No presente experimento, essa hipótese é reforçada pela observação de todas as fêmeas submetidas ao tratamento regurgitarem, fato não observado nos controles sem fármaco.

Na avaliação *in vitro* de SEDDS 19 (Labrafac Lipophile, Gelucire 48/16 e Renex PEG 400), foi observada redução de motilidade nas diferentes proporções de componentes (Figura 14), porém a atividade observada foi inferior ao SEDDS 2. Embora não tenha ocorrido mortalidade, todas as concentrações de SEDDS 19 (120, 60, 30 e 15 $\mu\text{g/mL}$), em todas as proporções (30:49:21; 20:56:24 e 10:63:27), apresentaram redução significativa de motilidade ao fim de 72 horas ($p < 0,05$, Two-way ANOVA). Das três proporções de fase oleosa, tensoativo e co-tensoativo a proporção 10:63:27 foi a que apresentou uma redução de motilidade mais rápida, reduzindo significativamente a mobilidade do parasita em 24 h para todas as concentrações (com a exceção da concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$), provavelmente devido à formação de partículas de tamanho menor e mais estáveis (Kadu et al., 2011). Também foi observado que as fêmeas quando expostas a SEDDS 19 regurgitaram durante todo período de análise, podendo indicar a atividade do fármaco pela ingestão das partículas. Os resultados com as partículas vazias (sem ivermectina) foram semelhantes aos do controle (sem partículas) e somente dos tensoativos, indicando que *in vitro* possivelmente esses fatores não alterem a resposta do parasito.



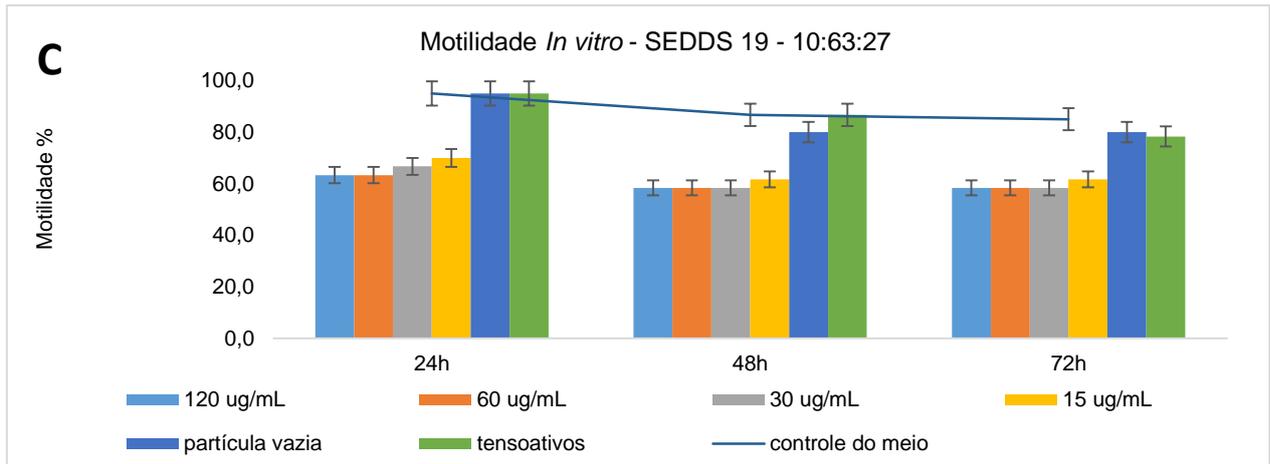


Figura 14. Ensaio de avaliação da motilidade *in vitro* de *Strongyloides venezuelensis* frente às formulações SEDDS 19 em diferentes concentrações de fármaco e diferentes proporções de fase oleosa (Labrafac Lipophile), tensoativo (Gelucire 48/16) e co-tensoativo (Renex PEG 400). A) Proporção de 30:49:21; B) Proporção de 20:56:24 e C) Proporção de 10:63:27.

Para ambas as formulações de SEDDS, a proporção dos componentes da formulação que apresentou melhor atividade foi a de 10:63:27, sendo que uma maior concentração de tensoativos tende a formar partículas mais estáveis e de menor tamanho, influenciando diretamente no efeito do fármaco (Kadu et al., 2011).

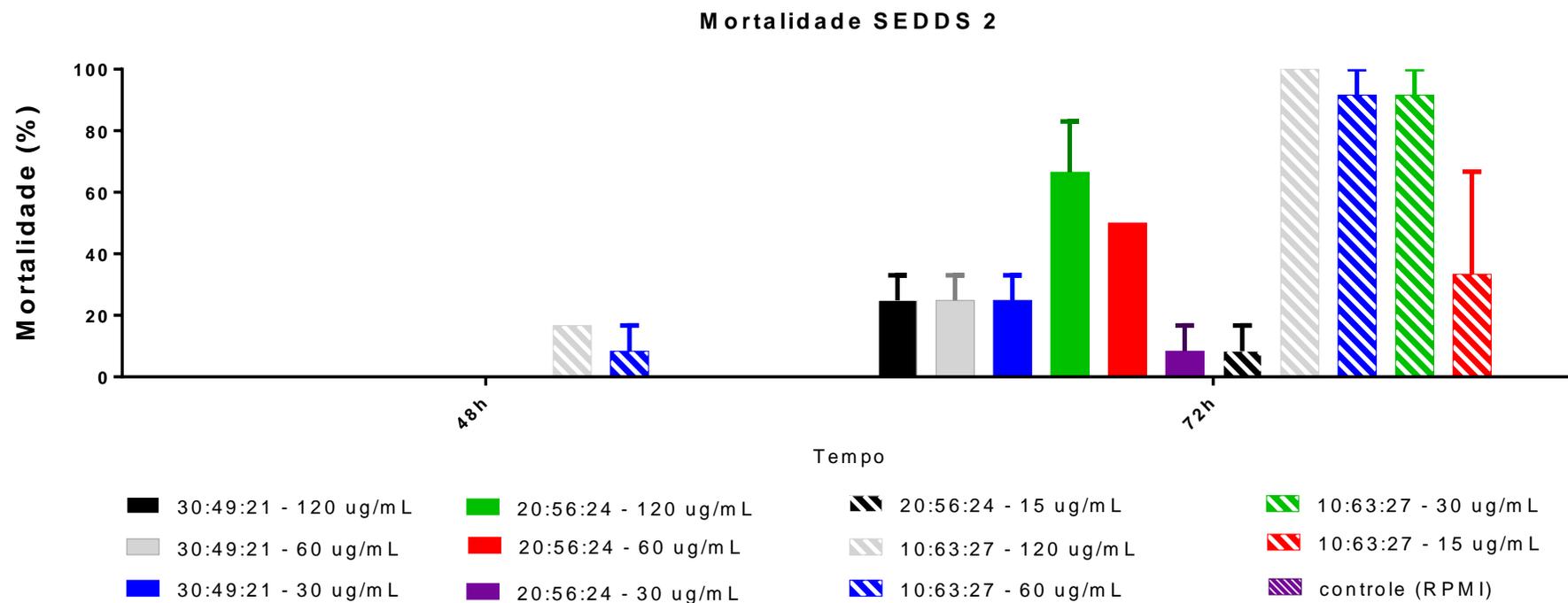
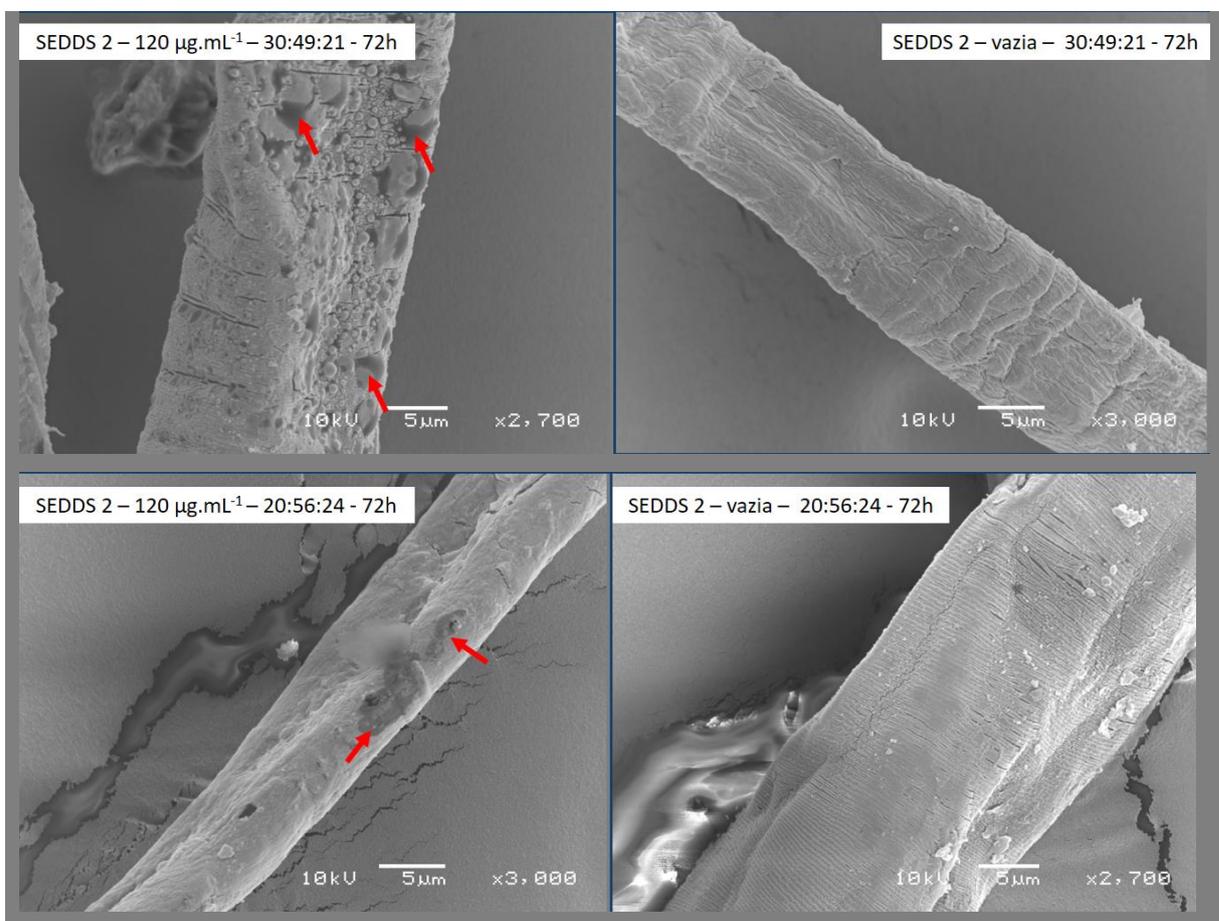


Figura 15. Mortalidade de *Strongyloides venezuelensis* submetidas ao tratamento com SEDDS 2 *in vitro*.

5.5.2 Morfologia dos parasitos

Análise em microscopia eletrônica de varredura

Os parasitos coletados a partir dos ensaios *in vitro*, quando submetidos a microscopia eletrônica de varredura, evidenciam a atividade das partículas, sendo possível observar alterações na cutícula dos espécimes amostrados. É possível observar uma quantidade notável de lesões nos parasitos submetidos ao tratamento com SEDDS 2 em todas as proporções avaliadas, principalmente naqueles tratados com ivermectina a 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na proporção 10:63:27, indicando que os danos na cutícula dos parasitos sejam pela ação da ivermectina, uma vez que os parasitos expostos à partículas sem o fármaco (vazia) apresentaram pouca ou nenhuma alteração estrutural (Figura 16).



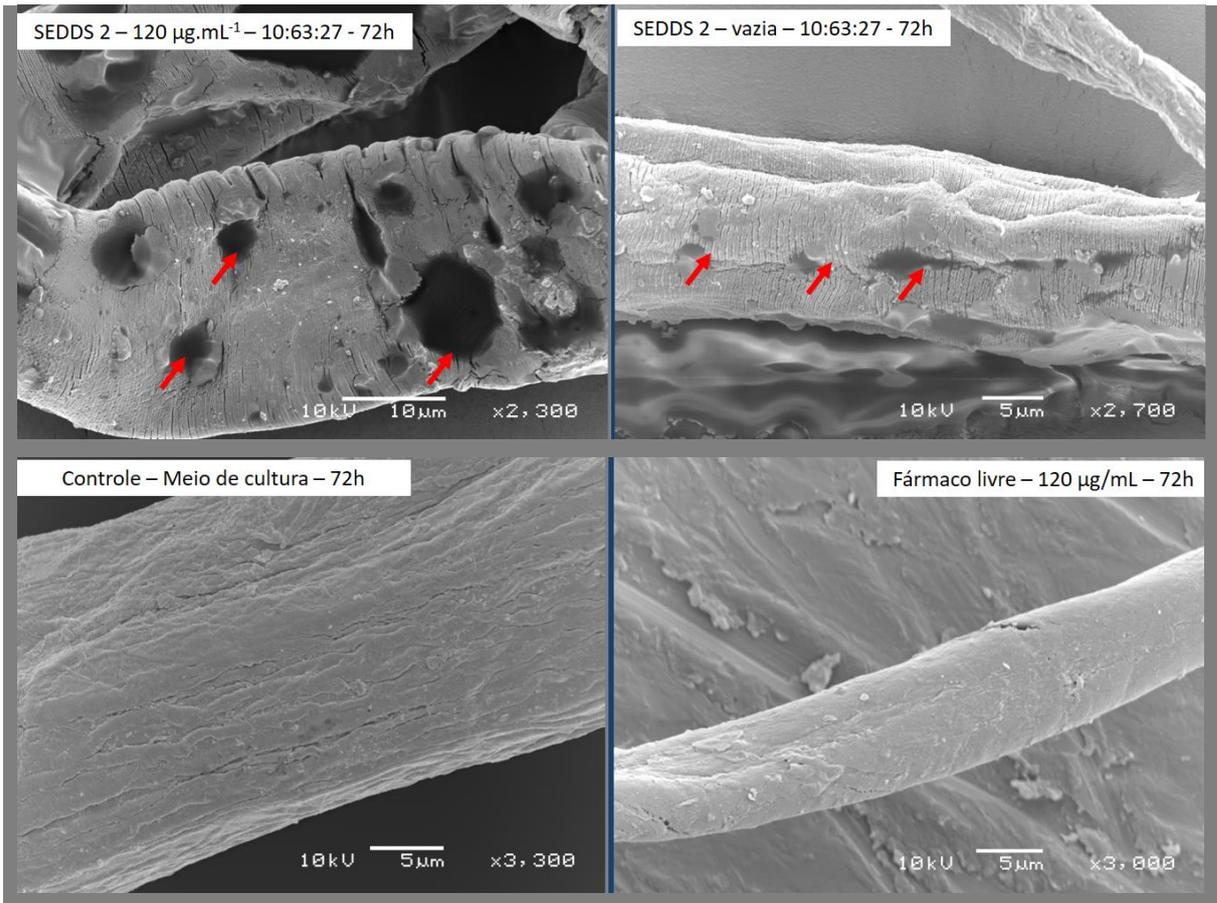


Figura 16. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Strongyloides venezuelensis* expostos à SEDDS 2, SEDDS 2 vazia (sem o fármaco), controle do meio de cultura e ivermectina livre. As setas vermelhas apontam as alterações mais severas observadas na cutícula do parasito.

A formulação SEDDS 19 também evidencia a atividade do fármaco na concentração de 120 µg/mL, porém a formulação que causou maiores danos visíveis foi a de 30:49:21. Nas demais concentrações, foi possível observar pouca ou nenhuma alteração na estrutura da cutícula do parasito e os parasitos submetidos aos controles com as partículas vazias (sem o fármaco) não apresentaram alterações (Figura 17).

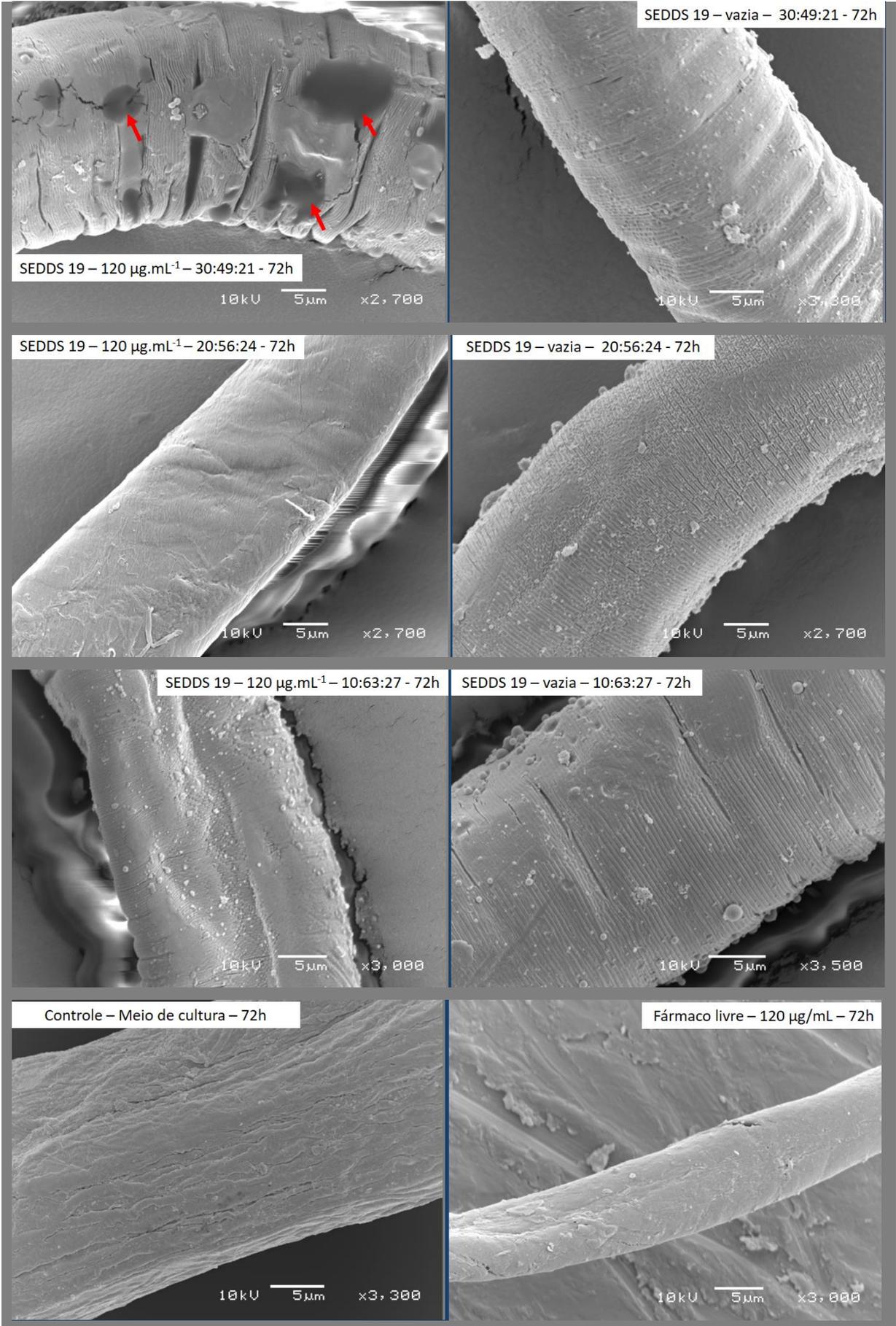


Figura 17. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Strongyloides venezuelensis* expostos à SEDDS 19, SEDDS 19 vazia (sem o fármaco), controle do meio de cultura e ivermectina livre. As setas vermelhas apontam as alterações mais severas na cutícula do parasito.

Conforme já comentado no ensaio *in vitro*, é possível que essas alterações tenham sido causadas pela ingestão da ivermectina, uma vez que a cutícula do parasita apresenta grande resistência, tendo sido observado no ensaio *in vitro* regurgitação pelos parasitos expostos a SEDDS. Holden-Dye e Walker (2007) discutem que em parasitos com a cutícula espessa é mais provável que o fármaco não atravesse essa barreira, e os efeitos observados sejam devido à ingestão. Outra possibilidade é a adesão dos tensoativos à cutícula do parasita, levando a um desgaste da mesma. Esta possibilidade é suportada pela presença de lesões nos grupos apenas exposto aos tensoativos e poderia também explicar a redução de motilidade nos grupos tratados com os tensoativos de SEDDS 2.

5.5.3 Avaliação dos SEDDS *in vivo*

Com o ensaio *in vivo* foi possível inferir a infecção a partir da contagem de número de ovos por grama (OPG), onde foi observado no controle (camundongos infectados e não tratados) que o pico de infecção ocorreu no 7º dia com uma redução gradual da quantidade de ovos encontrados nas fezes até o 12º dia (Tabela 9).

Nos animais tratados com SEDDS 2, na concentração de ivermectina de 01, mg/kg, apresentaram uma redução significativa no número de ovos nas fezes, quando comparados com o grupo não tratado ($p < 0,05$, Two-way ANOVA), não mostrando diferença com o grupo tratado com o dobro da concentração (0,2 mg/kg) de ivermectina (Figura 18; Tabela 9). A partir do oitavo dia, é possível observar uma redução maior no número de ovos por grama de fezes em relação ao controle farmacológico. Também se observa uma redução de ovos por grama de fezes nos animais tratados com as partículas de SEDDS 2 sem o fármaco (vazia). É possível, portanto, que a ação dos tensoativos que compõem esse SEDDS afetem de alguma maneira a presença dos parasitos. Hills (1988) descreve que tensoativos podem

causar alteração de permeabilidade de membranas biológicas como a do intestino, sítio onde se encontram os parasitos deste estudo. Portanto, essa alteração pode ter afetado a aderência destes à mucosa, uma vez que foram observados parasitas adultos nas fezes durante o período de experimento.

Em camundongos tratados com o SEDDS 19 foi possível observar uma redução significativa ($P < 0,05$, Two-way ANOVA) dos valores de OPG, a partir do quinto dia eliminando a infecção até ao nono dia (Figura 19, Tabela 9).

Devido à possível interação do co-tensoativo de SEDDS 19 (Renex PEG 400) com a mucosa intestinal, foi realizado um ensaio *in vivo* com os componentes de SEDDS 19 sem o co-tensoativo (apenas a ivermectina solubilizada em Labrafac Lipophile e Gelucire 48/16), onde os resultados obtidos sugerem que a presença do PEG altere a mucosa intestinal a ponto de ser fator determinante para permitir a liberação do fármaco ao sítio de absorção (Figura 19). Kim et al. (2000) sugere que a presença de polietileno glicol (PEG) em uma partícula aumente a liberação do fármaco devido à sua propriedade formação de poros nas partículas. Canevari et al. (2009) relata a importância do PEG na entrega específica no cólon e sua capacidade de mucoadesão. É necessário também considerar que a ausência desse co-tensoativo certamente alterou a estabilidade da formulação, já não sendo considerada portanto um SEDDS.

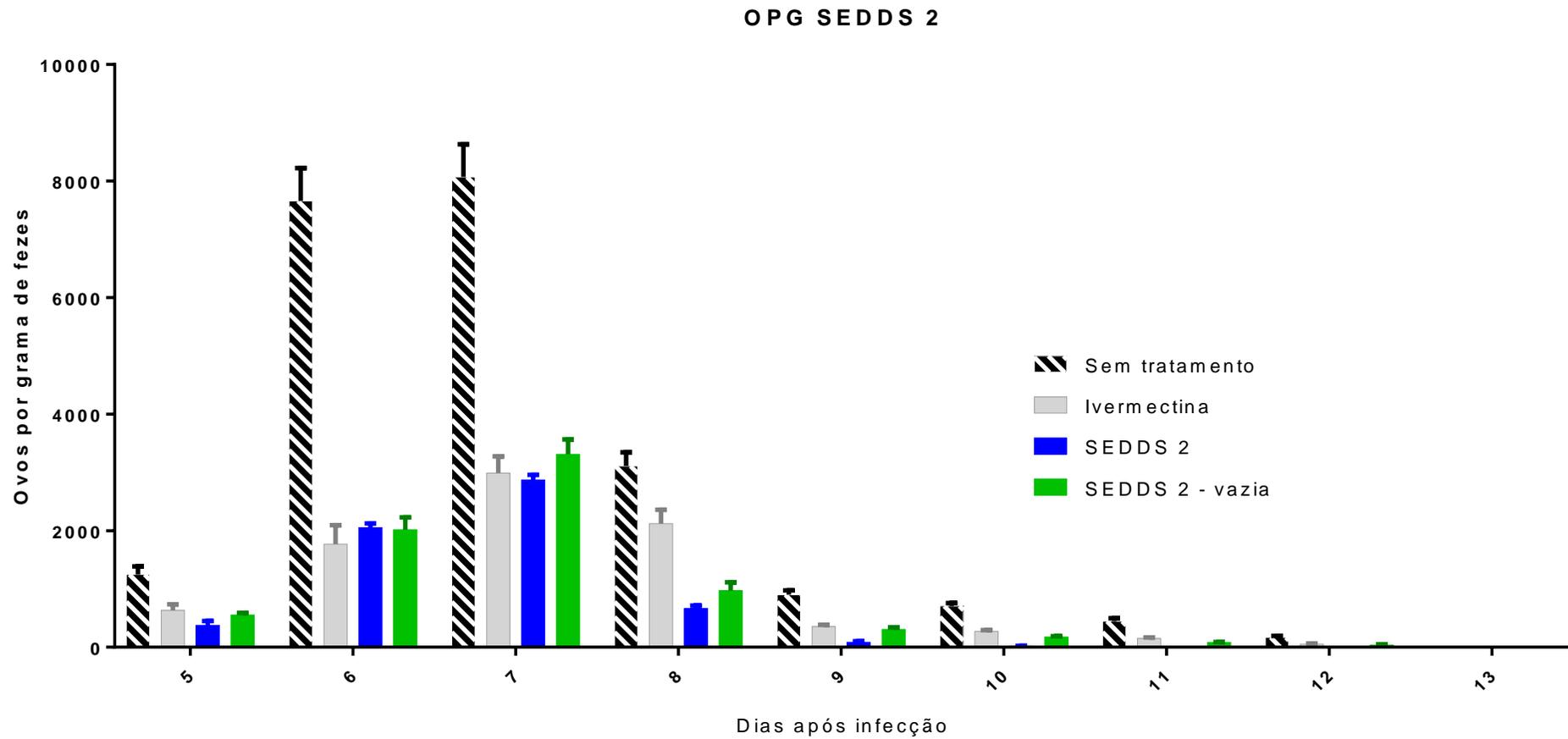


Figura 18. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de *Strongyloides venezuelensis* submetidos ao tratamento com SEDDS 2 ao longo de 13 dias (n=5 e desvio padrão)

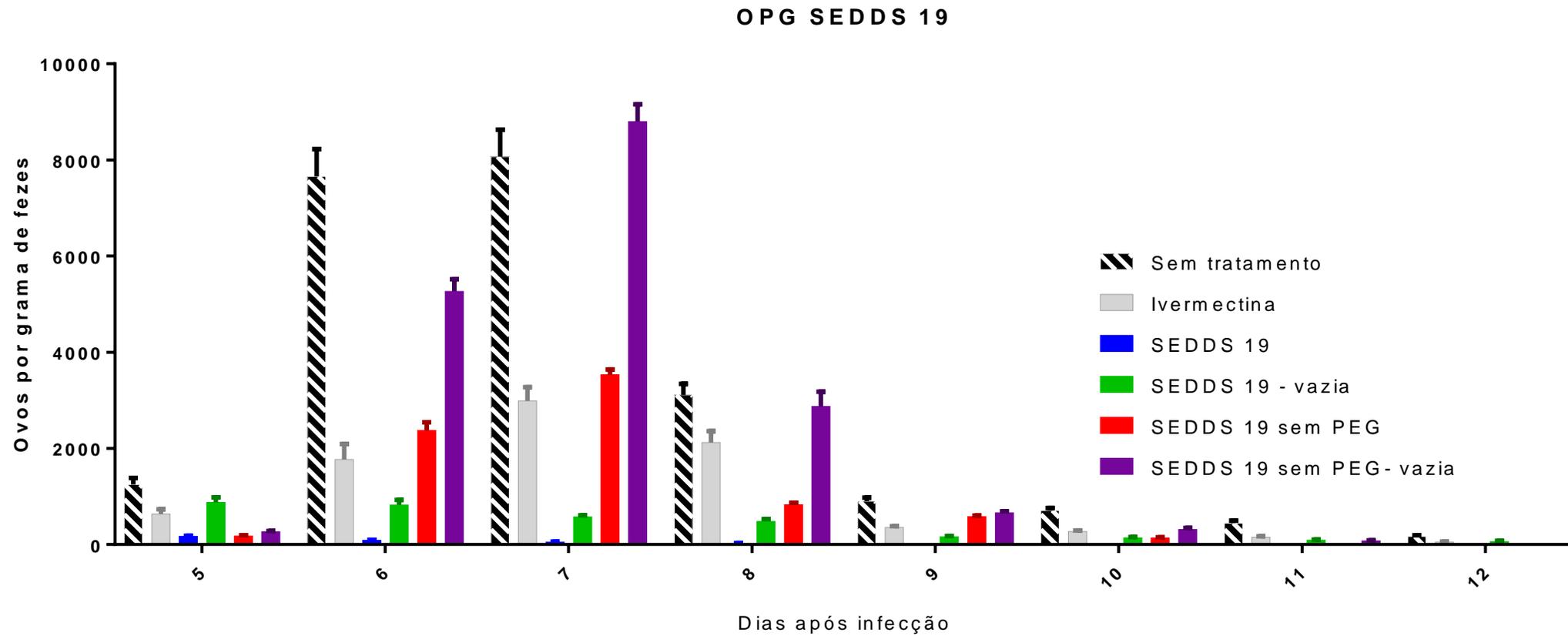


Figura 19. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de *Strongyloides venezuelensis* submetidos ao tratamento com SEDDS 19 ao longo de 13 dias (n=10).

Quando analisados de maneira isolada os resultados do OPG de SEDDS 2 e 19 em comparação com os controles (farmacológicos e sem tratamento), é possível observar que tanto o SEDDS 2 quanto o SEDDS 19 apresentaram atividade relevante na eliminação da infecção (Figura 20), no entanto, quando comparadas as atividades observadas pelo número de ovos por grama de fezes (OPG) de SEDDS 2 e SEDDS 19, fica evidente os excelentes resultados encontrados nos animais tratados com o SEDDS 19, onde o número de ovos encontrados no 7º dia foi significativamente inferior ao dos animais tratados com SEDDS 2. Também é importante evidenciar que o pico de infecção de animais tratados com SEDDS 19 ocorreu no 5º dia, contrariamente a todos os restantes grupos podendo este fenómeno ser explicado pela cinética de libertação do fármaco (Figura 20).

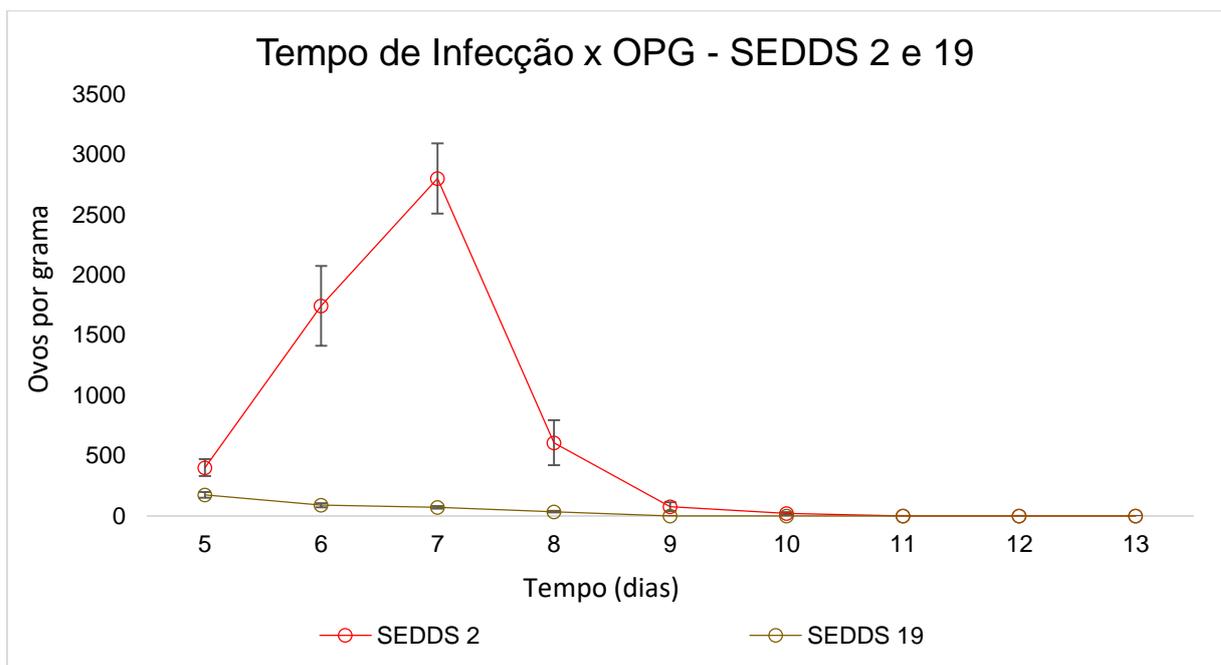


Figura 20. Comparação de quantidade de ovos por grama de fezes em camundongos tratados com SEDDS 2 e SEDDS 19 em relação ao tempo de infecção (dias). N=10 e desvio padrão.

A cinética de libertação da ivermectina presente no SEDDS 2, quando comparada com o ensaio de ovos por grama de fezes (*in vivo*), evidencia o tempo em que o princípio ativo das partículas tem seu efeito sobre os parasitos, onde no sétimo

dia de infecção (quarto dia de tratamento), após a liberação de grande parte da ivermectina (90%), há uma redução drástica no número de ovos por grama nos dias subsequentes até o décimo dia, último dia com ovos presentes nas fezes (Figura 21).

Utilizando o teste de correlação não paramétrico de Spearman, foi encontrada uma correlação forte entre a liberação de SEDDS 19 e o número de ovos liberados pelos camundongos tratados com SEDDS 19 ($r = -0.9856$, $p\text{-value}=0.0056$), onde o número de ovos diminuiu com o aumento da liberação. Com o intuito de confirmar se a diminuição de ovos estaria relacionada com a liberação e não com o decréscimo natural de OPG, o teste de correlação foi também realizado entre a percentagem de liberação e o grupo sem tratamento ($r = -0.6$, $p\text{-value}=0.2417$) e entre a percentagem de liberação e o grupo tratado com Ivermectina ($r = -0.4857$, $p\text{-value}=0.3556$), não tendo sido encontrada correlação.

Não foi encontrada correlação entre a liberação de SEDDS 2 e OPG.

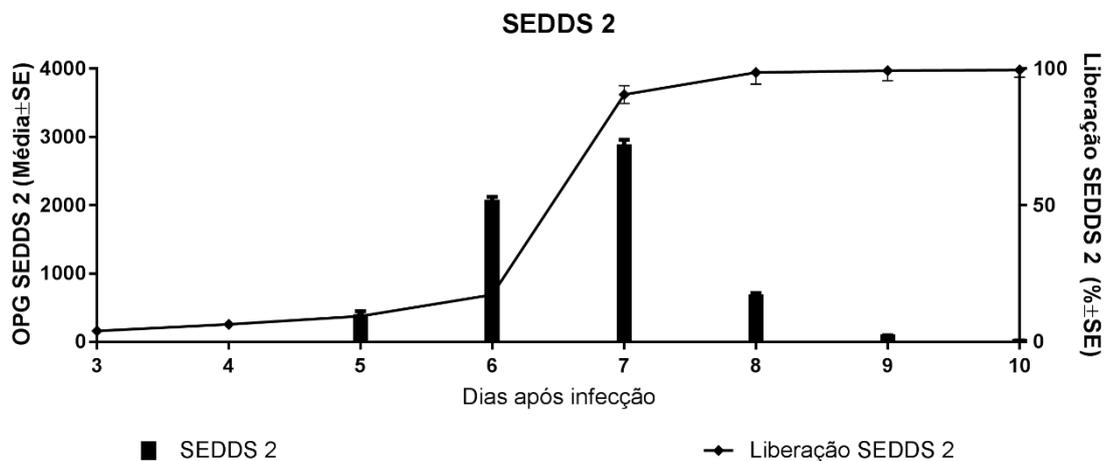


Figura 21. Cinética de liberação da ivermectina em SEDDS 2 em relação ao tempo de infecção (dias), sobreposto aos valores de ovos por grama do ensaio *in vivo*.

É possível, no caso dessa partícula (SEDDS 19), que a mucoadesão foi bastante eficiente e logo no início da liberação do fármaco pelas partículas, este foi rapidamente absorvido e ocasionou sua ação sobre os parasitos.

Entre os animais tratados com o SEDDS 19, com o início da liberação da ivermectina nas partículas no terceiro dia de tratamento (sexto dia de infecção), já foi possível observar uma redução acentuada do número de ovos por grama, sendo que quando a maior parte da ivermectina é liberada (oitavo dia de infecção, correspondente ao quinto dia de tratamento) a infecção é provavelmente eliminada, pois não foram encontrados ovos dos parasitos nas fezes (Figura 22). Esse resultado aponta o SEDDS 19 como a melhor formulação avaliada neste trabalho, uma vez que logo no início da liberação da ivermectina já há uma redução drástica no número de ovos por grama.

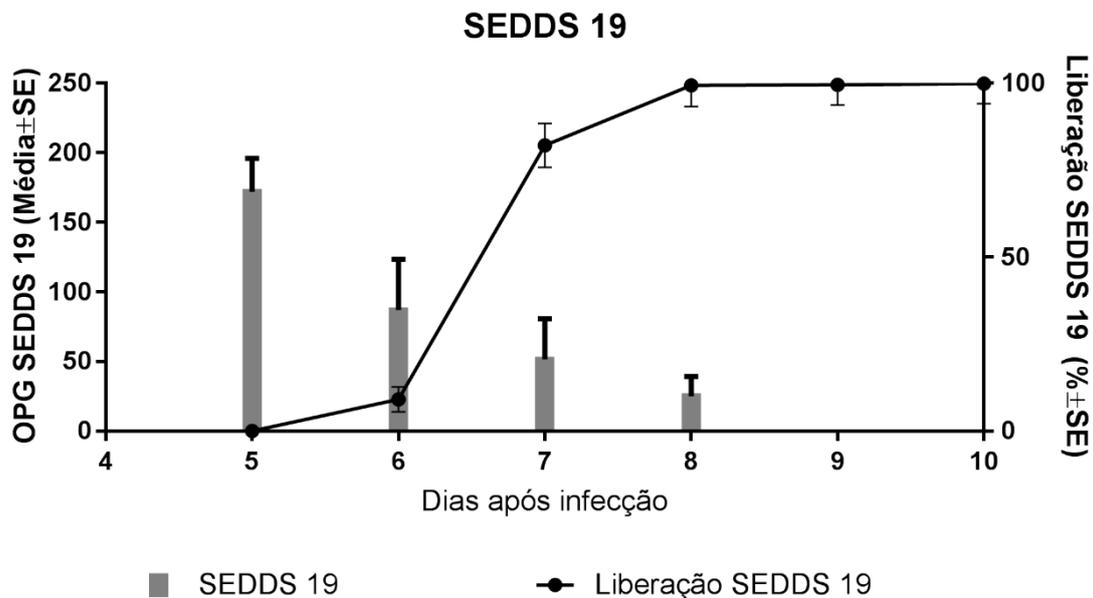


Figura 22. Cinética de liberação da ivermectina em SEDDS 19 em relação ao tempo de infecção (dias), sobreposto aos valores de ovos por grama do ensaio *in vivo*.

Ao final do experimento não foram encontrados parasitos vivos no intestino dos camundongos tratados, no entanto é importante ressaltar que foram encontradas fêmeas nas fezes dos camundongos tratados com SEDDS 2 e SEDDS 19 desde o 6º. dia de infecção, indicando que não só houve uma diminuição da produção de ovos, mas ocorreu morte dos parasitas. Nos controles também foram encontradas fêmeas durante o experimento de pesquisa de ovos nas fezes, porém apenas a partir do 10º. dia.

6 Conclusão

As duas formulações de SEDDS avaliadas, (Peceol, Brij CS12 e Transcutol HP; Labrafac Lipophile, Gelucire 48/16 e Renex PEG 400) apresentaram boa estabilidade e polidispersidade, inclusive quando submetidas a alterações enzimáticas e de pH.

Na composição das partículas, os tensoativos mostraram-se de grande importância na atividade das partículas, uma vez que auxiliam não apenas na estabilidade da partícula, mas também na mucoadesão destas. Como esses tensoativos utilizados promovem alterações temporárias na permeabilidade da mucosa intestinal, é possível que este fenômeno também tenha colaborado com a biodisponibilidade da ivermectina.

O diâmetro médio das partículas formadas nas formulações SEDDS 2 e SEDDS 19 sugere uma maior interação com a superfície de contato do sítio de absorção. Os índices de polidispersidade foram aceitáveis para formulações orais e o potencial zeta de ambas as partículas indicando estabilidade moderada, apresentando valores de -12,4mV (SEDDS 2) e -11,1 mV (SEDDS 19).

No ensaio de liberação, a ivermectina foi liberada em maior quantidade a partir do terceiro dia, e liberando todo o fármaco no quinto dia, evidenciando uma liberação controlada (lenta) tanto no SEDDS 2 quanto no SEDDS 19.

As formulação SEDDS 2 e SEDDS 19 apresentaram resultados bastante superiores ao controle farmacológico, tanto nos ensaios *in vitro* quanto *in vivo*. Os resultados dos tratamentos *in vivo* apresentaram uma melhor atividade (SEDDS 19 em particular) mesmo com a concentração de fármaco sendo 50% menor do que a do fármaco livre, indicando a possibilidade não só de melhorar a eficácia de tratamento, mas também reduzir a dosagem de fármaco e conseqüentemente reduzindo a possibilidade e intensidade de efeitos colaterais secundários.

7 Referências

- Amato Neto, V., Pinto, P. L. S.; Moreira A. A. B.; Campos R.; Sant'ana, E. J. D.; Levai, E. V.; Padilha, L. A. A.; Takiguti; C. K. 1986. Avaliação da atividade terapêutica do albendazol em ratos experimentalmente infectados com *Strongyloides venezuelensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 28, 181-184.
- Amato Neto, V.; Carignani, F. L.; Matsubara, L.; Braz, L. M. A. 1997. Tratamento de ratos, experimentalmente infectados pelo *Strongyloides venezuelensis*, através da ivermectina administrada por via oral. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*. 30(6):481-484.
- Amidon, G. L.; Lennernas, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: The correlation of *in vitro* product and *in vivo* bioavailability. *Pharm. Res.* 12: 413-420.
- ANVISA. 2003. Resolução – RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos métodos analíticos. Ministério da Saúde – MS, Brasil.
- Attivi, D., I. Ajana, A. Astier, B. Demore and S. Gibaud, 2010: Development of microemulsion of mitotane for improvement of oral bioavailability. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 36, 421-427.
- Banerjee D, Mandal A, Prakash O. 1971. Mebendazole (R-17,635): a new anthelmintic in the development of hookworms. *Trans R Soc Tro. Med Hyg.* 65(5):685–686.
- Basáñez, M. G.; Pion, S. D. S.; Boakes, E.; Filipe, J. A. N.; Churcher, T. S.; Boussinesq, M. 2008. Effect of single-dose ivermectin on *Onchocerca volvulus*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 8: 310–22.
- Baviskar, D.; Rajput, A.; Bare, K. 2014. Development and *in vitro* characterization of mebendazole delayed release tablet for colonic drug delivery. *Pak. J. Pharm. Sci.* 27(2), 249-253.
- Birmani, N. A.; Dharejo, A. M.; Khan, M. M.; Shaikh, A. M. 2012. First record of genus *Strongyloides* Grassi, 1879 (Nematoda: Strongyloidae) in Pakistan. *Sindh Univ. Res. Jour.* 44 (2) 143-144 .
- Bisoffi, Z., D. Buonfrate, A. Montresor, A. Requena-Méndez, J. Muñoz, A. J. Krolewiecki, E. Gotuzzo, M. A. Mena, P. L. Chiodini, M. Anselmi, J. Moreira and M. Albonico, 2013: *Strongyloides stercoralis*: A Plea for Action. *PLoS Negl Trop Dis.* , 7, e2214.
- Bogataj, M.; Vovk, T.; Kerec, M.; Dimnik, A.; Grabnar, I; Mrhar, A. 2004. The Correlation between Zeta Potential and Mucoadhesion Strength on Pig Vesical Mucosa. *Biol. Pharm. Bull.* 26(5) 743—746.

- Bozzola, J. J.; Russel, L. D. 1999. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. 2nd. Edition.
- Buyukozturk, F.; Di Maio, S.; Budil, D. E.; Carrier, R. L. 2013. Effect of ingested lipids on drug dissolution and release with concurrent digestion: a modeling approach. *Pharm Res*. 30(12): 3131–3144.
- Camargo, J. A.; Sapin, A.; Daloz, D.; Maincent, P. 2010. Ivermectin-loaded microparticles for parenteral sustained release: *in vitro* characterization and effect of some formulation variables. *J. Microencapsul.* , 27(7): 609–617.
- Campbell, W. C. 1989. Ivermectin and abamectin. S *SBM*, New York.
- Campbell, W. C.; Fisher, M. H.; Stapley, E. O.; Albers-Schönberg, G.; Jacob, T. A. 1983. Ivermectin: A potent new antiparasitic agent. *Science*, 221: 823-827.
- Canevari, M.; Castagliuolo, I.; Brun, P.; Cardin, M.; Schiavon, M.; Pasut, G.; Veronese, F. M. 2009. Poly(ethylene glycol)-mesalazine conjugate for colon specific delivery. *Int J Pharm*. 23;368(1-2):171-7.
- Carvalho, E. M.; Porto, A. F. 2004. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol* , 26: 487–497.
- Čerpnjak, K.; Zvonar, A.; Gašperlin, M.; Vrečer, F. 2013. Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Acta Pharm*. 63:427–445.
- Chatterjee, B.; Almurisi, S. H.; Dukhan, A. A. M.; Mandal, U. K.; Sengupta, P. 2016. Controversies with self-emulsifying drug delivery system from pharmacokinetic point of view, *Drug Deliv.*, 23:9, 3639-3652.
- Chomwal, R. K.; Goyal, A. 2013. Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Albendazole and Ivermectin in Pharmaceutical Formulation. *RRJPA*, 3 (1): 11-14.
- Cross, H. F.; Bronsvort, B. M.; Wahl, G.; Renz, A.; Achu-Kwi, D.; Trees, A. J. 1997. The entry of ivermectin and suramin into *Onchocerca ochengi* nodules. *Ann Trop Med Parasitol*. 91(4):393-401.
- Cui, J.; Yu, B.; Zhao, Y.; Zhu, W.; Li, H.; Lou, H.; Zhai, G. 2009: Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems. *Int J Pharm.*, 371, 148-155.
- Dal Bosco, S. M. 2012. Degradação de ivermectina por processos oxidativos avançados. Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Unicamp, para obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil, na área de Saneamento e Ambiente.
- De Bona, S.; Basso, R. M. C. 2008. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis* associada ao uso crônico de corticosteroides. *RBAC*, 40(4): 247-250.

- Dixit, A. R.; Rajput, S. J.; Patel, S. G. 2010. Preparation and bioavailability assessment of SMEDDS containing valsartan. *AAPS Pharm Sci Tech*, 11, 314-321.
- Ekambaram, P.; Sathali, A. A. H.; Priyanka, K. 2012. Solid Lipid Nanoparticles: a review. *Sci Revs Chem Commun.*, 2, 80-102.
- Emeje. M.; Nwabunike, P.; Isimi, Y.; Kunle, O.; Ofoefule, S. 2009. Preparation and evaluation of colon targeted drug delivery systems for albendazole using kneading, extrusion and compaction technology. *Acta Pharm Sin* , 44 (10): 1152-1158.
- Fardet, L.; Généréau, T.; Poirot, J. L.; Guidet, B.; Kettaneh, A.; Cabane, J. 2007. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients - Case series and literature review. *J Infect.* 54, 18-27.
- Fox, L. M. 2006. Ivermectin: uses and impact 20 years on. *Curr Opin Infect Dis*, 19: 588-593.
- Gandhi, S. D.; Pandya, P. R.; Upadhyay, N. N.; Nagaich, U. 2010. Design, formulation and evaluation of a colon specific drug delivery system for a model anthelmintic drug-Ivermectin. *J. Chem. Pharm. Res.* 2(5):229-243.
- Gordon, H. M.; Whitlock, H. V. A. 1939. New technique for coating nematode eggs in sheep feces. *J Common Sci Ind Org.*,12, 17-18.
- Gotuzzo, E.; Terashima, A.; Alvarez, H.; Tello, R.; Infante, R; Watts, D. M.; Freedman, D. O. 1999. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection associated with human T cell lymphotropic virus type-1 infection in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* , 60 (1): 146-149.
- Grove, D. I. 1982. *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis*: the effects of thiabendazole, mebendazole, and cambendazole in infected mice. *Am J Trop Med Hyg.* 31(3 Pt 1):469-76.
- Grove, D. I.; Northern, C.; Heenan, P. J. 1986. *Strongyloides stercoralis* Infections in the Muscles of Mice: a Model for Investigating the Systemic Phase of Strongyloidiasis. *Pathology* 18: 72-76.
- Grove, D. I., 1996: Human strongyloidiasis. *Adv Parasitol.*, 38, 251-309.
- Gursoy, R.; Benita, S. 2004. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother.* 58:173–182.
- Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman A.G.. 2001. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York, NY: McGraw-Hill, , p. 1126.
- Hayat, M. A. 1970. Principles and Techniques of Electron Microscopy. Vol. 1.

- Hills, B. 1988. *The Biology of Surfactant*. University of New England, Australia, Cambridge ed.
- Holden-Dye, L.; Walker, R. J. 2007. Anthelmintic drugs. *Wormbook*, ed. The *C. elegans* Research Community.
- Hotez, P. J., D. H. Molyneux, A. Fenwick, J. Kumaresan, S. E. Sachs, J. D. Sachs and L. Savioli 2007: Control of Neglected Tropical Diseases. *N Engl J Med.*, 357, 1018-1027.
- Jain, S. K.; Rai, G.; Saraf, D. K.; Agrawal, G. P. 2004. The Preparation and Evaluation of Albendazole Microspheres for Colonic Delivery. *Pharm Technol.*, 66-71.
- Kadu, P. J.; Kushare, S. S.; Thacker, D. D.; Gattani, S. G. 2011. Enhancement of oral bioavailability of atorvastatin calcium by self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). *Pharm Dev Technol.* ; 16(1): 65–74.
- Kim JE, Kim SR, Lee SH, Lee CH, Kim DD. 2000. The effect of pore formers on the controlled release of cefadroxil from a polyurethane matrix. *Int J Pharm*, 201:29–36.
- Köhler, P.; Bachmann, R. 1981. Intestinal Tubulin as Possible Target for the Chemotherapeutic Action of Mebendazole in Parasitic Nematodes. *Mol Biochem Parasitol.*, 4:325-336.
- Krstić, M.; Medarević, D.; Đuriš, J.; Ibrić, S. 2018. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) and self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) as lipid nanocarriers for improving dissolution rate and bioavailability of poorly soluble drugs. In book: *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*. Capítulo 12. 473-505. William Andrew Press.
- Lacey, E. 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazole. *Int J Parasitol* , 18(7): 885-936.
- Lawrence, G.; Leafasia, J.; Sheridan, J. 2005. Control of scabies, skin sores and haematuria in children in the Solomon Islands: Another role of ivermectin. *Bull WHO*, 83: 34-42.
- Lim, S.; Katz, K.; Krajden, S.; Fuksa, M.; Keystone, J. S.; KainK. C. 2004. Complicated and fatal *Strongyloides* infection in Canadians: risk factors, diagnosis and management. *Can. Med. Assoc. J.*, 171(5): 479-484.
- Luna, O. B.; Grasselli, R.; Ananias, M.; Pinto, T. S.; Bozza, F. A.; Soares, M.; Salluh, J. I. F. 2007. Estrongiloidíase Disseminada: Diagnóstico e Tratamento. *Rev Bras Ter Intensiva*, 19(4):463-468.

- Luvira, V.; Watthanakulpanich, D.; Pittisuttithum, P. 2014. Management of *Strongyloides stercoralis*: a puzzling parasite. *Int Health*, 6(4): 273–281.
- Mahapatra, A. K., Murthy, P. N.; Swadeep, B.; Swain, R. P. 2014. Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): An Update from Formulation Development to Therapeutic Strategies. *Int.J. PharmTech Res.*, 6, 546-568.
- McClements, D. J.; Li, Y. 2010. Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food Funct.* 1(1):32-59.
- McEvoy, G., Snow, E., Kester, L., Litvac, K., Miller, J., Welsh, O. 2006. American Hospital Formulary Service (AHFS): Drug information 2006 Bethesda, MD: *Am J Health Syst Pharm.*, (p. 3047).
- Mendes, T.; Minori, K.; Ueta, M.; Miguel, D. C.; Allegretti, S. M. 2017. Strongyloidiasis Current Status with Emphasis in Diagnosis and Drug Research. *J. of J Parasitol Res.* Volume 2017, Article ID 5056314, 13 pages.
- Minekus, M.; Alming, M.; Alvito, P. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – An international consensus. *Food Funct.*, 5: 1113-1124.
- Mohsin, K.; Shahba, A. A.; Alanazi, F. K. 2012. Lipid based self-emulsifying formulations for poorly water soluble drugs- an excellent opportunity. *Ind J Pharm Edu Res.*, 46:88–96.
- Olsen, A., L. van Lieshout, H. Marti, T. Polderman, K. Polman, P. Steinmann, R. Stothard, S. Thybo, J. J. Verweij and P. Magnussen, 2009: Strongyloidiasis--the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 103, 967-972.
- Ottesen, E. A.; Campbell, W. C. 1994. Ivermectin in human medicine. *J Antimicrob Chemother.* 34: 195-203.
- Pacqué, M.; Muñoz, B.; Greene, B. M.; Taylor, H. R. 1990. Community-based treatment of onchocerciasis with ivermectin: safety, efficacy, and acceptability of yearly treatment. *J Infect Dis*, 163: 381–85.
- Panic, G.; Duthaler, U.; Speich, B.; Keiser, J. 2014. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections, *Int J Parasitol.: Drugs and Drug Resistance*, 4(3): 185–200.
- Pardeshi, C., P.; Rajput, V.; Belgamwar, A.; Tekade, G.; Patil, K. 2012; Chaudhary and A. Sonje. Solid lipid based nanocarriers: an overview. *Acta Pharm.*, (Zagreb, Croatia), 62, 433-472.
- Pays, J. F. 2011. Combined infection with HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. *Bull Soc Patho. Exot.* 104:188-199.

- Poiesz, B. J.; Ruscetti, F. W.; Gazdara, F.; Bunn, P. A., Minnaji, D.; Gallo, R. C. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77 (12): 7415-7419.
- Pouton, C. 1985. Self-emulsifying drug delivery systems: Assessment of the efficiency of emulsification. *Int J Pharm*. 27:335–348.
- Pujara, N. D. Self-emulsifying drug delivery system: A novel approach. *Int J Curr Pharm Res.*, 4(2): 18-23, 2012.
- Rugai, E.; Mattos, T.; Brisola, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes - Modificação do método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1954. 5-8.
- Savale, S. K. A review - self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS). *Int J Res Pharm Nano Sci*. 4(6), 2015, 385 – 397.
- Severino, P.; Andreani, T.; Macedo, A. S.; Fangueiro, J. F.; Santana, M. H. A.; Silva, A. M.; Souto, E. B. 2012. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. *J Drug Deliv*. Article ID 750891, 10 pages.
- Shalaby, H. A. Anthelmintics Resistance; How to Overcome it? *Iranian J Parasitol*. 8(1): 18-32, 2013.
- Singh, B.; Bandopadhyay, S.; Kapil, R.; Singh, R.; Katare, O. P. Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): Formulation Development, Characterization, and Applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 26, 427-451, 2009.
- Souza, W. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. 2007. Editora SBMM. 3ª. Edição.
- Swati, L., U. Telrandhe, S. Burle and S. Kosalge, 2016: Self-Emulsifying Drug Delivery System - A Novel Approach to Improve Oral Bioavailability. *Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3, 164-173. Viney, M. E.; Lok, J. B. *Strongyloides* spp. WormBook. *NIH Public Access*. P. 1-19. 2011.
- Verdonck, K.; González, E.; Van Dooren, S.; Vandamme, A. M.; Vanhan, G.; Gotuzzo, E. 2007. Human T-lymphotropic virus 1: Recent knowledge about an ancient infection. *Infec Dis*, 7 (4): 266-281.
- Viney, M. E.; Lok, J. B. *Strongyloides* spp. WormBook. *NIH Public Access*. P. 1-19. 2011.

- WHO, 2006: Preventive chemotherapy in human helminthiasis. In: W. H. Organization (ed.), Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: A manual for health professionals and programme managers. World Health Organization, Geneva.
- Williams, H. D.; Sassene, P.; Kleberg, K. 2013. Toward the establishment of standardized *in vitro* tests for lipid-based formulations, part 3: understanding supersaturation versus precipitation potential during the *in vitro* digestion of type I, II, IIIA, IIIB and IV lipid-based formulations. *Pharm Res* 30:3059–76.

8 Anexos

8.1. Certificado CEUA/Unicamp 4400-1



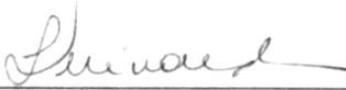

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Desenvolvimento de um Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS) para carregamento da ivermectina e avaliação da sua eficiência contra Strongyloides venezuelensis**, registrada com o nº **4400-1**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti e**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **22 de novembro de 2016**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	14/11/2016-01/06/2017
Vigência da autorização para manipulação animal:	22/11/2016-01/06/2017
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico Balb/cAnUnib
No. de animais:	45
Peso / Idade:	21 dias / 20g
Sexo:	fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	10
Peso / Idade:	21 dias / 150g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 03 de novembro de 2016.



 Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
 Presidente



 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

8.2. Certificado CEUA/Unicamp 4400-1(A)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Desenvolvimento de um Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS) para carreamento da Ivermectina e avaliação da sua eficiência contra Strongyloides venezuelensis, registrada com o nº 4400-1(A)/2017, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti e Cesar Corat Ribeiro Prado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 14 de junho de 2017.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	10/05/2017-10/10/2017
Vigência da autorização para manipulação animal:	14/06/2017-10/10/2017
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/c Unib
No. de animais:	66
Peso / Idade:	21 dias / 20g
Sexo:	Fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 14 de junho de 2017.


 Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

8.3. Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Desenvolvimento de um self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) para carreamento da Ivermectina e avaliação da sua atividade sobre Strongyloides venezuelensis**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 11 de dezembro de 2019

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): César Corat Ribeiro Prado
RG n.º 32232934-8

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): Silmara Marques Allegretti
RG n.º 14282444-8