

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Departamento de Engenharia de Materiais e Manufatura

LARISSA FERNANDES BATISTA

**Caracterização de nanopartículas de Acetato de
Carvacrila com aplicação Esquistossomicida**

**SÃO CARLOS
2016**

Larissa Fernandes Batista

Caracterização de nanopartículas de Acetato de Carvacrila
com aplicação Esquistossomicida

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo,

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Branciforti

SÃO CARLOS
2016

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

F333c Fernandes Batista, Larissa
 Caracterização de nanopartículas de Acetato de Carvacrila com aplicação Esquistossomicida / Larissa Fernandes Batista; orientador Márcia Cristina Branciforti. São Carlos, 2016.

Monografia (Graduação em Engenharia De Materiais e Manufatura) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Carvacrila. 2. Esquistossomose. 3. Complexos de inclusão. 4. Caracterização. I. Título.

Folha de Julgamento

Dedico este trabalho àqueles que sempre reconheceram e incentivaram meus esforços para chegar até aqui e que representam a base de todas as minhas conquistas: meus amados pais, Maria Helena e Francisco, e minha querida avó Maria.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Márcia Cristina Branciforti pelo apoio para a realização deste Trabalho de Conclusão de Curso.

À Profa. Yvonne Mascarenhas por multiplicar seu vasto conhecimento sempre com muita paciência e dedicação.

À Dra. Ana Carolina Mafud por me inserir neste campo de pesquisa, pelo comprometimento em me auxiliar com os novos assuntos e por todo o trabalho em equipe realizado entre anos de 2015 e 2016.

Aos meus colegas de turma da Engenharia de Materiais e Manufatura 2011, por toda parceria e por tornarem mais leves alguns momentos maçantes da graduação.

Às minhas queridas amigas, Raquel Mascarenhas, Bruna Ribeiro, Catarina Batista, Isadora Dias pelo apoio, incentivo e por serem família nestes anos longe de casa.

RESUMO

BATISTA, L. F. Caracterização de nanopartículas de Acetato de Carvacrila com aplicação Esquistossomicida. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Departamento de Engenharia de Materiais e Manufatura, Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, 2016.

A esquistossomose é causada por vermes do gênero *Schistosoma* e se tornou uma das piores doenças negligenciadas nos dias de hoje, afetando mais de 240 milhões de pessoas em áreas endêmicas. Em escala mundial, o tratamento e controle da esquistossomose são, atualmente, feitos através de uma única droga, o praziquantel, o qual está no mercado há mais de três décadas. Devido ao uso monoterápico desse medicamento, realizado continuamente durante este tempo, casos de resistência à droga foram avaliadas e, por esta razão, novas quimioterapias são urgentemente necessárias. A Carvacrila é um composto presente em óleos essenciais extraídos a partir de diversas espécies de plantas medicinais e aromáticas, a qual tem sido comumente empregada como aditivo e alimento na indústria. Nos últimos anos, as suas múltiplas funções foram estudadas em diferentes campos e a Carvacrila mostrou ter diversas propriedades medicinais, inclusive contra o verme parasita *Schistosma mansoni*, causador da esquistossomose. No entanto, sua administração como fármaco ainda é inviável, uma vez que a Carvacrila é um composto insolúvel, fator que limita sua absorção pelo corpo humano. Um modo de aumentar/modificar a solubilidade desse ativo, e por consequência sua biodisponibilidade, é através da formação de complexos de inclusão, sistemas que viabilizam formas de liberação controlada capazes de aperfeiçoar a farmacocinética e dosagem de substâncias, após serem administradas ao paciente. O trabalho proposto visou o estudo e caracterização físico-química da Carvacrila dentro e fora de complexos de inclusão, de modo que os resultados obtidos possam auxiliar no estabelecimento das relações estrutura-atividade destes compostos para o tratamento da esquistossomose.

Palavras-chave: *Carvacrila; Esquistossomose; Complexos de inclusão; Caracterização estrutural.*

ABSTRACT

BATISTA, L. F. **Chracterization of carvacryl acetate nanoparticles with Schistosomicidal application.** Bachelor Thesis - Departamento de Engenharia de Materiais e Manufatura, Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, 2016.

Schistosomiasis is caused by worms of genus *Schistosoma* which has become the most fatal verminose worldwide, affecting more than 240 million people in endemic regions. On a worldwide scale, Schistosomiasis treatment and control are, currently, dependent upon a single drug, praziquantel, which is on the market for over three decades. Due to its continuous use in monotherapy, conducted throughout this time, cases of drug resistance were evaluated and, therefore, new chemotherapies are urgently needed. Carvacrol is a substance present in essential oils from several species of medicinal and aromatic plants, which has been widely used both as a food or food additive in the food industry for long time. In recent years, its multiple functions were well studied in different fields showing several biological activities, including against the *Schistosoma mansoni* parasite, the causative agent of schistosomiasis. However, Carvacrol is an insoluble compound, making its use unfeasible as a drug. One way to increase the bioavailability of these drugs is to encapsulate their compounds in controlled release forms, such as cyclodextrin nanoparticles, capable of improve the pharmacokinetics and dosage of substances. The proposed work aims to study and characterize the physicochemical properties of Carvacrol and inclusion complexes systems formed by Carvacryl Acetate and Beta-Cyclodextrin, in order to establish the structure-activity relationships of these compounds in the treatment of Schistosomiasis.

Key-words: Carvacryl; Schistosomiasis; Inclusion Complexes; Structural Chracterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i> (SOUZA, 2011)	3
Figura 2 - Representação esquemática da molécula do PZQ	4
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura molecular da Carvacrila	8
Figura 4 - Estrutura molecular da Beta-Ciclodextrina.....	15
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura molecular do sal Acetato de Carvacrila ..	16
Figura 6 - Representação esquemática da reação de acetilação da Carvacrila.....	17
Figura 7 – Espectro de FTIR da Carvacrila.....	19
Figura 8 - Termogramas TGA, curvas (a) TG e (b) DTG da Carvacrila.....	20
Figura 9 - Termogramas TGA, curva TG, para: (a) BCD – Beta-Ciclodextrina e (b) ACC – Acetato de Carvacrila Complexado; curva DTG para: (c) BCD – Beta-Ciclodextrina e (d) ACC – Acetato de Carvacrila Complexado.....	21
Figura 10 - Espectro FTIR: BCD – Beta-Ciclodextrina, ACC: Acetato de Carvacrila Complexado.....	22
Figura 11 - Curvas de DRX para o Acetato de Carvacrila - AC: (a) Curva total; (b) Curva contendo somente os picos.	23
Figura 12 - Curvas DRX: AC - Acetato de Carvacrila, BCD– Beta-Ciclodextrina, ACC – Acetato de Carvacrila Complexada.	24
Figura 13- Curvas de DLS: BCD – Beta-Ciclodextrina, ACC – Acetato de Carvacrila Complexado.....	26
Figura 14–Micrografias MEV do ACC – Acetato de Carvacrila Complexado.....	27
Figura 15 - Ilustração do modelo para o complexo de inclusão de cisplatina em Ciclodextrina (CD) utilizando Polietileno Glicol (PEG). Adaptada de (ZHU et al., 2013).....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atributos vibracionais das bandas de FTIR (FIELD et al., 2002) observadas para a molécula de Carvacrila	19
Tabela 2 - Comparação entre os espectros de FTIR da BCD e ACC.....	23
Tabela 3 - Dados cristalográficos da amostra de AC	24

SUMÁRIO

1.	Esquistossomose: Introdução	1
1.1.	Aspectos epidemiológicos	1
1.2.	Contaminação	1
1.3.	Tratamento e método terapêutico disponível no mercado para controle da doença	4
1.4.	Desenvolvimento de novas drogas	6
2.	Revisão Bibliográfica	8
2.1.	Carvacrila.....	8
2.2.	Complexos de inclusão	9
2.3.	Técnicas para caracterização físico-química de complexos de inclusão	10
3.	Objetivos.....	14
4.	Materiais e métodos experimentais	15
4.1.	Materiais	15
4.1.1.	Carvacrila.....	15
4.1.2.	Beta-Ciclodextrina.....	15
4.2.	Métodos experimentais	15
4.2.1.	Caracterização do óleo essencial da Carvacrila.....	15
4.2.2.	Preparação do Acetato de Carvacrila Complexado	16
4.2.3.	Caracterização do Acetato de Carvacrila.....	17
4.2.4.	Caracterização dos complexos de inclusão	18
5.	Resultados e Discussões	19
5.1.	Caracterização da Carvacrila	19
5.1.1.	Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier	19
5.1.2.	Análise Termogravimétrica	20
5.2.	Complexo de Inclusão Acetato de Carvacrila em Beta-Ciclodextrina	20
5.2.1.	Análise Termogravimétrica	20
5.2.2.	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	22

5.2.3. Difração de Raios-X	23
5.2.4. Espalhamento Dinâmico da Luz e Potencial Zeta	25
5.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	26
6. Conclusões.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. Esquistossomose: Introdução

O presente capítulo tem como objetivo contextualizar o trabalho, tratando da problemática mundial referente à Esquistossomose, uma doença tropical negligenciada, a qual está presente principalmente em países com baixo índice de desenvolvimento. Sua única forma terapêutica disponível no mercado mundial nos dias de hoje é abordada de forma a ressaltar a urgência pelo desenvolvimento de novas drogas com o mesmo fim. Por último, são discutidas as oportunidades para o tratamento de situações patológicas como a Esquistossomose, a partir da projeção de novos sistemas de liberação de fármacos desenvolvidos a partir de produtos naturais.

1.1. Aspectos epidemiológicos

Inserida no contexto das Doenças Tropicais Negligenciadas, a esquistossomose é a segunda doença com o maior número de pessoas infectadas ou em risco, perdendo apenas para a Malária (STEINMANN et al., 2006). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, a esquistossomose ainda é um problema de saúde pública em várias partes do mundo, a qual, no ano de 2013, foi reportada presente em 78 países, como Brasil, China, países do Oriente Médio e, principalmente, do continente africano, onde 91% de sua população se encontram sob o risco de contrair a doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Hoje em dia, a esquistossomose tem prioridade baixa nas ações estaduais e federais de saúde pública, estando intimamente associada à pobreza, uma vez que os mais afetados são pessoas com condições de vida vulneráveis, com baixo nível de escolaridade e renda, que vivem em zonas remotas, rurais, favelas ou em zonas de conflito (CHOFFNES et al., 2011). A doença afeta negativamente o desempenho escolar e a debilitação causada pela infecção não tratada prejudica o desenvolvimento social e econômico das áreas fortemente afetadas (WEISBROD, 1973; NOKES et al., 1999; STEINMANN et al., 2006; TANNER, 1989).

1.2. Contaminação

A infecção no homem pode ser causada por seis espécies do verme achatarado do grupo dos trematódeos do gênero *Schistosoma*. Dessas seis espécies, apenas o *S. mansoni* existe no Brasil, o qual foi introduzido pelo comércio de escravos africanos no continente americano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O parasita apresenta como hospedeiro intermediário o caramujo de água doce do gênero *Biomphalaria* e como hospedeiro definitivo o homem, possuindo diferentes estágios de desenvolvimento durante seu ciclo de vida, sendo os

esquistossômulos, cercarias, esporocistos, miracídios, ovos e vermes adultos, cada um com características peculiares (SOUZA, 2011). A doença pode evoluir de formas assintomáticas até formas clínicas extremamente graves (ASH; ORIHEL, 1997).

Em seu ciclo biológico, Figura 1, o verme alterna fases assexuadas e sexuadas de reprodução. No homem, o *S. mansoni* vive dentro do sistema mesentérico na sua forma adulta e sexuada, onde macho e fêmea copulam, ocorrendo a fecundação da fêmea. Neste estágio, as fêmeas fecundadas, isoladas ou acopladas ao macho, migram pela corrente sanguínea e iniciam a postura dos ovos na parede intestinal. Esses ovos levam de seis a sete dias para se tornarem maduros e, então, chegarem a luz intestinal. Os ovos que atingem esse estágio são liberados do corpo juntamente com o bolo fecal. Ao caírem na água, o miracípio é então liberado e este, por sua vez, penetra nos moluscos do gênero *Biomphalaria*, os hospedeiros intermediários, continuando seu desenvolvimento. No caramujo, o miracípio se transforma em esporocistos, que dão origem a numerosas larvas – as cercarias – por reprodução assexuada. Essas larvas saem do molusco através de seu tegumento e são liberadas na água, completando o ciclo no hospedeiro intermediário que leva de três a cinco semanas (CUNHA, 1970). Ao ficarem livres, elas nadam até serem atraídas pelo hospedeiro definitivo, o homem, penetrando-o através da pele, quando em contato com meios contaminados, ou das mucosas, quando a água infectada é ingerida. As larvas que adentram o corpo humano são denominadas equistossômulos, os quais, por via sanguínea, são levadas passivamente para o coração, pulmão, até alcançarem as alças intestinais. Lá se desenvolvem, reproduzem e depositam ovos, que são liberados pelas fezes, 40 dias após a infecção do hospedeiro definitivo.

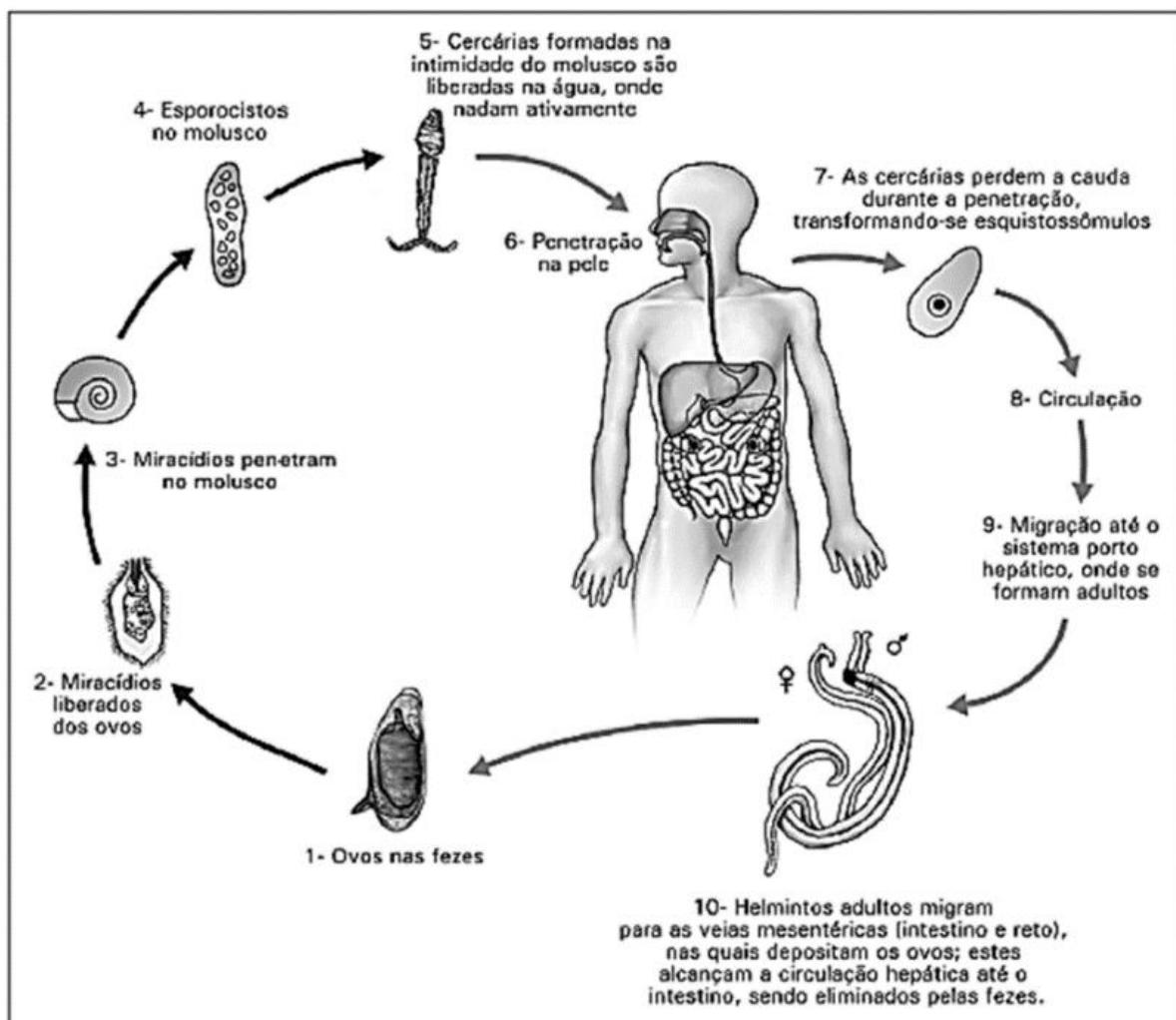


Figura 1 - Ciclo de vida do *S. mansoni* (SOUZA, 2011)

A sintomatologia clínica da doença depende do seu estágio de evolução no homem. A fase aguda pode ser assintomática ou apresentar-se como dermatite cercariana caracterizada por micropápulas eritematosas e pruriginosas. Na fase crônica, geralmente sintomática, episódios de diarréia podem alternar-se com períodos de prisão de ventre. A doença também pode evoluir para um quadro mais grave, com o aumento do fígado (hepatomegalia) e cirrose, aumento do baço (esplenomegalia), hemorragias provocadas pelo rompimento das veias do esôfago e ascite, isto é, dilatação abdominal por escape de plasma sanguíneo. Estes parasitas podem viver por anos ou mesmo décadas em hospedeiros humanos e, portanto, a doença ocorre em um curso crônico e debilitante (COLLEY et al., 2014; COLLEY; SECOR, 2014).

1.3. Tratamento e método terapêutico disponível no mercado para controle da doença

Atualmente, o tratamento e controle da Esquistossomose no mundo dependem unicamente de uma droga, o Praziquantel (PZQ), também conhecido como (RS)-2-(ciclo-hexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino-[2,1-a]-isoquinolina-4-ona (Figura 2). O medicamento é um pó cristalinoável em condições normais de temperatura e armazenamento, sem cor e cheiro e de sabor amargo característico (CAFFREY, 2007; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008; DOENHOFF; PICA-MATTOCCIA, 2006), o qual foi introduzido na prática clínica há mais de 30 anos (SECOR; COLLEY, 2005). O PZQ é comumente encontrado como uma mistura racêmica 1:1 de enantiômeros R e S, no entanto somente o enantiômero R é ativo contra o parasita causador da esquistossomose (CIOLI, 1998; FENWICK et al., 2003; GREENBERG, 2005; XIAO et al., 1999). A quiralidade característica da molécula de PZQ pode ser visualizada através da Figura 2, que apresenta o carbono assimétrico demarcado por "*".

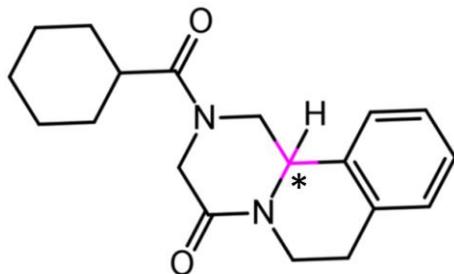


Figura 2 - Representação esquemática da molécula do PZQ

O mecanismo de ação do PZQ ainda não é totalmente esclarecido, porém sabe-se que a droga interrompe a homeostase do Ca^{2+} no tegumento dos vermes adultos, causando espasmos e paralisia muscular após alguns minutos de exposição ao medicamento (CIOLI, 1998; GREENBERG, 2005).

Os fatores que contribuíram para a utilidade e o longo uso do PZQ até então se sustentam no fato das suas boas propriedades farmacológicas e sua eficácia após uma única administração de aproximadamente 40-60 mg/kg, a qual é suficiente para atingir taxas de cura de 60 a 90% (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003), facilitando a administração e adesão ao tratamento pelos pacientes, especialmente quando são crianças (ABDULLA et al., 2009). O medicamento também apresenta ausência de toxicidade e um substancial custo reduzido (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003; FENWICK; WEBSTER, 2006; HAGAN et al., 2004),

no entanto, muitas desvantagens em relação ao seu uso monoterápico vêm sendo avaliadas. Especialistas vêm investigando evidências relacionadas ao fato do PZQ apresentar apenas um pequeno impacto sobre a redução da transmissão da doença, além de um perigo relacionado ao desenvolvimento de resistência à droga em grande escala (BERGQUIST; UTZINGER; MCMANUS, 2008; DOENHOFF et al., 2008; MCMANUS; LOUKAS, 2008). Além disso, o fármaco não é ativo sobre todas as formas do parasita, devido às diferenças fisiológicas e morfológicas significativas durante o ciclo de vida do verme (KEATING; WILSON; SKELLY, 2006; SHUHUA et al., 2000; XIAO et al., 2002), e, por causa disso, há a ocorrência de muitos casos de prevalência da doença nas pessoas infectadas, dentro de um período de 6 a 8 meses, mesmo após a quimioterapia com o PZQ.

Enquanto o PZQ é ativo contra todas as espécies do parasita da esquistossomose que contaminam o homem, existem outras drogas limitadas ao tratamento da doença, quando a contaminação acontece por meio de uma espécie do verme em particular (ABDUL-GHANI et al., 2009). É o caso do Oxamnique, um derivado da tetra-hidroquinolina lançado no final dos anos 60, cujo mecanismo de ação está associado à inibição irreversível da síntese de ácido nucléico no parasita. (PICA-MATTOCCIA; CIOLI; ARCHER, 1989). O Oxamnique apresenta atividade contra a espécie *S. mansoni* e, por esta razão, é a principal droga escolhida para controle da esquistossomose no Brasil (ABDUL-GHANI et al., 2009; FENWICK et al., 2003). Assim como para o PZQ, casos de resistência ao Oxamnique também vem sendo avaliados (KATZ et al., 1973; PICA-MATTOCCIA et al., 1989; PICA-MATTOCCIA et al., 1993), e novos estudos têm sido solicitados e conduzidos, principalmente na América Latina (ABDUL-GHANI et al., 2009), onde a droga é extensivamente administrada.

No contexto mundial, a dependência de poucos medicamentos para tratar uma população de mais de 60 milhões de pessoas infectadas e mais de 250 milhões de pessoas ao longo de três continentes sob risco de contrair a doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016) aparenta ser uma situação particularmente perigosa, considerando que casos de resistência à droga já vem acontecendo. Neste sentido, os esforços para o tratamento efetivo da esquistossomose devem abordar a implementação de medidas que busquem contornar as desvantagens relacionadas ao uso monoterápico do PZQ. A mais promissora dessas medidas se baseia no desenvolvimento de drogas alternativas para o tratamento e prevenção da esquistossomose, eficazes contra as diferentes formas do parasita causador da doença.

1.4. Desenvolvimento de novas drogas

A existência de poucas drogas disponíveis comercialmente para o tratamento e controle da esquistossomose é claramente uma situação alarmante, uma vez que evidências da insusceptibilidade e resistência a esses medicamentos já existem (COUTO et al., 2011; FALLON; DOENHOFF, 1994; FALLON et al., 1995; FENWICK et al., 2003; ISMAIL et al., 1996; ISMAIL et al., 1994; KATZ et al., 1973; MELMAN et al., 2009; PICA-MATTOCCIA et al., 1989; PICA-MATTOCCIA et al., 1993). A necessidade de novas drogas esquistosomicidas é bastante evidente, e exige urgência, uma vez que a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos é um processo de duração imprevisível, mas certamente mensurável em vários anos.

A este respeito, muitos centros de investigação científica ao redor do mundo estão explorando plantas medicinais, devido à crença global de sua eficácia no tratamento de doenças infecciosas, principalmente em regiões onde os casos acontecem de forma endêmica (ALLEGRETTI et al., 2012; KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2003; MORAES, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2012). Esses produtos naturais (PNs) apresentam estrutura diversa e servem como uma fonte valiosa para novos *scaffolds* moleculares no desenvolvimento de fármacos. O termo “*scaffold molecular*” se refere ao núcleo estrutural principal da molécula (SCHUFFENHAUER; VARIN, 2011). Cerca de 65% das drogas aprovadas são classificadas como PNs ou são inspiradas por um PN (NEWMAN; CRAGG, 2012). Dessa forma, acredita-se que os PNs apresentem características vantajosas no desenvolvimento de novas classes de drogas esquistosomicidas devido a sua melhor, e bem documentada, cobertura química em relação aos compostos sintéticos (BOHLIN et al., 2010; HARVEY, 2008; HARVEY et al., 2010).

Dentre esses produtos naturais, extratos, óleos e compostos com diferentes grupos químicos de várias plantas já foram testados e comprovados em relação a potencial atividade terapêutica contra a infecção pelo *Schistosoma*, incluindo derivados da Artemisinina e diferentes tipos de terpenóides e alcalóides (NEVES; ANDRADE; CRAVO, 2015). No entanto, devido ao fato de a esquistossomose ser uma doença negligenciada, poucos estudos tem focado no isolamento, caracterização e avaliação, visando relacionar esses resultados à estrutura-atividade desses compostos e a sua administração como fármaco. Neste sentido, o trabalho aqui apresentado pretende contribuir e acelerar as estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos naturais com ação contra o parasita da esquistossomose, através do entendimento de suas características químicas e físicas principais.

O estudo foi desenvolvido junto ao grupo de pesquisa liderado pela Dra. Ana Carolina Mafud e coordenado pela Profa. Dra. Yvonne Primerano Mascarenhas possui longa experiência com o uso da metodologia indicada para análise de dados de difração de raios-X, além de trabalhos já publicados referentes à caracterização de drogas esquistossomicidas (CARDOSO et al., 2014; CARVALHO et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015).

2. Revisão Bibliográfica

As características da Carvacrila, composto estudado no presente trabalho, já contidas em bibliografias disponíveis, e as formas viáveis para sua aplicação, como a encapsulação em nanopartículas formando complexos de inclusão, são apresentadas no presente capítulo. Além disso, os principais referenciais teóricos sobre os métodos de caracterização de compostos orgânicos e nanopartículas são revisados de forma a demonstrar a importância do estudo de novos compostos, por meio de diferentes técnicas de análise, no desenvolvimento de fármacos.

2.1. *Carvacrila*

A Carvacrila é um monoterpeno fenólico presente em óleos essenciais extraídos a partir de várias espécies de plantas medicinais e aromáticas, como o orégano, o tomilho e a bergamota selvagem, e tem sido largamente utilizada como aditivo ou até mesmo como alimento na indústria alimentícia por muito tempo. De nome químico 5-isopropil-2-metilfenol e fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$, representada na Figura 3, o composto apresenta densidade de 0,976 g/mL e solubilidade em etanol, éter e acetona (PUBCHEM COMPOUND DATABASE, 2016).

Nos últimos anos, as suas múltiplas funções foram estudadas em diferentes campos (BASER, 2008). A Carvacrila mostrou várias atividades biológicas como antioxidante (ANTHONY; DEOLU-SOBOGUN; SALEH, 2012; CLEFF et al., 2010; SOKOVIC et al., 2010), antiviral (LAI et al., 2012), bactericida, fungicida (AHMAD et al., 2011), e também propriedades inseticidas (CETIN; YANIKOGLU, 2006; TANG; CHEN; WANG, 2011) e acaricidas (COSKUN et al., 2008). Além disso, este composto tem demonstrado possuir atividades anti-protozoários contra os parasitas *Giardialamblia* (MACHADO et al., 2010), *Leishmaniachagasi* e *Trypanosoma cruzi* (ESCOBAR et al., 2010). No entanto, embora a carvacrila seja amplamente utilizada e bem conhecida por suas propriedades medicinais, este produto natural tem sido pouco investigado por seu potencial anti-helmíntico (BASER, 2008).

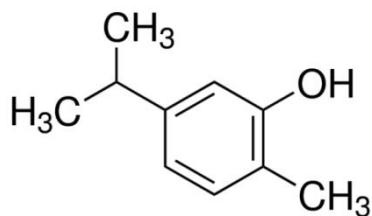


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura molecular da Carvacrila

A atividade da Carvacrila em vermes adultos de *Schistosoma mansoni* já foi comprovada em trabalhos anteriores (DE MORAES et al., 2013), porém, este composto é insolúvel, o que diminui sua biodisponibilidade e dificulta sua administração como fármaco. Visando superar tais limitações, estratégias envolvendo o desenvolvimento de sistemas de transporte adequados, como a encapsulação da carvacrila em compostos em complexos de inclusão de dimensões nanométricas, vem sendo estudadas (QUELHAS, 2012). Deste modo, o seu destino não é determinado pelas propriedades do mesmo, mas sim pelo seu sistema de transporte, que deverá permitir a liberação localizada e controlada do fármaco, de acordo com as necessidades específicas da terapêutica.

2.2. Complexos de inclusão

A área de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos tem aumentado exponencialmente, na atualidade, passando por um crescimento explosivo aliado ao fato de se tornar cada vez mais evidente que a produção de novos fármacos por si só não é suficiente para garantir o progresso de uma terapia (MEHNERT; MADER, 2001; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). De fato, a obtenção de bons resultados em testes experimentais *in vitro* é muitas vezes seguida de resultados *in vivo* desapontantes. A concentração insuficiente de fármaco devido a uma fraca absorção ou rápido metabolismo e eliminação, a sua distribuição para outros tecidos combinada com a sua toxicidade, a baixa solubilidade excluindo a aplicação intravenosa de soluções aquosas, a elevada flutuação dos níveis plasmáticos devido à imprevisível biodisponibilidade após administração oral são alguns dos fatores cruciais que podem provocar a falha de um sistema terapêutico (MEHNERT; MADER, 2001; QUELHAS, 2012).

Neste contexto, os complexos de inclusão, entidades formadas pela montagem de um complexo entre uma molécula receptora (macromolécula) e uma molécula que sofrerá a inclusão (pequena molécula), surgem como uma técnica promissora para a projeção de novos sistemas de liberação de fármacos e oferecem oportunidades para o tratamento de várias situações patológicas (QUELHAS, 2012). A estratégia utilizada é suportada em superar as limitações relacionadas à entrega do fármaco, envolvendo o desenvolvimento de sistemas de transporte adequados, permitindo a liberação localizada e controlada da droga, de acordo com as necessidades específicas.

Dentre as macromoléculas receptoras comumente utilizadas na formação de complexos de inclusão, as ciclodextrinas são conhecidas por permitirem a encapsulação molecular de fármacos com características hidrofóbicas (SALTÃO; VEIGA, 2001). Esses

compostos são oligossacarídeos cílicos solúveis em água que possuem a capacidade de formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares, incrementando de forma exponencial sua solubilidade aquosa. A aptidão de encapsular fármacos proporciona importantes incrementos na biodisponibilidade e estabilidade de inúmeras formas farmacêuticas (SÁ BARRETO; CUNHA FILHO, 2008). Além disso, a utilização de partículas de complexos de inclusão em nanosistemas permite ampliar as opções de fármacos aptos à atuação vetorizada e prolongada destes sistemas na superfície das membranas biológicas, com redução dos efeitos colaterais e das doses administradas (DUCHENE; PONCHEL; WOUESSIDJEWE, 1999; SÁ BARRETO; CUNHA FILHO, 2008), além de serem peças chaves na elaboração de biosensores protéicos capazes de reconhecimento tecidual ou celular que permite ativar os mecanismos de liberação do fármaco somente no sítio de ação.

2.3. Técnicas para caracterização físico-química de complexos de inclusão

As nanopartículas têm recebido grande atenção como uma ferramenta promissora capaz de funcionar como sistemas de entrega controlada de fármacos, através da formação de complexos de inclusão. Tais partículas em escala nanométrica são atrativas, pois o seu tamanho reduzido pode ser utilizado como estratégia para controlar a solubilidade/permeabilidade, agindo favoravelmente à difusão passiva na superfície das membranas biológicas (PATHAK; THASSU, 2009).

A caracterização e o entendimento das propriedades dos complexos de inclusão são fundamentais para o desenvolvimento de sistemas eficazes. Estratégias racionais para caracterização de nanopartículas com aplicações biomédicas envolvem três elementos: caracterização físico-química, ensaios *in vitro* e estudos *in vivo* (MCNEIL, 2011). Cada uma dessas análises tem sua parcela essencial para uma ampla compreensão da segurança e eficácia da nanopartícula, sendo impossível obter interpretações dos resultados *in vitro* e *in vivo* sem conduzir uma cuidadosa caracterização das propriedades físico-químicas do composto.

Tais propriedades físico-químicas dos complexos de inclusão podem afetar drasticamente o comportamento das nanopartículas nos sistemas biológicos e influenciar biodistribuição, segurança e eficácia dos compostos (MCNEIL, 2011). No geral, essas propriedades são caracterizadas em termos de peso molecular, composição química, pureza, estabilidade, solubilidade, tamanho, estado de agregação, as quais podem fornecer as bases para um melhor

entendimento das relações entre estrutura e atividade dos sistemas de liberação controlada. Hoje em dia, a instrumentação para determinar propriedades físico-químicas encontra-se bem estabelecida e as técnicas, em sua maioria, são padronizadas.

No presente trabalho, diferentes técnicas experimentais foram utilizadas para determinar as principais propriedades físico-químicas dos complexos de inclusão sob estudo. A seguir, tem-se uma breve descrição sobre cada técnica, apresentando a relação entre os resultados obtidos e as referentes propriedades. No total, sete técnicas de caracterização comuns no estudo de nanopartículas foram empregadas.

- Análise Termogravimétrica (Thermogravimetric Analysis - TGA):

Uma análise termogravimétrica consiste, basicamente, em monitorar a mudança de peso de uma amostra, conforme a mesma é aquecida sob atmosfera específica (HORNYAK, 2009). Resultados gráficos, denominados termogramas, de TGA geralmente apresentam o percentual de perda de massa *versus* temperatura e revelam informações a respeito da estabilidade térmica, composição (pureza), e taxas de reação (HILLIG, 1984).

- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR):

Consiste em uma das poucas técnicas que permitem analisar dado quanto à composição e estado químico da camada superficial das nanopartículas. A técnica se baseia na absorção, por uma amostra, de comprimento de onda infravermelho, o qual excita as vibrações interatômicas (CHOW; NOSKOVA, 1998). A energia das vibrações correspondente ao comprimento de onda absorvido depende da natureza das ligações dos grupamentos químicos e funciona como uma “impressão digital” para a identificação dos mesmos. Para o caso dos complexos de inclusão, o FTIR é uma ferramenta útil para evidenciar variações nas moléculas dos complexos, em decorrência da inserção do fármaco.

- Difração de Raios-X (DRX):

É um poderoso método analítico que revela dados relacionados à estrutura cristalina dos materiais. O experimento consiste na coleta dos dados de posição e intensidade de raios-X apresentando comprimento de onda específico os quais, após serem incididos diretamente na amostra, são difratados pelos átomos que formam um arranjo regular (cristalino) no material.

A análise pode ser conduzida a partir de uma amostra do nanomaterial na forma de pó, na qual os cristais encontram-se distribuídos randomicamente (HORNYAK, 2009).

Os dados são agrupados em um gráfico, denominado difratograma, relacionando intensidade dos raios-x difratados com o ângulo de difração. A partir da análise dos picos apresentados na curva de difração, se pode obter características estruturais como parâmetros de cela unitária, a estrutura cristalina, simetria e grupo espacial, tamanho de cristalito, entre outros. Para o caso da análise de amostras semi-cristalinas, também consegue-se calcular o percentual de cristalinidade.

- Espalhamento Dinâmico da Luz (Dynamic Light Scattering - DLS):

A técnica de espalhamento dinâmico da luz é comumente utilizada para analisar nanopartículas. O método permite determinar as distribuições relacionadas ao tamanho das partículas dispersas em um líquido com índice de refração e viscosidade conhecidos.

O processo experimental consiste no espalhamento da luz incidente pela superfície das pequenas partículas. A intensidade da luz espalhada em diversas direções é então coletada em função do tempo. O DLS mede o movimento Browniano das partículas e relaciona tal informação com o tamanho das mesmas (HORNYAK, 2009).

- Potencial Zeta (PZ):

Consiste na técnica que avalia a carga da superfície de partículas dispersas em uma solução. As nanopartículas apresentam uma carga de superfície, a qual atrai íons de carga oposta para esta região, formando uma dupla camada que acompanha a partícula conforme esta difunde através da solução. O potencial Zeta consiste no potencial elétrico na fronteira entre a dupla camada e sua análise consistem em uma ferramenta muito útil para entender o estado de superfície da nanopartícula e suas modificações, bem como otimizar sua formulação e predizer a estabilidade desse material à longo prazo (KUMAR; KUMBHAT, 2016)

O PZ de uma amostra pode ser calculado a partir da medida da mudança de fase da luz espalhada pela superfície das partículas se movendo sob influência de um campo elétrico (KUMAR; KUMBHAT, 2016).

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

A MEV consiste em uma técnica de microscopia de elevada resolução. Seu princípio de funcionamento emprega a aceleração de um feixe de elétrons, através da aplicação de uma diferença de potencial. Após a correção do percurso e do foco dos feixes de elétrons pelas lentes condensadoras e objetivas do aparelho, os elétrons atingem a amostra analisada (HORNYAK, 2009). É feita, então, a varredura do feixe de elétrons através da superfície da amostra e tal dado é utilizado para se obter a imagem reconstruída.

A imagem obtida diz respeito ao aspecto topográfico da nanopartícula em estudo, e tal dado é importante para análise da forma, estado de agregação ou até mesmo determinar as dimensões das partículas com ajuda de *software* específico. Para o presente trabalho, em específico, o MEV foi importante também para confirmar a inclusão da molécula do fármaco dentro do complexo de inclusão.

3. Objetivos

O objetivo principal do trabalho é contribuir com o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da Esquistossomose, através da determinação e entendimento das principais propriedades físico-químicas da Carvacrila isolada, e do complexo obtido pelo Acetato de Carvacrila com Ciclodextrina. Para isso, diferentes técnicas analíticas, como FTIR, TGA, DRX, DLS, ZP e MEV foram empregadas visando explorar as características desses compostos. Como objetivos específicos, os seguintes pontos de análise são propostos:

- Caracterização estrutural do sal Acetato de Carvacrila via DRX e determinação da qualidade do processo de síntese desse sal a partir do óleo essencial da Carvacrila;
- Validação do método de formação dos complexos de inclusão de Acetato de Carvacrila em Beta-Ciclodextrina, através de TGA, FTIR e DRX, comparando os dados obtidos para os compostos isolados e para o complexo;
- Análise da estabilidade, tamanho e forma das nanopartículas do complexo de inclusão por DLS, PZ e MEV.

Além disso, a análise será conduzida com especial atenção para a proposição de melhorias, tanto em relação ao estudo do composto para alguma propriedade específica, quanto para os métodos de síntese utilizados para a produção do Acetato de Carvacrila e o método de formação do complexo de inclusão.

4. Materiais e métodos experimentais

4.1. *Materiais*

4.1.1. *Carvacrila*

A Carvacrila (5-isopropil-2metilfenol) – ou Carvacrol – é um fenol monoterpênico (Figura 3) produzido a partir de várias plantas aromáticas, incluindo o tomilho e o orégano (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015) e possui peso molecular de 150,22 g/mol.

4.1.2. *Beta-Ciclodextrina*

Classificada como oligossacarídeos cíclicos, a Beta-Ciclodextrina (BCD) é um composto solúvel em água, que apresenta capacidade de formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares. Tais complexos são responsáveis pela maior estabilidade e biodisponibilidade de muitas fórmulas farmacêuticas administradas nos dias de hoje. A estrutura molecular da Beta-Ciclodextrina, com fórmula química $C_{48}H_{80}O_{40}$ e peso molecular 1.297,12 g/mol, é representada na Figura 4.

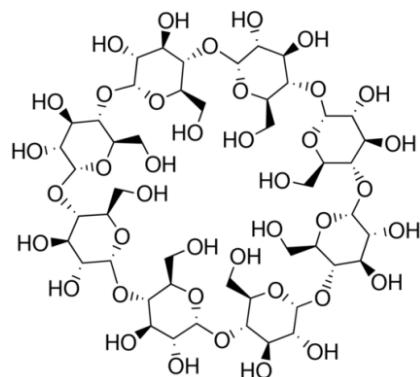


Figura 4 - Estrutura molecular da Beta-Ciclodextrina

Vale ressaltar que ambos os compostos, Carvacrila e BCD, são produtos comerciais e foram cedidos pelo Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental da Universidade Federal do Piauí (LAPNEX – UFPI), liderado pelo Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas.

4.2. *Métodos experimentais*

4.2.1. *Caracterização do óleo essencial da Carvacrila*

O óleo essencial da Carvacrila foi caracterizado através das técnicas de FTIR e TGA.

Os espectros de FTIR foram coletados utilizando janela de KBr em um espectrômetro da Shimadzu modelo IRAffinity-1 e número de onda na faixa espectral de 4000 – 400 cm^{-1} ,

comumente utilizada para caracterização de compostos orgânicos, e resolução de $\pm 4\text{cm}^{-1}$. A partir do espectro de número de onda *versus* frequência foram identificados os principais grupos orgânicos presentes na molécula.

A análise termogravimétrica da amostra foi realizado em instrumento da marca PerkinElmer modelo Pyris 1 TGA na faixa de temperatura de 30 - 700°C, taxa de aquecimento de 10°C/min, atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 20 mL/min e amostra com massa inicial de 3,877 mg.

4.2.2. *Preparação do Acetato de Carvacrila Complexado*

O Acetato de Carvacrila Complexado (ACC) foi preparado no LAPNEX – UFPI e amostras foram cedidas para análise juntamente com o sal Acetato de Carvacrila (AC), Figura 5, produzido a partir do óleo essencial da Carvacrila. A seguir, apresenta-se o método de obtenção desses produtos.

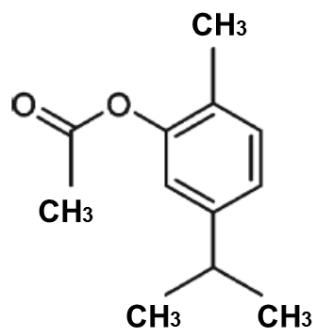


Figura 5 - Representação esquemática da estrutura molecular do sal Acetato de Carvacrila

A produção do AC foi feita baseando-se no método de acetilação proposto por (AHLUWALIA; DHINGRA, 2005) usando o ácido salicílico, a partir da reação química apresentada na Figura 6. O procedimento foi realizado adicionando-se 10 mL de anidrido acético a 5,1 mL de Carvacrila, seguidos da adição de 10 gotas de ácido sulfúrico. O sistema foi então aquecido a 55°C em banho-maria e mantido sob agitação por 30 minutos.

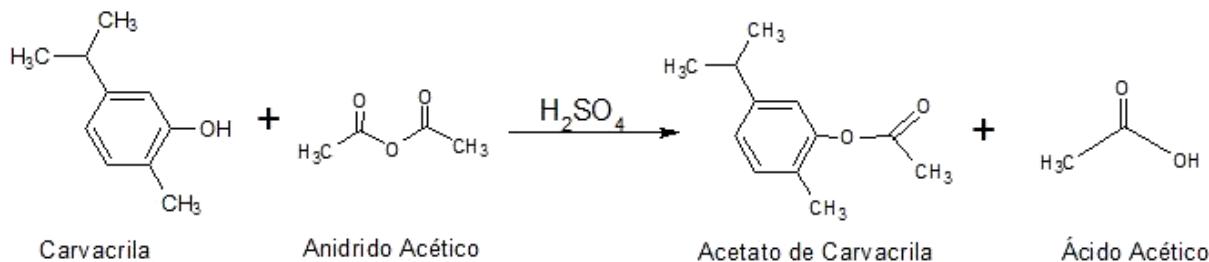


Figura 6 - Representação esquemática da reação de acetilação da Carvacrila

A fase orgânica foi extraída em um funil de separação, ao qual foi adicionado 50 mL de água destilada a mistura reacional, e em seguida foi adicionado 3 vezes 50 mL de clorofórmio. Após coletada, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada à pressão reduzida em rota-evaporador marca Fisatom, modelo 550 e série 226600.

A formação de complexo de inclusão ACC foi realizada a partir do processo de malaxagem. O método consiste na formação de uma pasta com ajuda de um almofariz e pistilo, utilizando uma quantidade mínima de líquido para umedecer a mistura em pó. Neste procedimento, o AC foi incluído na macromolécula de BCD utilizando-se água para formação da pasta. Após a complexação do composto, a pasta preparada foi seca por liofilização.

4.2.3. Caracterização do Acetato de Carvacrila

A estrutura cristalina do sal AC foi analisada através da amostra policristalina. Os padrões de difração DRX foram obtidos para amostras do sal AC no equipamento a Rigaku Ultima IV, utilizando radiação de cobre ($CuK\alpha$), na faixa 2θ de 3 a 80° , modo de varredura com passo de $0,02^\circ$ e tempo de exposição de 5 segundos por passo. A estrutura cristalina e porcentagem de cristalinidade foram calculadas a partir dos resultados obtidos. Os parâmetros da célula unitária foram obtidos através do método dicotômico (BOULTIF, 2005) no software DICVOL06 (BOULTIF; LOUER, 2004) e ReX.Cell (BORTOLOTTI; LONARDELLI, 2013). A porcentagem de cristalinidade (C) foi calculada a partir da Equação 1 após obtenção da área (total e dos picos) do difratograma por integração.

$$C = \frac{\text{Área dos picos}}{\text{Área total}} \times 100\% \quad (1)$$

4.2.4. Caracterização dos complexos de inclusão

O ACC foi caracterizado por várias técnicas largamente utilizadas para estudo de nanopartículas. Eventos térmicos relacionados ao aquecimento até degradação do composto foram analisados por TGA. As análises por meio de FTIR, DRX, DLS, ZP e MEV foram conduzidas a fim de determinar se o AC realmente estava incluído nas moléculas de BCD, formando os complexos de inclusão.

A análise termogravimétrica da amostra de ACC, assim como a análise de FTIR das amostras em pó de BCD e ACC foram realizadas sob as mesmas condições experimentais e utilizando os mesmos equipamentos utilizados para analisar o óleo essencial de Carvacrila.

Os padrões de difração DRX foram obtidos para amostras de BCD e ACC utilizando as mesmas condições do experimento realizado para a amostra de AC, visando comparar o comportamento das amostras em relação à cristalinidade.

Medidas de DLS foram conduzidas em um equipamento ZetaSizer Nano ZS-90 da marca Malvern®, operando a 25°C com detector posicionado a 90° em relação ao feixe incidente. A duração da aquisição da luz espalhada foi de aproximadamente 10 segundos (modo automático do aparelho). Foram realizadas medidas em triplicata para as amostras de BCD e ACC, ambos dissolvidos em água na proporção 1:20 aproximadamente. As medidas de PZ foram realizadas no mesmo aparelho e para as mesmas amostras, dispondo 750 µL de cada amostra em uma célula descartável de policarbonato, contendo contatos metálicos banhados a ouro e específicas para tal análise.

Experimentos de MEV foram realizados utilizando-se microscópio Carl Zeiss modelo Supra 35, usando feixe de 2,0 kV. Amostras policristalinas de ACC foram alocadas em uma fita adesiva de carbono e as imagens da morfologia da superfície das amostras foram obtidas em temperatura ambiente.

5. Resultados e Discussões

5.1. Caracterização da Carvacrila

5.1.1. Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier

A Figura 7 mostra o espectro obtido para o óleo essencial da Carvacrila a partir da análise por FTIR. É possível observar bandas referentes ao alongamento e flexão das entidades químicas fenol e benzeno presentes na molécula e os atributos de cada principal pico encontrado no espectro (FIELD *et al.*, 2002) são descritos na Tabela 1.

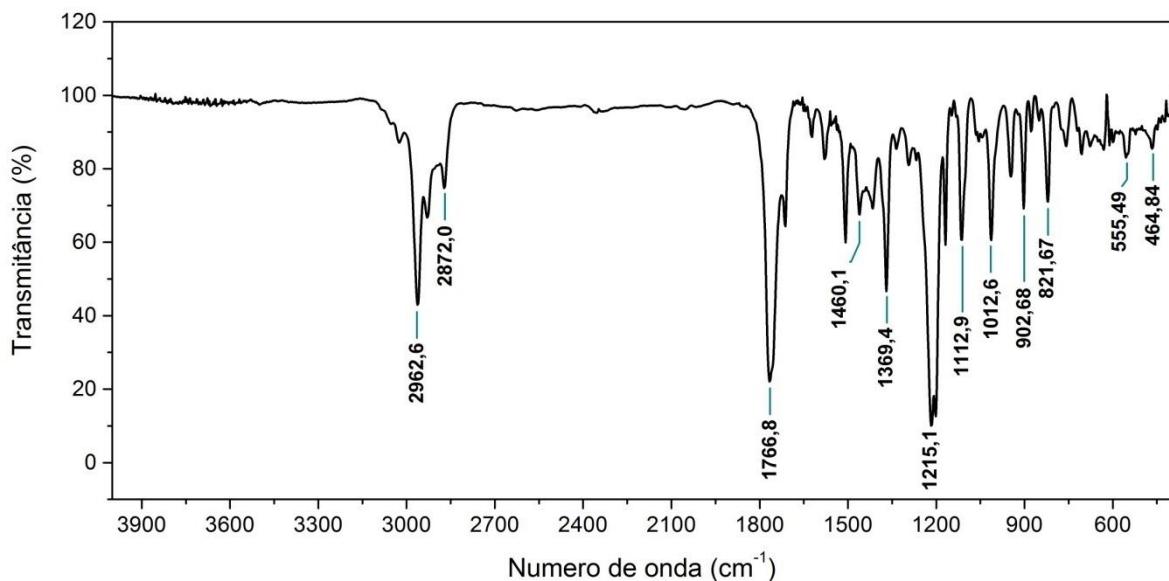


Figura 7 – Espectro de FTIR da Carvacrila

Tabela 1 - Atributos vibracionais das bandas de FTIR (FIELD *et al.*, 2002) observadas para a molécula de Carvacrila

Número de onda (cm ⁻¹)	Atributo
2962,6	Alongamento (C-H) – CH ₃
2872,0	Alongamento (C-H) – CH ₃
1766,8	Alongamento (C=C) – Benzeno
1460,1	Alongamento (C=C) – Benzeno
1369,4	Flexão (O- H)– Fenol
1215,1	Alongamento (C-O) – Fenol
1112,9	Flexão (C-H) no plano – Benzeno
1012,6	Flexão (C-H) no plano – Benzeno
902,68	Flexão (C-H) fora de plano - Benzeno
821,67	Flexão (C-H) fora de plano - Benzeno
555,49	Flexão (C-C-C) em fase no Benzeno
464,84	Flexão de toda a estrutura

5.1.2. Análise Termogravimétrica

As curvas TG e DTG obtidas por TGA para o óleo essencial da Carvacrila é mostrado na Figura 8. A perda de massa acontece através da volatilização dos produtos de degradação térmica em apenas um evento, que ocorre na faixa de temperatura entre $T_{onset}=30^{\circ}\text{C}$ e $T_{endset}=152^{\circ}\text{C}$. A temperaturas acima de 152°C , o óleo essencial da Carvacrila se decompõe completamente e o teor de resíduo é inferior a 1%. Dados encontrados para degradação térmica da Carvacrila (SHEMESH et al., 2015; GUIMARAES et al., 2015) mostram eventos relacionados à perda de massa ocorrendo até aproximadamente 170°C , valor 18°C superior a temperatura de decomposição completa do composto encontrada no presente estudo. Tal diferença pode estar associada à presença de outros compostos no óleo essencial, os quais se degradam desde o início do aquecimento.

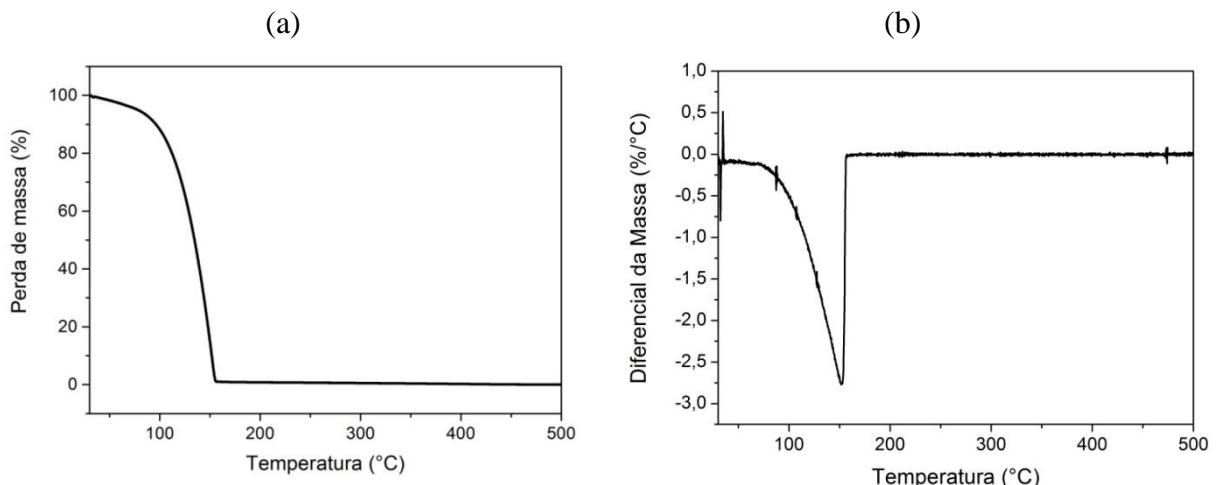


Figura 8 - Termogramas TGA, curvas (a) TG e (b) DTG da Carvacrila

5.2. Complexo de Inclusão Acetato de Carvacrila em Beta-Ciclodextrina

5.2.1. Análise Termogravimétrica

As curvas TG e DTG obtidas por análise termogravimétrica para a BCD e para o ACC são mostradas na Figura 9. Ambas as curvas apresentam comportamento semelhante e a perda de massa pode ser observada ocorrendo em duas etapas principais: a primeira abaixo de 100°C e a segunda principalmente entre $300 - 370^{\circ}\text{C}$. Por análise comparativa, os termogramas permitem concluir que a perda de massa relacionada ao sal de AC está concentrada no primeiro evento térmico.

No primeiro evento, Figura 9 (b) e (d), que acontece entre $T_{onset} = 30^{\circ}\text{C}$ e $T_{endset} = 97^{\circ}\text{C}$, o total de 15% da perda de massa corresponde aos 10% da perda de massa da BCD, resultado

que pode ser visto nas curvas TG e DTG, Figura 9 (a) e (c), para a BCD e provavelmente é um evento atribuído à evaporação da água superficial da molécula (TROTTA et al., 1999), mais 5% adicionais, que está relacionada a degradação térmica do ACC.

O segundo evento térmico com $T_{onset}=320^{\circ}\text{C}$ está relacionado quase que exclusivamente à degradação térmica da cadeia polimérica das moléculas de BCD. Nesta etapa uma perda de massa de aproximadamente 70-80% é observada em ambos os termogramas (Figura 9 (a) e (b)). Acima de 370°C a perda de massa continuada de aproximadamente 15% , só é vista no termograma do complexo de inclusão, Figura 9 (b), está relacionada à degradação térmica das moléculas do sal AC. Observa-se, no entanto, que houve uma redução na estabilidade térmica do sistema.

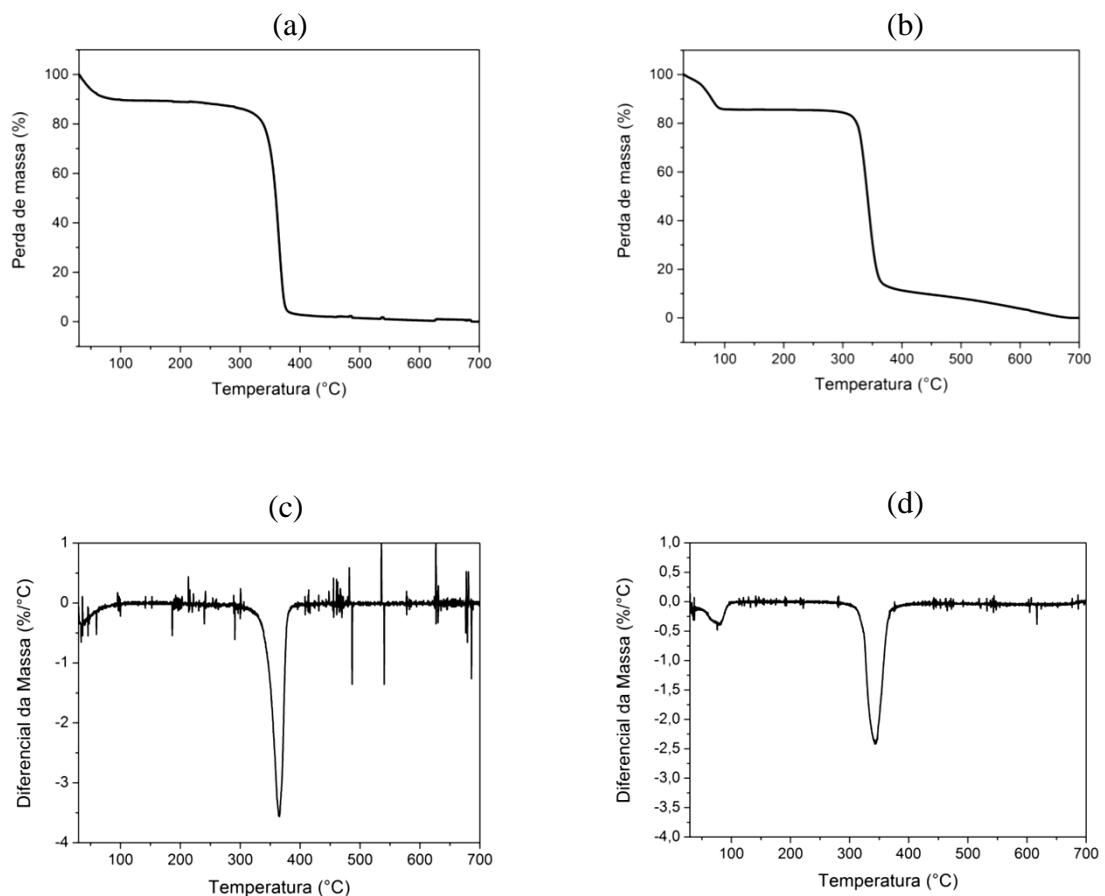


Figura 9 - Termogramas TGA, curva TG, para: (a) BCD – Beta-Ciclodextrina e (b) ACC – Acetato de Carvacrila Complexado; curva DTG para: (c) BCD – Beta-Ciclodextrina e (d) ACC – Acetato de Carvacrila Complexado

5.2.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A análise por FTIR é uma ferramenta útil para provar a regular montagem de complexos de inclusão entre uma molécula receptora (macromolécula) e uma molécula que sofrerá a inclusão (pequena molécula) formando uma nova entidade química (JIAO; GOH; VALIYAVEETTIL, 2001). A Figura 10 mostra os espectros obtidos para a BCD e para o ACC. Os espectros apresentam similaridade de posição e transmitância dos picos apresentados. Esse fato é um indicativo da formação do complexo de inclusão, como mostrado na literatura (GAO et al., 2006; SAMBASEVAM et al., 2013). Além disso, a presença da banda alargada a aproximadamente 3390 cm^{-1} , que é referente ao alongamento do grupo O-H na estrutura, representa um fenômeno bastante comum encontrado por muitos pesquisadores ao sintetizar complexos de inclusão utilizando macromoléculas receptoras de Ciclodextrina (GAO et al., 2006; LI et al., 2003; LI et al., 2010; RUSA; LUCA; TONELLI, 2001; SAMBASEVAM et al., 2013) e, dessa forma, também é um indicativo da formação do complexo.

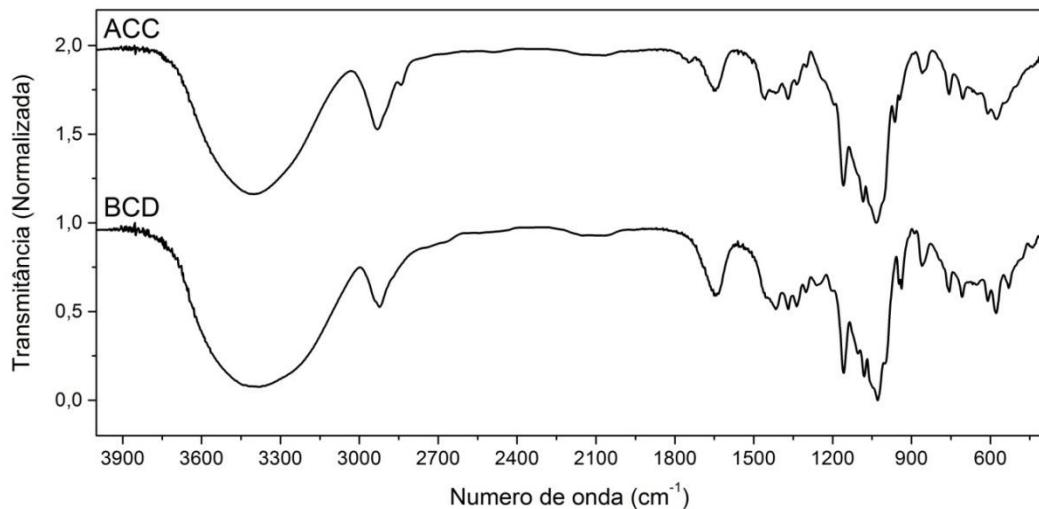


Figura 10 - Espectro FTIR: BCD – Beta-Ciclodextrina, ACC: Acetato de Carvacrila Complexado.

São observados picos a $3392,8\text{ cm}^{-1}$, $2922,1\text{ cm}^{-1}$, $1159,2\text{ cm}^{-1}$ e $1028,0\text{ cm}^{-1}$, que correspondem ao alongamento do (O- H), do (CH_2), do (C-C) e à flexão do (O- H), respectivamente. A Tabela 2 mostra a variação entre a posição dos picos encontrados para os espectros de BCD e ACC. O aumento encontrado na variação do número de onda entre os espectros é decorrente da inserção do anel benzênico da molécula de AC na cavidade rica em

elétron da macromolécula de BCD. Tal inserção aumenta a densidade da nuvem eletrônica, resultando em um aumento da freqüência (SAMBASEVAM et al., 2013).

Tabela 2 - Comparaçao entre os espectros de FTIR da BCD e ACC

<i>Grupo funcional</i>	<i>Número de onda (cm⁻¹)</i>		<i>Variação (cm⁻¹)</i>
	<i>Ciclodextrina</i>	Complexo de inclusão	
Alongamento (O- H)	3392,8	3404,3	+11,5
Alongamento (CH ₂)	2922,1	2931,8	+9,7
Alongamento (C-C)	1159,2	1161,1	+1,9
Flexão (O- H)	1028,0	1035,7	+7,7

5.2.3. Difração de Raios-X

A caracterização estrutural e a porcentagem de cristalinidade do composto AC foram determinadas por DRX. A Figura 11 apresenta os difratogramas obtidos para o AC com a área total (a) e com a área dos picos (b) determinadas por integração. A porcentagem de cristalinidade (C) foi calculada, de acordo com a Equação

Error! Reference source not found. 1.

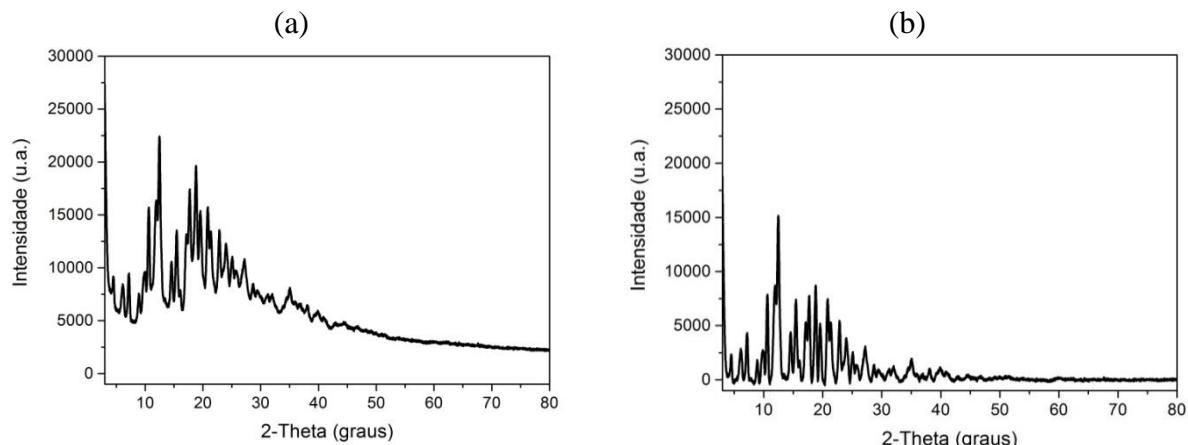


Figura 11 - Curvas de DRX para o Acetato de Carvacrila - AC: (a) Curva total; (b) Curva contendo somente os picos.

O sal Acetato de Carvacrila apresenta uma cristalinidade de aproximadamente 14,6% e sua característica semi-cristalina e pode estar relacionada à presença de impurezas na estrutura, provavelmente decorrente do processo de síntese, durante a acetilação do óleo essencial da Carvacrila.

$$C = \frac{65858,140}{451098,425} \times 100\% \cong 14,6\%$$

O composto cristaliza em um sistema com simetria Monoclínica e grupo espacial $P12_11$. Os principais dados cristalográficos obtidos por análise de DRX são apresentados na

Tabela 3.

Tabela 3 - Dados cristalográficos da amostra de AC

Acetato de Carvacrila	
a (Å)	16,608
b (Å)	6,089
c (Å)	18,004
α (°)	90
β (°)	98,072
γ (°)	90
Simetria	Monoclínica
Grupo Espacial	$P12_11$

A Figura 12 apresenta os padrões de difração para o AC, BCD e ACC. Picos cristalinos são encontrados para os compostos AC e BCD e uma total amorfização da estrutura é detectada para o complexo de inclusão, ACC. Este resultado confirma que os complexos de inclusão não estão presentes no estado cristalino, e as nanopartículas formadas pela inserção do Acetato de Carvacrila na cavidade da macromolécula de Ciclodextrina existem no estado amorfo.

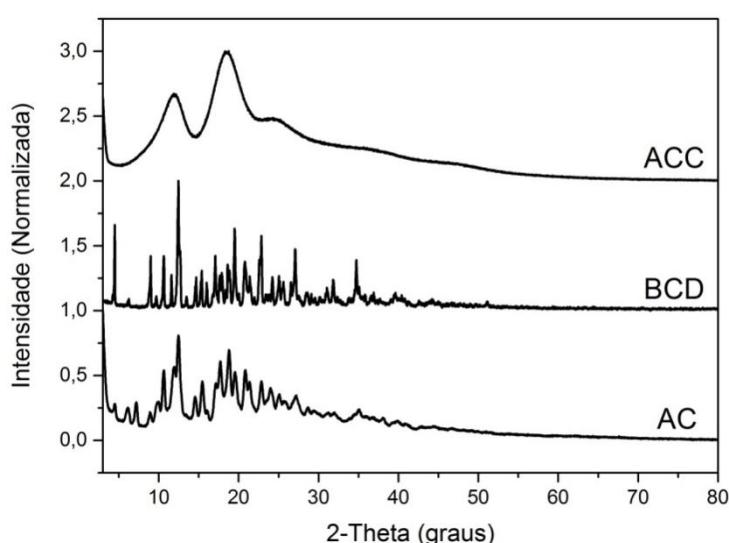


Figura 12 - Curvas DRX: AC - Acetato de Carvacrila, BCD - Beta-Ciclodextrina, ACC - Acetato de Carvacrila Complexada.

Do difratograma para as amostras referentes ao complexo de inclusão na Figura 12, também podemos estimar o tamanho do cristalito, que é o diâmetro médio das partículas, segundo a equação de Debye-Scherrer (Equação 2):

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (2)$$

onde D é o diâmetro médio das partículas; K é a constante de forma; λ é o comprimento de onda da radiação eletromagnética; θ é o ângulo de difração e β a largura do pico de maior intensidade a meia altura. Neste caso, a constante de forma usada foi a equivalente a partículas esféricas com o valor de 0,94.

Assim, tomando-se o pico a $18,55^\circ$, a meia altura, a largura vai de $15,72$ a $21,84^\circ$. Resolvendo-se a equação de Debye-Scherrer, tem-se que o diâmetro médio das partículas é de $13,56\text{nm}$.

5.2.4. Espalhamento Dinâmico da Luz e Potencial Zeta

Soluções de potenciais Zeta entre -30 mV e 30 mV normalmente tendem a se agregar. Na concentração usada neste experimento, o PZ para a BCD foi de $-16,4$ e para o complexo de inclusão de $-27,1$.

Pela análise de DLS, Figura 13, as partículas de BCD têm em média $153,85\text{ nm}$. Já o complexo de inclusão mostrou partículas com tamanho $24,03$ e $71,21\text{ nm}$, em média.

Estes dados de PZ e DLS, quando olhados em conjunto, evidenciam a formação de agregados. No caso do complexo de inclusão, existem duas distribuições de tamanho de partículas, que podem ser atribuídas a diferentes tipos de agregados formados.

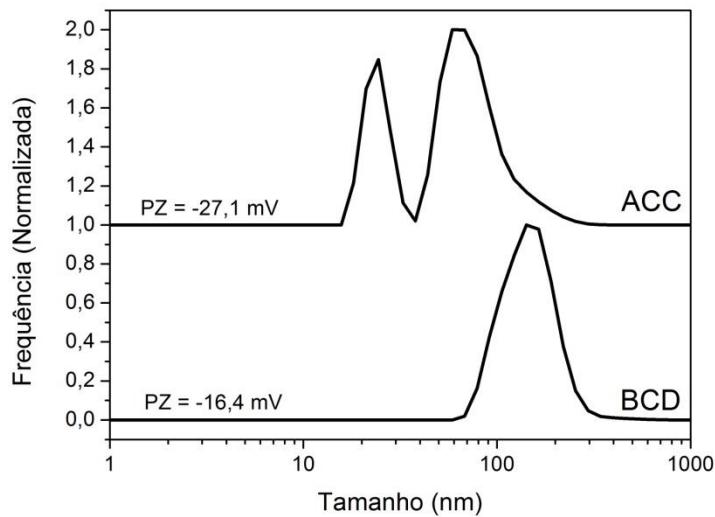


Figura 13- Curvas de DLS: BCD – Beta-Ciclodextrina, ACC – Acetato de Carvacrila Complexado.

5.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens obtidas por MEV, Figura 14, foram usadas a fim de identificar a morfologia do complexo de inclusão à temperatura ambiente. A medida aproximada referente ao diâmetro das partículas foi feita com base nas micrografias, mostrando uma nanopartícula com morfologia aproximadamente esférica e o diâmetro foi determinado por aproximação ao desenhar uma linha central na nanopartícula mostrada. O resultado aproximado obtido, $d \equiv 14,34 \mu\text{m}$, é compatível com o resultado obtido para tamanho de partícula calculado pela Equação de Debye-Scherrer a partir dos resultados de difração de raios-X.

Além disso, as características morfológicas dessas partículas, observadas a partir da MEV, revelaram que a maior parte das interações poliméricas entre os monômeros de BCD acontece de forma a dar origem a uma estrutura supramolecular, formada a partir de ligações cruzadas, semelhante a uma cápsula (YANG; KIM, 2010; MACHÍN; ISASI; VÉLAZ, 2012), nas quais a BCD se encontra por fora das partículas de AC (ZHU et al, 2013). No entanto, a montagem das nanopartículas a partir de tal estrutura pode acontecer com distribuição de tamanho incontrolável, se transformando em sistemas instáveis (ZHU et al, 2013), limitando as aplicações dos complexos de inclusão para entrega controlada da droga.

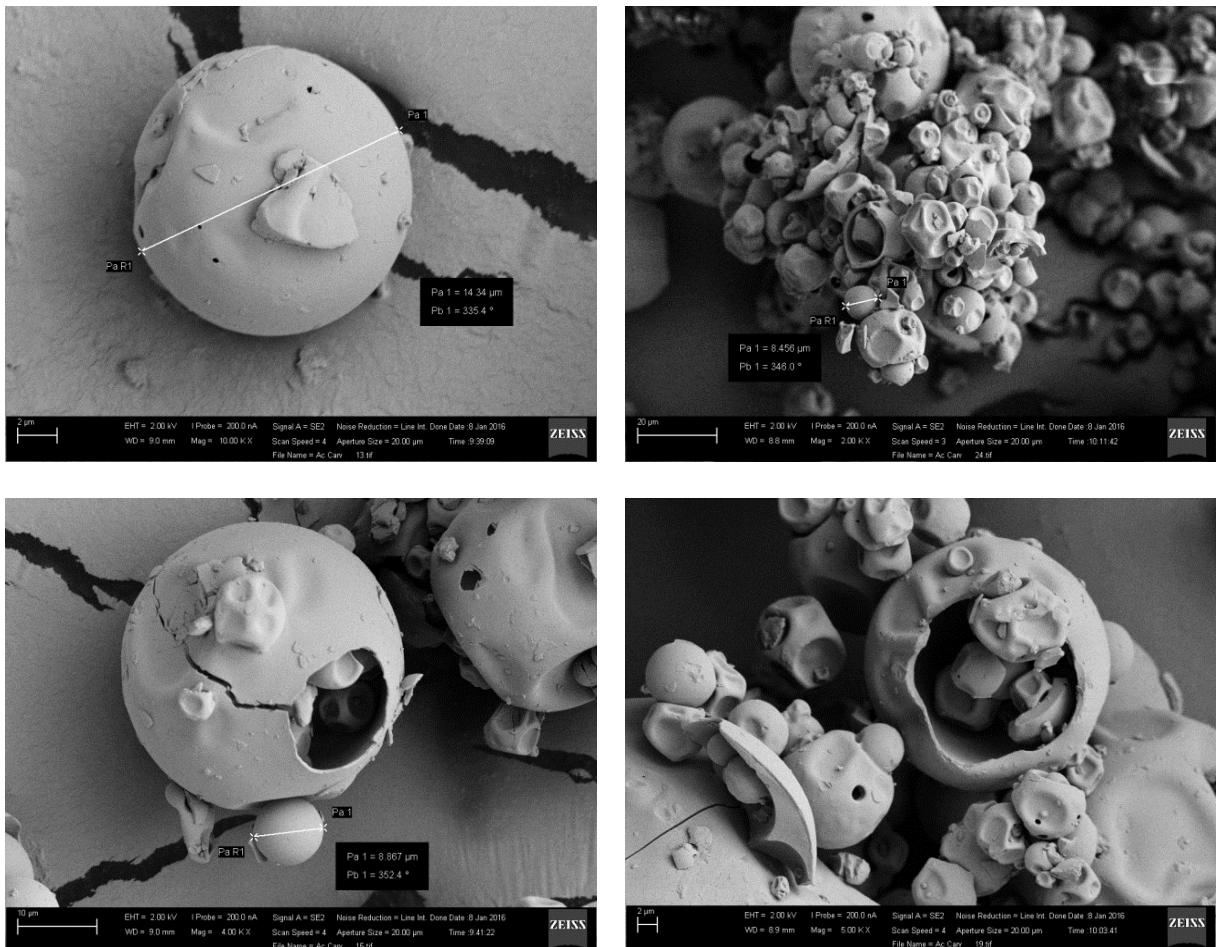


Figura 14—Micrografias MEV do ACC – Acetato de Carvacrila Complexado

Um modo de controlar a heterogeneidade em relação ao tamanho das estruturas supramoleculares de Beta-Ciclodextrina nos complexos de inclusão ACC, foi proposto por Zhu e colaboradores (ZHU et al., 2013). Esse método baseia-se na formação de complexos de inclusão a partir de ligações cruzadas entre macromoléculas de Ciclodextrina e o Polietileno-Glicol (PEG) (Figura 15). Em estudos futuros pretende-se utilizar e analisar esse método.

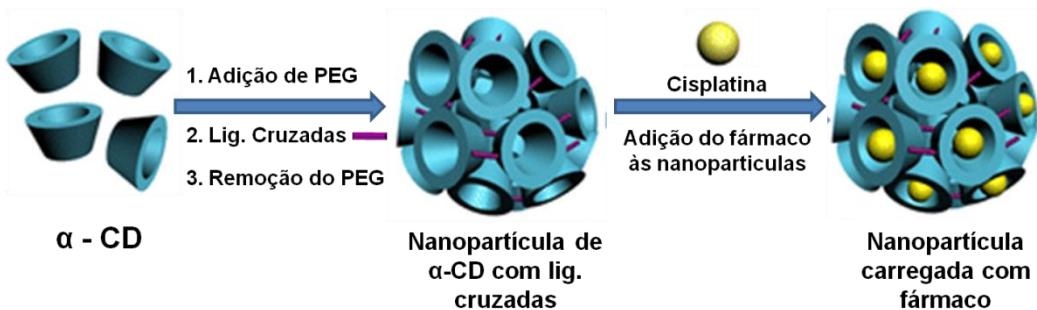


Figura 15 - Ilustração do modelo para o complexo de inclusão de cisplatina em Ciclodextrina (CD) utilizando Polietileno Glicol (PEG). Adaptada de (ZHU et al., 2013)

6. Conclusões

Tendo em vista os objetivos propostos para estudo e desenvolvimento de novos fármacos à base de Carvacrila no presente trabalho, as seguintes conclusões são listadas:

- A solubilidade em água dos complexos de inclusão é aumentada significativamente em relação ao fármaco isolado;
- Os sistemas preparados são estáveis sob as condições de temperatura e pressão ambientes;
- O método de malaxagem proposto permitiu a preparação dos complexos de inclusão, como verificado pelas análises de TGA, FTIR e DRX nas quais foram verificadas alterações térmicas e espectrais dos complexos em comparação com o fármaco isolado ou não complexado;
- A semi-cristalinidade do sal Acetato de Carvacrila, analisado por DRX, que é um indicativo da presença de impurezas na estrutura cristalina do composto, pode estar relacionada ao baixo grau de pureza do reagente Carvacrila pré reação de acetilação;
- A agregação das partículas de complexo de inclusão deve ser estudada com mais cuidado, visando propor uma solução para que esse evento não ocorra nos sistemas de liberação controlada de fármacos dentro do corpo humano e validar a utilização de complexos de inclusão de Acetato de Carvacrila em Ciclodextrina para este fim;
- Pelo conjunto de dados obtidos, pode-se concluir que trata-se de uma estrutura tipo cápsula, formada pela junção de várias coroas, aproximando-se do modelo proposto por Zhu e colaboradores (ZHU et al., 2013) em que a BCD está por fora do complexo de inclusão e o acetato de carvacrila está por dentro.
- A montagem entre as macromoléculas de BCD pode gerar instabilidade e heterogeneidade em relação aos sistemas de entrega controlada da droga e, portanto, um método de preparação dos complexos de inclusão que controle o tamanho das nanopartículas formadas deve ser estudado de modo a continuar o desenvolvimento desses fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-GHANI, R. et al. Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. **Parasitol Res**, v. 104, n. 5, p. 955-65, 2009.
- ABDULLA, M. H. et al. Drug discovery for schistosomiasis: hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 7, p. e478, 2009.
- AHLUWALIA, S. D.; DHINGRA, S. **College Practical Chemistry**. Universities Press, 2005. ISBN 9788173715068.
- AHMAD, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 1, p. 41-50, 2011.
- ALLEGRETTI, S. M. et al. **The Use of Brazilian Medicinal Plants to Combat Schistosoma mansoni**. Schistosomiasis. ROKNI, M. B.: InTech 2012.
- ANTHONY, K. P.; DEOLU-SOBOGUN, S. A.; SALEH, M. A. Comprehensive assessment of antioxidant activity of essential oils. **J Food Sci**, v. 77, n. 8, p. C839-43, 2012.
- ASH, L. R.; ORIHEL, T. C. **Atlas of human parasitology**. 4th. Chicago: ASCP Press, 1997. xii, 410 p. ISBN 0891893997.
- BASER, K. H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 29, p. 3106-19, 2008.
- BERGQUIST, R.; UTZINGER, J.; MCMANUS, D. P. Trick or treat: the role of vaccines in integrated schistosomiasis control. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 6, p. e244, 2008.
- BOHLIN, L. et al. Natural products in modern life science. **Phytochem Rev**, v. 9, n. 2, p. 279-301, 2010.
- BORTOLOTTI, M.; LONARDELLI, I. ReX.Cell: a user-friendly program for powder diffraction indexing. **Journal of Applied Crystallography**, v. 46, p. 259-261, 2013.
- BOULTIF, A. History of the dichotomy method for powder pattern indexing. **Powder Diffraction**, v. 20, n. 04, p. 284-287, 2005.

- BOULTIF, A.; LOUER, D. Powder pattern indexing with the dichotomy method. **Journal of Applied Crystallography**, v. 37, n. 5, p. 724-731, 2004.
- CAFFREY, C. R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Curr Opin Chem Biol**, v. 11, n. 4, p. 433-9, 2007.
- CARDOSO, V. S. et al. Collagen-based silver nanoparticles for biological applications: synthesis and characterization. **J Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 36, Sep 17 2014.
- CARVALHO, A. A. et al. Schistosomicidal effect of the anti-inflammatory drug diclofenac and its structural correlation with praziquantel. **Int J Antimicrob Agents**, v. 44, n. 4, p. 372-4, 2014.
- CASTELLI, F. et al. Differential scanning calorimetry differences in micronized and unmicronized nimesulide uptake processes in biomembrane models. **Eur J Pharm Sci**, v. 19, n. 4, p. 237-43, 2003.
- CASTELLI, F. et al. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. **Int J Pharm**, v. 304, n. 1-2, p. 231-8, 2005.
- CETIN, H.; YANIKOGLU, A. A study of the larvicidal activity of *Origanum* (Labiatae) species from southwest Turkey. **J Vector Ecol**, v. 31, n. 1, p. 118-22, 2006.
- CHOFFNES, E. R. et al. **The causes and impacts of neglected tropical and zoonotic diseases : opportunities for integrated intervention strategies: workshop summary**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011. xxv, 578 p. ISBN 9780309186346.
- CHOW, G.-M.; NOSKOVA, N. I. **Nanostructured materials : science & technology**. Dordrecht ; Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998. viii, 457 p. ISBN 0792350715.
- CIOLI, D. Chemotherapy of Schistosomiasis: An Update. **Parasitology Today**, v. 14, n. 10, p. 418-422, 1998.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitol Res**, v. 90 Supp 1, p. S3-9, 2003.
- CLEFF, M. B. et al. In vitro activity of *origanum vulgare* essential oil against candida species. **Braz J Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 116-23, 2010.
- COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-64, 2014.

- COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v. 36, n. 8, p. 347-57, 2014.
- COSKUN, S. et al. Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). **Parasitol Res**, v. 103, n. 2, p. 259-61, 2008.
- COUTO, F. F. et al. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 153-157, 2011.
- CUNHA, A. S. D. **Esquistossomose mansoni**. São Paulo, : Editôra da Universidade de São Paulo, 1970. 435 p.
- DE MORAES, J. et al. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res**, v. 112, n. 2, p. 603-10, 2013.
- DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 6, p. 659-67, 2008.
- DOENHOFF, M. J.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 4, n. 2, p. 199-210, 2006.
- DUCHENE, D.; PONCHEL, G.; WOUESSIDJEWE, D. Cyclodextrins in targeting. Application to nanoparticles. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 36, n. 1, p. 29-40, 1999.
- ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-90, 2010.
- FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am J Trop Med Hyg**, v. 51, n. 1, p. 83-8, 1994.
- FALLON, P. G. et al. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 53, n. 1, p. 61-2, 1995.
- FENWICK, A. et al. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 11, p. 509-15, 2003.

- FENWICK, A.; WEBSTER, J. P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. **Curr Opin Infect Dis**, v. 19, n. 6, p. 577-82, 2006.
- FIELD, L. D.; STERNHELL, S.; KALMAN, J. R. **Organic structures from spectra**. 3rd. Chichester, West Sussex, England ; New York: J. Wiley & Sons, 2002. xiii, 369 p. ISBN 0470843616.
- GALLAGHER, P. K.; BROWN, M. E.; KEMP, R. B. **Handbook of thermal analysis and calorimetry**. Amsterdam Netherlands ; New York: Elsevier, 1998. ISBN 044482085X.
- GAO, Y. A. et al. Inclusion Complexes of β -Cyclodextrin with Ionic Liquid Surfactants. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 17, p. 8576-8581, 2006.
- GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. **J Biomol Tech**, v. 21, n. 4, p. 167-93, 2010.
- GREENBERG, R. M. Ca $^{2+}$ signalling, voltage-gated Ca $^{2+}$ channels and praziquantel in flatworm neuromusculature. **Parasitology**, v. 131 Suppl, p. S97-108, 2005.
- GUIMARAES, M. A. et al. Anthelmintic activity in vivo of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, 2015.
- GUIMARAES, A. G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpenoid present in the essential oil of oregano, with beta-cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chem Biol Interact**, v. 227, p. 69-76, 2015.
- HAGAN, P. et al. Schistosomiasis control: keep taking the tablets. **Trends Parasitol**, v. 20, n. 2, p. 92-7, 2004.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.
- HARVEY, A. L. et al. Current strategies for drug discovery through natural products. **Expert Opin Drug Discov**, v. 5, n. 6, p. 559-68, 2010.
- HILLIG, K. W. Principles of Instrumental Analysis, 2nd Edition - Skoog, Da, West, Dm. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 5, p. 1536-1536, 1984.

HORNYAK, G. L. **Introduction to nanoscience & nanotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2009. xxxiv, 1593 p. ISBN 9781420047790.

ISMAIL, M. et al. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n. 2, p. 214-8, 1996.

ISMAIL, M. et al. Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. **J Egypt Soc Parasitol**, v. 24, n. 3, p. 685-95, 1994.

JIAO, H.; GOH, S. H.; VALIYAVEETTIL, S. Inclusion Complexes of Poly(neopentyl glycol sebacate) with Cyclodextrins. **Macromolecules**, v. 34, n. 23, p. 8138-8142, 2001.

KATZ, N. et al. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistosomicidas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 7, p. 381-387, 1973.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitol Res**, v. 90 Suppl 2, p. S55-62, 2003.

KEATING, J. H.; WILSON, R. A.; SKELLY, P. J. No overt cellular inflammation around intravascular schistosomes in vivo. **J Parasitol**, v. 92, n. 6, p. 1365-9, 2006.

KUMAR, N.; KUMBHAT, S. **Essentials in nanoscience and nanotechnology**, 2016. xviii, 470 pages ISBN 9781119096115.

LAI, W. L. et al. Inhibition of herpes simplex virus type 1 by thymol-related monoterpenoids. **Planta Med**, v. 78, n. 15, p. 1636-8, 2012.

LI, J. et al. Preparation and Characterization of Polypseudorotaxanes Based on Block-Selected Inclusion Complexation between Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide) Triblock Copolymers and α -Cyclodextrin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 7, p. 1788-1795, 2003.

LI, W. et al. Spectroscopic and theoretical study on inclusion complexation of beta-cyclodextrin with permethrin. **Journal of Molecular Structure**, v. 981, n. 1-3, p. 194-203, 2010.

MACHADO, M. et al. Effects of essential oils on the growth of *Giardia lamblia* trophozoites. **Nat Prod Commun**, v. 5, n. 1, p. 137-41, 2010.

- MACHÍN, R.; ISASI, J. R.; VÉLAZ, I. β -Cyclodextrin hydrogels as potential drug delivery systems. **Carbohydrate polymers**, v. 87, n. 3, p. 2024-2030, 2012.
- MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, n. 1, p. 225-42, 2008.
- MCNEIL, S. E. **Characterization of nanoparticles intended for drug delivery**. New York: Humana Press/Springer, 2011. xii, 269 p. ISBN 9781603271974.
- MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 47, n. 2-3, p. 165-96, 2001.
- MELMAN, S. D. et al. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 8, p. e504, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DA VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Vigilância da Esquistossomose Manson - Diretrizes técnicas**. 4^a. Brasilia, DF: 2014. ISBN 9788533421523.
- MORAES, J. Antischistosomal Natural Compounds: Present Challenges for New Drug Screens. In: AJ, R.-M. (Ed.). **Current topics in tropical medicine**. Rijeka: InTech, 2012. p.333-358.
- NEVES, B. J.; ANDRADE, C. H.; CRAVO, P. V. Natural products as leads in schistosome drug discovery. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 1872-903, 2015.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v. 75, n. 3, p. 311-35, 2012.
- NOKES, C. et al. Evidence for an improvement in cognitive function following treatment of *Schistosoma japonicum* infection in Chinese primary schoolchildren. **Am J Trop Med Hyg**, v. 60, n. 4, p. 556-65, 1999.
- PATHAK, Y.; THASSU, D. **Drug delivery nanoparticles formulation and characterization**. New York: Informa Healthcare, 2009. xix, 394 p. ISBN 9781420078046.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D.; ARCHER, S. Binding of oxamniquine to the DNA of schistosomes. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 83, n. 3, p. 373-6, 1989.

PICA-MATTOCCIA, L. et al. Schistosoma mansoni: genetic complementation analysis shows that two independent hycanthone/oxamniquine-resistant strains are mutated in the same gene. **Exp Parasitol**, v. 77, n. 4, p. 445-9, 1993.

PUBCHEM COMPOUND DATABASE, NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION; CID=10364 - Carvacrol. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10364> >. Acesso em: 13 de Outubro de 2016.

QUELHAS, S. S. **Nanomateriais biodegradáveis para formulações de liberação controlada - Desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão de rutina**. 2012. (Master). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.

RUSA, C. C.; LUCA, C.; TONELLI, A. E. Polymer–Cyclodextrin Inclusion Compounds: Toward New Aspects of Their Inclusion Mechanism. **Macromolecules**, v. 34, n. 5, p. 1318-1322, 2001.

SÁ BARRETO, L. C. L.; CUNHA FILHO, M. S. S. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 629-636, 2008.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 1-17, 2001.

SAMBASEVAM, K. P. et al. Synthesis and Characterization of the Inclusion Complex of beta-cyclodextrin and Azomethine. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 2, p. 3671-82, 2013.

SCHUFFENHAUER, A.; VARIN, T. Rule-Based Classification of Chemical Structures by Scaffold. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 8, p. 646-664, 2011.

SECOR, W. E.; COLLEY, D. G. **Schistosomiasis**. New York, NY: Springer, 2005. xi, 235 p. ISBN 038723277X.

- SHEMESH, R. et al. LDPE/Clay/Carvacrol Nanocomposites with Prolonged Antimicrobial Activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 2, 2015.
- SHUHUA, X. et al. Effect of praziquantel together with artemether on *Schistosoma japonicum* parasites of different ages in rabbits. **Parasitol Int**, v. 49, n. 1, p. 25-30, 2000.
- SOKOVIC, M. et al. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7532-46, 2010.
- SOUZA, F. P. C. V., R. R.; COSTA, A. P.; FARIA, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Schistosomiasis mansoni: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history. **Revista Brasileira de Clinica Médica**, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.
- STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 7, p. 411-25, 2006.
- SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 55, n. 3, p. 304-18, 2015.
- TANG, X.; CHEN, S.; WANG, L. Purification and identification of carvacrol from the root of *Stellera chamaejasme* and research on its insecticidal activity. **Nat Prod Res**, v. 25, n. 3, p. 320-5, 2011.
- TANNER, M. Evaluation of public health impact of schistosomiasis. **Trop Med Parasitol**, v. 40, n. 2, p. 143-8, 1989.
- TROTTA, F. et al. Thermal Degradation of Cyclodextrins. In: LABANDEIRA, J. J. T. e VILA-JATO, J. L. (Ed.). **Proceedings of the Ninth International Symposium on Cyclodextrins: Santiago de Compostela, Spain, 1998**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999. p.27-30. ISBN 978-94-011-4681-4.
- WEISBROD, B. A. **Disease and Economic Development: The Impact of Parasitic Diseases in St. Lucia**. University of Wisconsin Press, 1973. ISBN 9780299063405.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis. 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/> >. Acesso em: 12 de Outubro de 2016.

XIAO, S. et al. Therapeutic effect of praziquantel enantiomers in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 93, n. 3, p. 324-5, 1999.

XIAO, S. et al. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. **Acta Trop**, v. 82, n. 2, p. 175-81, 2002.

YANG, X.; KIM, J. C. beta-Cyclodextrin hydrogels containing naphthaleneacetic acid for pH-sensitive release. **Biotechnol Bioeng**, v. 106, n. 2, p. 295-302, 2010.

ZHU, W. et al. Simple, clean preparation method for cross-linked alpha-cyclodextrin nanoparticles via inclusion complexation. **Langmuir**, v. 29, n. 20, p. 5939-43, 2013.