

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LUANA ROBERTA MICHELS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA
EFICÁCIA *IN VITRO*, *IN VIVO* E FARMACOCINÉTICA DE
NANOPARTÍCULAS DE SUPERFÍCIE MODIFICADA CONTENDO QUININA**

Uruguiana

2016

LUANA ROBERTA MICHELS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA
EFICÁCIA *IN VITRO*, *IN VIVO* E FARMACOCINÉTICA DE
NANOPARTÍCULAS DE SUPERFÍCIE MODIFICADA CONTENDO QUININA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Sandra Elisa Haas

Uruguaiiana

2016

LUANA ROBERTA MICHELS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA
EFICÁCIA *IN VITRO*, *IN VIVO* E FARMACOCINÉTICA DE
NANOPARTÍCULAS DE SUPERFÍCIE MODIFICADA CONTENDO QUININA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Desenvolvimento e controle de qualidade de fármacos, medicamentos e cosméticos.

Dissertação defendida e aprovada em: 11 de março de 2016
Banca examinadora:

Prof. Dr^a. (Sandra Elisa Haas)
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dr^a. (Fernanda Bruxel)
UNIPAMPA

Prof. Dr. (Rodrigo José Freddo)
UNIPAMPA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo (a) autor (a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

M926d Michels, Luana Roberta
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA IN
VITRO, IN VIVO E FARMACOCINÉTICA DE NANOPARTÍCULAS DE
SUPERFÍCIE MODIFICADA CONTENDO QUININA / Luana Roberta Michels.
131 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2016.
"Orientação: Sandra Elisa Haas".

1. Malária. 2. Quinina. 3. Eficácia antimalárica. 4. Nanopartículas. 5. Características
de superfície. I. Título.

Dedico este trabalho à minha família.

Minha base, meu porto seguro e
minha admiração! Muito obrigada.

Devo tudo a vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Sandra Elisa Haas, por todas as oportunidades e pelo exemplo profissional que és. Obrigada por cumprir tão bem o papel de orientadora e por sempre encontrar um tempo para sanar minhas dúvidas. Agradeço ainda por todo o incentivo, paciência e confiança em todas as etapas da realização deste trabalho.

À minha família, em especial meu pai, mãe e irmão, meus maiores incentivadores e exemplos de dignidade e integridade. Muito obrigada por todo o apoio e amor incondicionais.

À Prof^a. Dr^a. Letícia Marques Colomé pelos ensinamentos e apoio na realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Lisiane Bajerski pelas contribuições no desenvolvimento do método analítico, pela convivência no laboratório 105 e amizade.

Aos meus colegas da graduação e pós-graduação, em especial a Jéssica, Ana Helena, Maria Fernanda, Kéllle, Willian e Maicon, por dividirem comigo as alegrias e as frustrações do mestrado. Agradeço a vocês pelo apoio e amizade durante estes sete anos de convívio. Levo vocês pra sempre comigo!

Aos colegas do laboratório 105 e 419, Ayumi, Renata, Gabriel, Barbra e Alcides pelo convívio e auxílio na realização dos experimentos. Um agradecimento especial à Tamara, Grazi e Duda, por perderem muitas manhãs de sono para me ajudar, pela

parceria, pelos incontáveis momentos de descontração, por tornarem este mestrado mais leve e principalmente pela amizade. Meus sinceros agradecimentos a vocês, que contribuíram imensamente para este trabalho!

Aos demais professores do PPGCF, pelos ensinamentos transmitidos.

A CAPES e à UNIPAMPA pelo apoio financeiro.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver... ”

Martin Luther King

RESUMO

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA IN VITRO, IN VIVO E FARMACOCINÉTICA DE NANOPARTÍCULAS DE SUPERFÍCIE MODIFICADA CONTENDO QUININA

O aumento da resistência do *Plasmodium falciparum* dificulta o tratamento da malária, o que leva a utilização de doses mais elevadas dos fármacos e subsequente toxicidade. As nanopartículas com superfície modificada têm sido estudadas com a finalidade de alterar a performance *in vivo* dos fármacos. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia *in vitro*, *in vivo* e a farmacocinética das nanopartículas contendo quinina (QN) com diferentes características de superfície: nanocápsulas revestidas com polissorbato 80; nanocapsulas revestidas com PEG e nanocapsulas preparadas com Eudragit[®]. As suspensões foram preparados pelo método de nanoprecipitação e caracterizados de acordo com o diâmetro, índice de polidispersão, pH, potencial zeta, teor, taxa de encapsulação e microscopia de força atômica. As nanopartículas que apresentaram os melhores resultados na caracterização e eficácia *in vitro*, foram escolhidas para a avaliação da farmacocinética e eficácia *in vivo*, utilizando ratos Wistar e camundongos infectados com o *P. berghei*. As nanocápsulas apresentaram os melhores resultados na caracterização físico-química, com diâmetro adequado, população monodispersa, potencial zeta mais distante de zero, maior taxa de encapsulação e penetração intra-eritrocitária. Houve um aumento significativo no $t_{1/2}$ de eliminação de todas as nanocápsulas avaliadas em relação à QN livre. Na eficácia *in vivo*, as nanocápsulas catiônicas aumentaram a sobrevivência em relação à salina e à QN livre, demonstrando que o fármaco incorporado na suspensão com características catiônicas pode alterar a eficácia da QN apresentando-se como uma alternativa potencial para o tratamento da malária.

Palavras-chave: Quinina, malária, nanocápsulas, eficácia antimalárica, *Plasmodium berghei*.

ABSTRACT

DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION, *IN VITRO*, *IN VIVO* EFFECTIVENESS AND PHARMACOKINETICS OF MODIFIED SURFACE NANOPARTICLES QUININE-LOADED

The increase of *Plasmodium falciparum* resistance difficult the treatment of malaria, and the use of higher doses of the drug induce toxicity. The coating of nanoparticles have been studied with the purpose of improve the *in vivo performance* of drugs. The aim of this study was to develop, characterize and evaluate the efficacy *in vitro*, *in vivo* and pharmacokinetics of quinine (QN) loaded-nanoparticles with different surface characteristics: polysorbate 80 coated-nanocapsules; PEG coated-nanocapsules and nanocapsules prepared with Eudragit® RS 100. The suspensions were prepared by nanoprecipitation method and characterized according to the diameter, polydispersity, pH, zeta potential, content encapsulation rate and atomic force microscopy. The nanoparticles showed the best results on the characterization and *in vitro* efficacy were chosen for evaluating the *in vivo* efficacy and pharmacokinetics, using Wistar rats and mice infected with *P. berghei*. The nanocapsules showed the best results in the physical-chemical characterization, with appropriate diameter, monodisperse population, zeta potential distant from zero, the higher rate of encapsulation and intra-erythrocyte penetration. There was a significant increase in $t_{1/2}$ of all nanocapsules evaluated in comparison to free QN. On the efficacy *in vivo*, cationic nanocapsules increased the survival rate compared to saline and to the free QN, demonstrating that the drug incorporated in the suspension with cationic characteristics can alter the efficacy of QN presenting as a potential alternative for the treatment of malaria.

Keywords: quinine, malaria, nanocapsules, antimalarial efficacy, *Plasmodium berghei*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Casos notificados de malária, segundo mês da notificação na Região Amazônica de 2012 a 2014.....	21
Figura 2 – Ilustração do ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	22
Figura 3 – Estrutura química da Quinina.....	27
Figura 4 - Representação esquemática da estruturas das nanocápsulas e nanoesferas.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

$ASC_{0-\infty}$ - Área sob a curva de zero ao infinito

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Cl_{tot} - Clearance total

DAD – Detector de Arranjo de Fotodiodos

DPR – Desvio Padrão Relativo

FDA – Food and Drug Administration

ICH – International Conference on Harmonization

i.p. – Via Intraperitoneal

i.v. – Via Intravenosa

k - Constante da Velocidade de Reação

MIC – Micela

MRT – Tempo de Residência Médio

MS – Detector de Massas

MSC – Critério de Seleção de Modelo

NC - Nancápsulas

NE - Nanoesferas

NM - Nanoemulsão

OMS – Organização Mundial da Saúde

QN - Quinina

r – Coeficiente de correlação

SFM – Sistema fagocitário mononuclear

$t_{1/2}$ - Tempo de meia-vida

TE – Taxa de Encapsulação

UFLC – Ultra Fast Liquid Chromatograph

Vdss – Volume de distribuição

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Malária.....	20
3.2 Malária no Brasil.....	20
3.3 Parasita e ciclo de vida.....	21
3.4 Manifestações Clínicas.....	23
3.4.1 Malária não-complicada.....	23
3.4.2 Malária grave ou complicada.....	23
3.5 Terapia antimalárica.....	23
3.5.1 Objetivos do tratamento da malária.....	23
3.6 Resistência antimalárica.....	24
3.7 Quinina.....	25
3.8 Sistemas carreadores de fármacos.....	27
3.8.1 Vantagens dos sistemas carreadores de fármacos.....	28
3.9 Nanopartículas de superfície modificada.....	30
3.10 Nanoencapsulação de antimaláricos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Reagentes Químicos.....	34
4.2 Preparação dos sistemas nanoparticulados.....	34
4.3 Caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados.....	35
4.3.1 Determinação do diâmetro das partículas.....	35
4.3.2 Determinação do Potencial Zeta.....	35
4.3.3 Determinação do pH.....	35
4.3.4 Doseamento.....	35
4.3.5 Taxa de encapsulação.....	36
4.4 Validação do método analítico para quantificação da quinina nas nanocápsulas.....	36
4.4.1 Equipamentos.....	37
4.4.2 Condições Cromatográficas.....	37

4.4.3	Preparação das amostras de nanocápsulas de quinina.....	37
4.4.4	Preparação da solução padrão e amostras.....	38
4.4.5	Especificidade.....	38
4.4.6	Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	38
4.4.7	Precisão intermediária e repetibilidade.....	39
4.4.8	Exatidão.....	39
4.4.9	Robustez.....	39
4.4.10	Fotoestabilidade.....	39
4.4.11	Cinética de fotodegradação e determinação da ordem de reação.....	40
4.5	Coeficiente de partição da quinina aos eritrócitos.....	41
4.6	Microscopia de força atômica.....	42
4.7	Avaliação biológica das nanocápsulas de quinina.....	42
4.7.1	Animais.....	42
4.7.2	Infecção Experimental.....	42
4.7.2.1	Manutenção da cepa de <i>P. berghei</i>	43
4.7.2.2	Indução e monitoramento da infecção.....	43
4.8	Estabelecimento da dose efetiva de Quinina.....	43
4.9	Ensaio farmacocinéticos.....	44
4.9.1	Equipamentos e condições cromatográficas para quantificação da quinina em amostras de plasma de rato.....	44
4.9.2	Preparação da solução estoque e amostras.....	45
4.9.3	Análise dos dados de farmacocinética plasmática.....	45
4.10	Avaliação da eficácia das nanocápsulas contendo quinina.....	46
4.11	Análise estatística dos resultados.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1	Caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados.....	48
5.2	Validação do método analítico para quantificação da quinina nas nanocápsulas.....	52
5.2.1	Especificidade.....	53
5.2.2	Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	53
5.2.3	Repetibilidade e precisão intermediária.....	53
5.2.4	Exatidão.....	54
5.2.5	Robustez.....	54
5.2.6	Fotoestabilidade.....	54

5.2.7 Cinética de degradação e determinação da ordem de reação.....	56
5.3 Coeficiente de partição da quinina aos eritrócitos.....	58
5.4 Microscopia de força-atômica.....	59
5.5 Avaliação da farmacocinética.....	60
5.6 Avaliação da eficácia das nanocápsulas contendo quinina.....	62
6 CONCLUSÕES.....	65
Referências Bibliográficas.....	66
ANEXOS	
ANEXO A – Certificado de aprovação de Protocolo para uso de animais em pesquisa.....	88

1 INTRODUÇÃO

A malária é a doença parasitária mais prevalente no mundo e é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* (SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010; WHO, 2013). Existem cerca de 120 espécies de *Plasmodium* que podem infectar aves, répteis, roedores e primatas (BRUCE-CHWATT, 1985; MOORE et al., 2002), porém somente cinco espécies provocam a doença em humanos (RICHARDS & BEESON, 2009), o *Plasmodium falciparum* (WELCH, 1897), o *Plasmodium vivax* (GRASSI & FELETTI, 1890), o *Plasmodium malariae* (LAVERAN, 1881), o *Plasmodium ovale* (STEPHENS, 1922) e o *Plasmodium knowlesi* (KNOWLES & DAS GUPTA, 1932). No Brasil, as espécies conhecidas capazes de infectar os seres humanos são *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O ciclo de vida destes protozoários ocorre em dois hospedeiros. No mosquito fêmea do gênero *Anopheles* o parasita desenvolve o seu ciclo sexuado e, portanto, é considerado o hospedeiro invertebrado ou definitivo. Durante o repasto sanguíneo, estes mosquitos transmitem a malária ao homem (hospedeiro vertebrado), no qual se desenvolve o ciclo assexuado do *Plasmodium* (SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010; DE SOUZA et al., 2014). Em todo o mundo 3,2 bilhões de pessoas em 97 países correm risco de contrair a doença. A Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – WHO) calcula que em 2013 ocorreram cerca de 128 milhões de infecções de malária, sendo 82% delas na África (WHO, 2014). Segundo a agência da ONU (Organização das Nações Unidas) a doença matou 584 mil pessoas no mundo em 2013, sendo 453 mil crianças com menos de cinco anos. Em 2015 houve um aumento no número de infecções por malária, com 214 milhões de casos reportados no mundo todo (WHO, 2016).

As fontes de infecção humana para os mosquitos são pessoas doentes ou mesmo indivíduos assintomáticos, que albergam formas sexuadas do parasita. Apesar de não ser frequente, a infecção malárica pode ser transmitida acidentalmente como resultado de transfusão sanguínea, compartilhamento de seringas contaminadas e acidentes em laboratório (NICOLINI, 2005).

O tratamento da malária deve ser capaz de causar a interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da doença (BRAGA E FONTES, 2005). Embora a terapia utilizada tenha sido bem sucedida até certo ponto, ocorrem falhas frequentes e devido a uma variedade de fatores tornam o tratamento

difícil. Em primeiro lugar, as características intrínsecas da doença relacionadas com as condições de transmissão e de difícil controle do vetor, além da complexidade do ciclo de vida do parasita. Outro fator crítico é o número crescente de pacientes imunocomprometidos, que sofrem de malária e vírus da imunodeficiência humana (VIH) além de co-infecções (SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010).

Outra dificuldade encontrada nas tentativas de tratamento é o aparecimento de parasitas resistentes aos medicamentos antimaláricos (ADITYA et al., 2013). Um exemplo é a cloroquina (CQ), a qual possui várias vantagens farmacocinéticas e farmacológicas sobre outros antimaláricos, o que explica o seu excelente desempenho ao longo de oito décadas de terapia antimalárica (TRIPATHY et al., 2012). Porém, a resistência à cloroquina que começou a desenvolver-se desde 1950, exige que novas estratégias para o tratamento da doença sejam estudadas.

Ao desenvolver uma nova terapia contra a malária, deve-se ter em mente que o parasita está no interior das hemácias e que há várias membranas que devem ser percorridas por antimaláricos para acessar os alvos intracelulares (SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010).

Pensando nisso, a incorporação de fármacos antimaláricos em sistemas de liberação modificada vem sendo estudada, onde uma das estratégias para o direcionamento de antimaláricos aos eritrócitos infectados é através da utilização de nanocarreadores por via intravenosa (SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010).

A quinina (QN) é um fármaco usado no tratamento da malária causada por *P. falciparum*. Ela é utilizada, através da via intravenosa (i.v) em casos de tratamento em que haja resistência à cloroquina e outros fármacos. Porém a elevada dose requerida na administração por via i.v. pode causar arritmia cardíaca grave e mesmo hipotensão fatal (VALE et al., 2005). A partir de um estudo realizado previamente em nosso grupo de pesquisa, Haas e colaboradores (2009) demonstraram que a nanoencapsulação da QN é capaz de reduzir a sua dose eficaz pela via i.v. em quase 30% em comparação com o fármaco livre, além de um aumento em quase 60% da sobrevivência dos animais infectados, quando comparada com o fármaco livre na mesma dose (75 mg/kg/dia).

Tais resultados demonstram a importância do desenvolvimento de novas estratégias para combater a malária e a sua transmissão, como por exemplo, a descoberta de novos compostos ou a potencialização das terapias já existentes, o que pode ser alcançado pela incorporação de antimaláricos em sistemas nanoparticulados

possibilitando a redução de uma dose eficaz através do direcionamento do fármaco ao local alvo (BERNARDI et al., 2012; SILVEIRA et al., 2013), além da diminuição da toxicidade (CONTRI et al., 2014; DIMER et al., 2014; BENVENÚ et al., 2012)

A alteração das características das nanopartículas possibilita alteração da performance *in vivo*. Isso pode ser possível através da modificação de superfície das nanopartículas, gerando alteração na hidrofília/hidrofobia e na carga de superfície dos sistemas, gerando interações diferenciadas com o sistema vivo e conseqüentemente uma resposta biológica do fármaco associada diferenciada. Seja através da utilização de polímeros catiônicos, como o Eudragit[®] RS100, que são capazes de aumentar a interação do fármaco com a membrana das células (FRANK et al., 2015), ou através de polímeros hidrofílicos, capazes de diminuir o reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM), aumentando o tempo de circulação (SOPPIMATH et al., 2001). Através do revestimento de nanopartículas com tensoativos, como o polissorbato 80 (Tween 80[®]), os quais apresentam caráter anfifílico, também é possível diminuir a tensão superficial entre partícula e célula, permitindo um maior contato entre ambas e conseqüentemente com o fármaco associado (KREUTER et al., 1997; KAUR et al., 2008).

Nesse contexto, este trabalho propõe-se a desenvolver e avaliar sistemas nanoparticulados com diferentes características de carga e hidrofília de superfície, como uma forma de promover maior interação da quinina com as células infectadas pelo *Plasmodium berghei*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia *in vitro*, *in vivo* e o perfil farmacocinético de sistemas nanoparticulados contendo quinina (QN) com diferentes características de superfície.

2.2 Objetivos específicos

Preparar diferentes sistemas nanoparticulados contendo QN, com diferentes características de superfície através do método de deposição interfacial de polímero pré-formado.

Caracterizar e comparar os diferentes sistemas nanoparticulados contendo QN quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão, pH, potencial zeta, morfologia, doseamento e taxa de encapsulação.

Desenvolver e validar método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação da QN em sistemas nanoparticulados.

Avaliar a fotoestabilidade da QN livre e quando incorporada em sistemas nanoparticulados.

Avaliar a penetração eritrocitária da QN livre e incorporada em sistemas nanoparticulados utilizando sangue de ratos infectados com *P. berghei*.

Avaliar a farmacocinética da QN livre e em sistemas nanoparticulados em ratos infectados por *P. berghei* após administração intravenosa.

Avaliar a eficácia *in vivo* da QN livre e incorporada em sistemas nanoparticulados utilizando o modelo do teste de supressão de Peter's em camundongos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Malária

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos para as pessoas através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* (LOPEZ DEL PRADO et al., 2014; SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010). Atualmente dos cinco tipos diferentes de parasitas capazes de infectar os seres humanos o *P. falciparum* e *P. vivax* são os mais prevalentes, sendo a espécie *P. falciparum* a mais perigosa, com os maiores índices de complicações e mortalidade, causando a chamada “malária severa ou complicada” (WHO, 2013).

Estudos recentes descobriram uma nova espécie de parasita da malária em chimpanzés no Gabão - África. O *Plasmodium gaboni*, assim denominado, possui uma relação muito próxima com o *P. falciparum*, responsável por milhares de mortes a cada ano. A partir do sequenciamento do genoma do *P. gaboni*, em chimpanzés, foram reveladas possíveis vias de adaptação a hospedeiros humanos. Devido a história recente de transmissão de diversos patógenos de primatas aos humanos, como o HIV (HEUVERSWYN et al., 2006), vírus Ebola (LEROY et al., 2004) e o *Plasmodium knowlesi*, transmitido de macacos para humanos na Ásia (VYTHILINGAM et al., 2008), além da proximidade entre *P. gaboni* e a espécie de *Plasmodium* mais agressiva da malária, o risco de transmissão desta espécie para os seres humanos deve ser seriamente considerado (OLLOMO et al 2009; OTTO et al., 2014).

A malária é uma doença complexa, e o espectro de manifestações da doença varia entre crianças e adultos (MILLER, 2002). Os sintomas podem variar entre nenhum, em indivíduos com parasitemia assintomática, a leve, em pacientes com febre indiferenciada e grave, em doentes com anemia com risco de vida, acidose metabólica, além da malária cerebral, com envolvimento de múltiplos órgãos (WASSMER et al., 2015).

3.2 Malária no Brasil

No Brasil, três espécies estão associadas a casos autóctones de malária em seres humanos: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Os casos por *P. vivax* são predominantes no país, seguidos por *P. falciparum* (respectivamente 84% e 16% dos casos notificados em 2014) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A região Amazônica (estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) concentra a maioria dos casos no país. Em 2014 foram registrados 143.552 casos de malária, sendo o estado do Amazonas com maior número de casos (47%), seguido pelo Acre (22%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

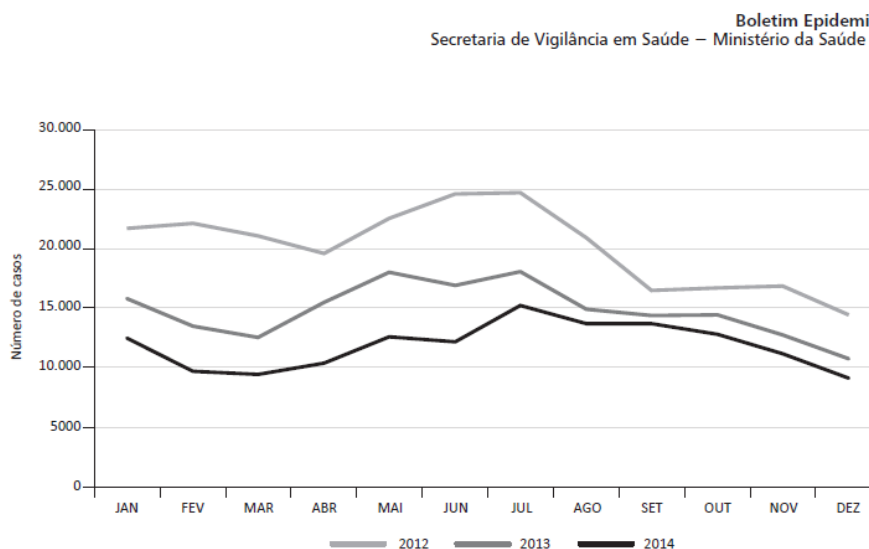


Figura 1. Casos notificados de malária, segundo mês da notificação, Região Amazônica, 2012 a 2014.

Entre 2013 e 2014 houve uma redução no número de casos de malária registrados segundo boletim epidemiológico da secretaria de Vigilância em Saúde (2015) (Figura 1). Porém, a incidência de malária, principalmente nas áreas consideradas de risco, ainda é grande. Apesar dos avanços, ainda há uma grande necessidade de melhoria nos processos de prevenção, controle da doença e tratamento, o que envolve capacitação de recursos humanos, além de aperfeiçoamento na identificação e contenção de surtos da doença.

3.3 Parasita e ciclo de vida

A transmissão natural da malária ocorre por meio da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles* (REY, 2001), sendo mais importante a espécie *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são a combinação de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, muito frequentes na Amazônia brasileira.

A infecção inicia-se quando os parasitas (esporozoítos) são inoculados na pele através da picada do vetor, os quais irão invadir as células do fígado, os hepatócitos. Nessas células multiplicam-se e dão origem a milhares de novos parasitas (merozoítos), que rompem os hepatócitos e, caindo na circulação sanguínea invadem as hemácias dando início à segunda fase do ciclo, chamada de esquizogonia sanguínea. É nessa fase sanguínea que aparecem os sintomas da malária (REY, 2001; MILLER et al., 2002).

Na fase sanguínea do ciclo, os merozoítos formados rompem a hemácia e invadem outras, dando início a ciclos repetitivos de multiplicação eritrocitária. Depois de algumas gerações de merozoítos nas hemácias, alguns se diferenciam em formas sexuadas: os macrogametas (feminino) e microgametas (masculino) (MILLER et al., 2002).

Esses gametas no interior das hemácias (gametócitos) não se dividem e, quando ingeridos pelos insetos vetores, irão fecundar-se para dar origem ao ciclo sexuado do parasita (MILLER et al., 2002).

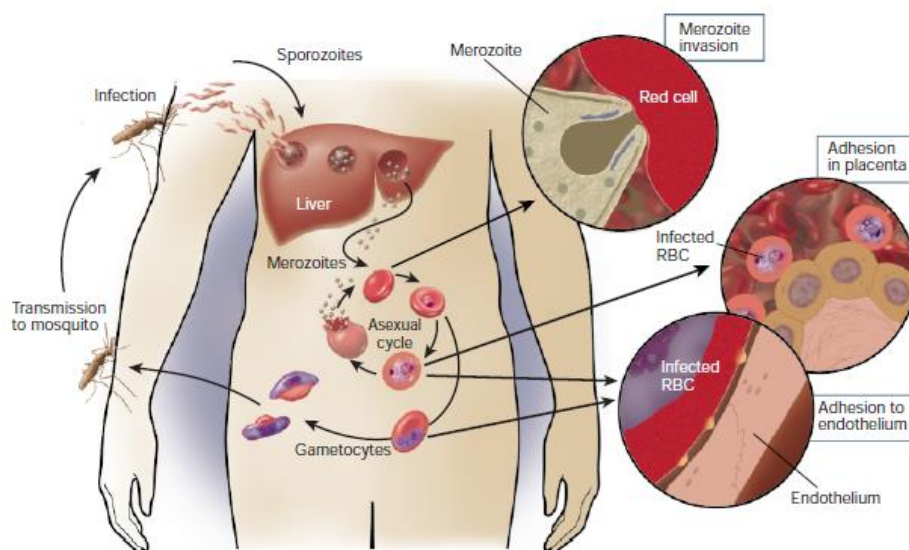


Figura 2. Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. Os humanos são acometidos através do mesmo mecanismo por qualquer *Plasmodium spp.*, porém o *P. falciparum* atinge alta parasitemia devido a uma maior flexibilidade para invadir todas as hemácias (MILLER et al., 2002).

3.4 Manifestações Clínicas

3.4.1 Malária Não Complicada

A crise aguda da malária caracteriza-se por episódios de calafrios, febre e sudorese. Têm duração variável de 6 a 12 horas e pode provocar febre com temperatura igual ou superior a 40°C, que em geral são acompanhadas por cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos.

O quadro clínico da malária pode ser leve, moderado ou grave, dependendo da espécie do parasita, da quantidade de parasitas circulantes, do tempo de doença e do nível de imunidade adquirida pelo paciente. As gestantes, as crianças e os idosos estão sujeitos a maior gravidade, principalmente por infecções pelo *P. falciparum*, que podem ser letais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

3.4.2 Malária Grave ou Complicada

Os primeiros sintomas como febre, cefaleia, calafrios e vômitos podem ser leves, o que torna difícil o reconhecimento da doença como a malária. Porém se não for tratada dentro de 24 horas, a malária causada por *P. falciparum* pode evoluir para outras doenças graves, muitas vezes levando à morte.

Para o diagnóstico de malária grave, algumas características clínicas e laboratoriais devem ser observadas atentamente como, por exemplo, prostração, alteração da consciência, convulsões, hemorragias, icterícia, anemia grave, hipoglicemia, acidose metabólica e insuficiência renal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

3.5 Terapia Antimalárica

3.5.1 Objetivos do Tratamento da Malária

O tratamento da malária visa atingir o parasita em pontos-chave de seu ciclo evolutivo, provocando a interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção. É fundamental a destruição das formas latentes do parasita no ciclo tecidual, evitando assim as recaídas tardias e, ainda interrompendo a transmissão do parasita pelo uso de fármacos que impeçam o

desenvolvimento de formas sexuadas (gametócitos) (MILLER et al., 2002; BRAGA e FONTES, 2005). Para atingir esses objetivos, diversos fármacos são utilizados, cada qual agindo de forma específica, a fim de impedir o desenvolvimento do parasita no hospedeiro.

Assim, o tratamento da malária segue um esquema complexo que varia de acordo com as necessidades de tratamento para cada paciente, que deve ser precedida de informações extremamente relevantes como, por exemplo, a espécie do *Plasmodium* infectante, pela especificidade dos esquemas terapêuticos a serem utilizados, a idade do paciente devido a maior toxicidade para crianças e idosos, o histórico de exposição anterior à infecção uma vez que indivíduos com reincidência de infecção tendem a apresentar formas mais graves da doença, as condições associadas, tais como gravidez e outros problemas de saúde além da gravidade da doença, pela necessidade de hospitalização e de tratamento com esquemas especiais de antimaláricos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

3.6 Resistência Antimalárica

A resistência a um fármaco é definida como a capacidade de um parasita sobreviver e multiplicar-se na presença de concentrações desse fármaco que normalmente o destruiriam ou preveniriam a sua multiplicação (WHO, 2001). A resistência a antimaláricos revela-se com falhas terapêuticas, com um aumento no número de infecções, reaparecimento em áreas controladas ou epidemias em zonas com baixo índice de transmissão (SHANKS, 2006).

Essa resistência aos medicamentos implica na disseminação da malária para novas áreas onde a doença foi erradicada além de desempenhar um papel significativo na gravidade das epidemias em algumas partes do mundo.

Nas últimas décadas o aparecimento de cepas de *P. falciparum* e *P. vivax* resistentes à todos fármacos antimaláricos tem se tornado um problema para o controle e tratamento da doença. Um exemplo de resistência se deu a partir da extensiva utilização da cloroquina. Com seu uso extensivo, especialmente no início dos anos 1940, a resistência à cloroquina foi se desenvolvendo lentamente (ACHAN et al., 2011).

Além disso, a grande capacidade de adaptação dos parasitas da malária evidencia-se na rapidez com que se desenvolveu, particularmente para o *P. falciparum*, a resistência a praticamente todos os antimaláricos sintéticos desenvolvidos a partir de

1940 (FRANÇA et al., 2008). Os primeiros casos de resistência do *P. falciparum* à cloroquina foram vistos inicialmente no sudeste da Ásia e da América do Sul ao final dos anos 1950, e se espalhou por quase todas as áreas por volta de 1980 (FRANÇA et al., 2008).

O surgimento de cepas de *P. vivax* resistentes à cloroquina (CQ), foi documentado pela primeira vez em Papua, Nova Guiné (PNG) em 1989 (RIECKMANN et al., 1989), dificultando os atuais esforços internacionais para o controle e eliminação da malária. Os primeiros casos registrados de malária por *P. vivax* resistentes à CQ na América Latina foram na Colômbia (ARIAS & CORREDOR 1989) e no Brasil (GARAVELLI & CORTI 1992), porém o tratamento antimalárico não havia sido supervisionado em um desses estudos iniciais. Conseqüentemente, foi apenas em 1996 que a resistência à CQ por uma cepa *P. vivax* foi formalmente documentada nesta região.

Mais recentemente, dois relatórios adicionais foram publicados de resistência *in vivo* à CQ de cepas de *P. vivax* em Manaus, a maior cidade portuária brasileira na Bacia Amazônica. No primeiro estudo, 11 de 109 (10,1%) pacientes tratados com CQ (25 mg/kg durante 3 dias) tiveram um aumento da infecção por *P. vivax* apesar de níveis adequados de CQ no plasma (DE SANTANA FILHO et al., 2007). Subseqüentemente, outro estudo clínico documentado em Manaus de resistência de *P. vivax* em 7 dos 135 (5,2%) doentes tratados com CQ (25 mg/kg durante 3 dias) e primaquina (PQ) (30 mg de base/dia durante 7 dias). Todos pacientes tinham níveis de CQ acima de 100 ng/mL no sangue total no momento da recorrência (MARQUES et al., 2013). Estes estudos indicam que a resistência do *P. vivax* à CQ ocorreu em pelo menos três países latino-americanos (Guiana, Peru e Brasil), afetando doentes tratados com CQ somente ou com uma combinação de CQ-PQ.

Com o aumento da resistência à cloroquina, nos últimos anos a quinina novamente passou a desempenhar um papel fundamental, em particular no tratamento de malária grave.

3.7 Quinina

A quinina (QN) é considerada uma das melhores descobertas médicas do século 17 e o seu uso no tratamento da malária marcou a primeira bem sucedida utilização de um composto químico para tratar uma doença infecciosa (SALAKO, 1992; ACHAN et al., 2011).

A QN é um alcaloide extraído da casca da árvore da *Cinchona* e é um antimalárico que começou a ser utilizado há mais de 400 anos pelos nativos da América do Sul para tratar a febre (SALAKO, 1992; ACHAN, 2009; DE OLIVEIRA, 2011).

No ano de 1638, a condessa de Chinchón, esposa do vice-rei espanhol no Peru, foi acometida de forte febre. Ao ingerir uma solução feita pelos índios chamada por eles de “quina-quina” a febre cedeu e a continuidade do tratamento a deixou curada (DE OLIVEIRA, 2009). Voltando à Espanha com a casca, ela apresentou a QN para a Europa, sendo que em 1742 o botânico Carl Linnaeus nomeou a árvore de "Cinchona" em homenagem à condessa de Chinchon (ACHAN et al., 2011).

Até 1820, a utilização da casca da árvore de cinchona era feita na forma de um pó fino. A casca, que passava previamente por um processo de secagem era em seguida transformada em pó para então ser misturado em um líquido (geralmente vinho) antes de ser bebido. Em 1820, a QN foi extraída da casca, isolada e nomeada por Pierre Joseph Pelletier e Joseph Caventou. A QN então purificada substituiu a casca no tratamento para a malária (ACHAN et al., 2011).

Quimicamente, a QN é denominada (8- α ,9R)-6'-metoxicinchon-9-ol, apresentando peso molecular de 324,42 e fórmula molecular de C₂₀H₂₄N₂O₂ (SMITH, 2001). A QN é um fármaco que contém um grupo quinolínico unido através de uma ligação alcoólica secundária a um anel quinuclidínico. O anel quinolínico apresenta um grupo metoxi e o quinuclidínico, um grupo vinila (Figura 3).

Apresenta-se como um pó cristalino branco e inodoro, com um intenso sabor amargo (FULLERTON, 1998). É fotossensível e apresenta características fluorescentes. Um grama dissolve em 1900 mL de água, em 0,8 mL de álcool e em 1,2 mL de clorofórmio (SMITH, 2001). O cloridrato de quinina, sal da QN, é utilizado para a administração i.v. e é solúvel em água e álcool, já o sulfato de QN, é fracamente solúvel em água (BRITISH PHARMACOPEIA, 1999).

A QN é um composto extremamente básico e é rapidamente absorvida por via oral, atingindo concentrações máximas dentro de 1 a 3 horas. A excreção é rápida, 80% da QN administrada é eliminada por biotransformação hepática. Os 20% restantes são excretados inalterados pelo rim (ACHAN et al., 2011). A QN apresenta biodisponibilidade de 80% (TRACY E WEBSTER, 1996).

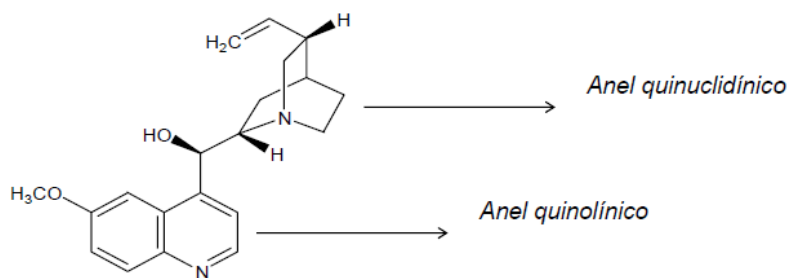


Figura 3. Estrutura química da QN (SMITH, 2001).

O mecanismo de ação da QN ainda não está completamente elucidado. Algumas hipóteses consideram que a QN age nos fosfolípidos da membrana do vacúolo digestivo. O parasita ingere o citosol da hemácia que contém hemoglobina e a sua degradação por proteases do vacúolo do parasita gera produtos tóxicos, como a hematina, o qual o parasita se protege através da polimerização em hemozoína. A QN age impedindo a polimerização da hematina, causando aumento da concentração de produtos tóxicos ao parasita, levando a sua morte (FITCH, 2004).

A QN tem um baixo índice terapêutico, e os efeitos adversos são substanciais (WHO, 2000) sendo referidos como cinchonismo. Os sintomas mais leves incluem o zumbido, ligeira perda de audição, dor de cabeça e náuseas. A perda de audição é geralmente dependente da concentração e é reversível (KARLSSON, 1990). As manifestações mais graves incluem vertigens, vômitos, dor abdominal, diarreia e até a perda da visão. Em alguns casos pode ocorrer hipotensão caso a QN seja administrada muito rapidamente, além de trombose, após injeções intravenosas (WHITE, 1996).

A QN manteve-se a base do tratamento da malária até a década de 1920, quando outros mais eficazes antimaláricos sintéticos se tornaram disponíveis. O mais importante destes fármacos foi a cloroquina, que passou a ser utilizada extensivamente no início dos anos 1940 (YAKOUB et al., 1995).

3.8 Sistemas Carreadores de Fármacos

As nanopartículas (NP) biodegradáveis têm desempenhado um papel importante para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos nos últimos anos (SOPPIMATH et al., 2001). Os sistemas nanoparticulados, podem ser definidos como partículas coloidais, ou farmacologicamente ativas com a capacidade de carrear agentes

terapêuticos, e que possuem diâmetro na faixa de 10 nm a 1000 nm (1 μ m) (NAGAVARMA et al., 2012; CABAN et al., 2014). Eles consistem de materiais macromoleculares em que o princípio ativo (fármaco ou material biologicamente ativo) está dissolvido, aprisionado, encapsulado e/ou adsorvido, ligado em seu núcleo e/ou parede polimérica (KREUTER et al., 2007).

O termo nanopartícula polimérica inclui as nanocápsulas (NC) e as nanoesferas (NE), as quais diferem entre si segundo a composição e estrutura (Figura 4). As NC são constituídas por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as NE, não apresentam óleo em sua composição, portanto não apresenta um núcleo diferenciado. Elas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (LETCHFORD e BURT, 2007; MORA-HUERTAS et al., 2010; STEICHEN et al., 2013).

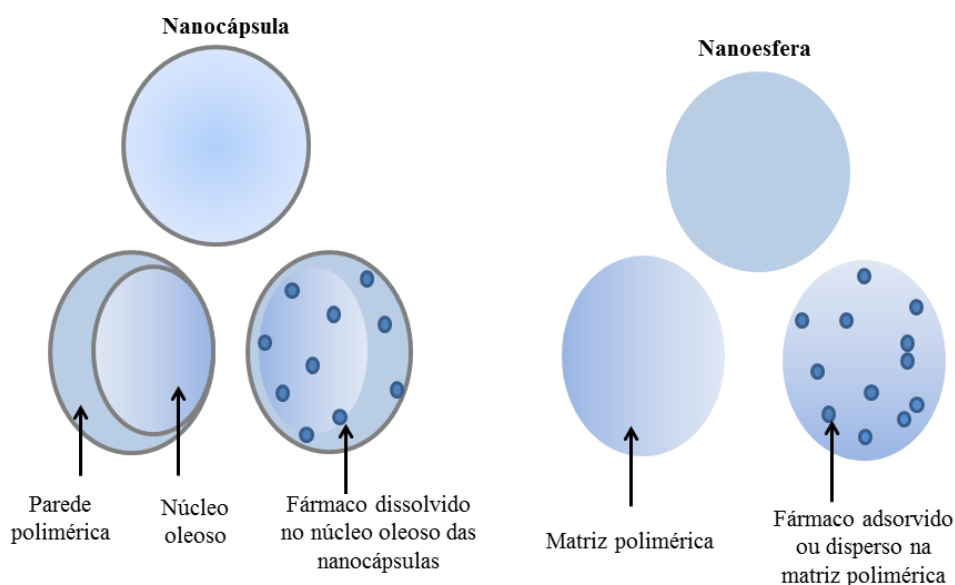


Figura 4. Representação esquemática de NC e NE poliméricas

3.8.1 Vantagens dos Sistemas Carreadores de Fármacos

Os sistemas nanoparticulados têm a capacidade de melhorar características importantes dos fármacos tais como a biodisponibilidade e a solubilidade. Além disso, oferecem uma abundância de possíveis soluções para problemas de liberação e ainda

para superar obstáculos importantes, como barreiras intestinais e à barreira sangue-cérebro (CABAN et al., 2014).

As nanopartículas poliméricas biodegradáveis podem atuar como um depósito dos fármacos, proporcionando uma liberação contínua e controlada do fármaco encapsulado no local alvo, através da afinidade da membrana com a superfície das nanopartículas. Desta forma, estes sistemas têm a capacidade de aumentar a biodisponibilidade, melhorando também os parâmetros farmacocinéticos (SAFARI et al., 2014; JABIR et al., 2012). Park e colaboradores (2013) observaram um aumento na biodisponibilidade da ciclosporina em nanocápsulas após administração oral, com manutenção dos níveis plasmáticos do fármaco por pelo menos o dobro do tempo observado com o fármaco livre.

Além disso, esses sistemas apresentam a capacidade de modificar propriedades físico-químicas de compostos, protegendo-os de processos de degradação ou de interações indesejadas. Isto permite utilizar fármacos através de vias de administração que normalmente não poderiam ser escolhidas por problemas de solubilidade, estabilidade ou características organolépticas (JANSOOK et al., 2010; FRANK et al., 2015). Por exemplo, Mazzarino e colaboradores (2010) observaram que as nanocápsulas compostas por PLA (Pluronic F68 como tensoativo) impediram a hidrólise química da curcumina em pH 5,0 enquanto que em pH 7,4 aproximadamente 30% da substância foi degradada.

Um aumento da fotoproteção da benzofenona-3 sob radiação UV-A foi demonstrado por um filtro solar de hidrogel com nanoformulação, preparado com Carbopol 940, em comparação com o hidrogel contendo esta substância na sua forma não-encapsulada (PAESE et al., 2009).

A incorporação de fármacos em NP também tem sido utilizada como uma alternativa para a diminuição dos efeitos adversos. A olanzapina é um fármaco antipsicótico atípico associado ao ganho de peso e a doenças cardio-metabólicas, tais como hipercolesterolemia e diabetes, após o uso crônico. Dimer e colaboradores (2014) realizaram um estudo onde ratos Wistar foram tratados com NC de núcleo lipídico contendo a olanzapina. Os resultados mostraram um menor ganho de peso e níveis de colesterol totais mais baixos quando comparados com os ratos tratados com a olanzapina não encapsulada. De acordo com os autores, os benefícios da nanoencapsulação também pode ser devido aos triglicéridos de cadeia média (TCM),

um componente do núcleo nas NC que previne o ganho de peso e as doenças metabólicas.

Em um estudo realizado por Contri e colaboradores (2014), foram relatados os efeitos das NC na diminuição da irritação da pele causada pela capsaicina, uma substância que provoca irritação em seres humanos. As nanocápsulas contendo os capsaicinoides reduziram irritação da pele, que foi medida por uma sonda para avaliar o eritema. Em paralelo, os voluntários relataram uma redução na sensação de irritação após a sua aplicação em relação à substância não encapsulada.

3.9 Nanopartículas de Superfície Modificada

A superfície dos nanocarreadores possui um importante papel visando a melhora nas funções terapêuticas, pois podem abrandar as interações entre as células que compõem o Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) e o tecido alvo, além de que as características de superfície das partículas também podem alterar a resposta biológica do fármaco associado. A hidrofobicidade, como uma das principais características das nanopartículas, desempenha um papel significativo nas suas características físico-químicas, transporte e biodisponibilidade. Informações sobre as características de superfície das nanopartículas são de alta relevância, principalmente para os sistemas parenterais, pois a hidrofobicidade da superfície das partículas governa a sua adsorção às proteínas do plasma (XIAO e WESNER, 2012; DOKTOROVOVA et al., 2012).

A superfície das nanopartículas pode ser modificada dependendo das características dos polímeros utilizados ou da incorporação de outros. Polímeros catiônicos, como o Eudragit® RS100, conferem propriedades mucoadesivas às nanopartículas, devido à interação com a superfície negativa das mucosas. Os polímeros catiônicos conferem potencial zeta de superfície positivo às partículas facilitando a interação destas com as membranas biológicas negativamente carregadas (FRANK et al., 2014).

Frank e colaboradores (2014) desenvolveram e avaliaram um hidrogel de quitosana contendo nanocápsulas catiônicas (Eudragit® RS100) e aniônicas (Eudragit® S100) quanto a penetração *in vitro* de vermelho do Nilo, utilizado como um marcador fluorescente encapsulado, na mucosa vaginal. Ambas as formulações aumentaram a penetração do marcador, em comparação com o gel de quitosana contendo o marcador

não encapsulado. No entanto, a maior penetração foi observada pelas NC catiônicas (Eudragit[®] RS100).

Outros modificadores de superfície são os tensoativos, como por exemplo, o polissorbato 80 (Tween 80[®]), utilizado em alguns estudos no revestimento de nanopartículas por apresentar um caráter anfifílico, o que diminui a tensão superficial, aumentando o contato entre partícula e célula (KREUTER et al., 1997). O Tween 80[®] também é muito utilizado com o objetivo de manter a estabilidade e prevenir a agregação das partículas. Zhao e colaboradores (2010) avaliaram a influência do Tween 80[®] em nanopartículas de ouro (NPs) e concluíram que o tensoativo impede a agregação das NP durante o processo de centrifugação além de mantê-las bem dispersas em meios biológicos. Li e colaboradores (2015) relataram que o Tween 80[®], utilizado como agente redutor de diâmetro e estabilizante na preparação de nanopartículas de prata manteve as partículas estáveis e com diâmetro reduzido. Hebeish e colaboradores (2014) evidenciaram que um menor tamanho de partícula, com um bom índice de polidispersão (PDI) foi obtido para nanopartículas de amido de milho na presença de 20% de Tween 80[®].

Um dos obstáculos na utilização das nanocápsulas convencionais se deve a rápida remoção destes nanocarreadores do organismo pelo SFM, composto pelos macrófagos, que são capazes de remover estas nanopartículas da circulação sanguínea segundos após a sua administração intravenosa (MOSQUEIRA et al., 2001; SOPPIMATH et al., 2001).

Uma das alternativas que vem sendo utilizadas é o desenvolvimento dos denominados sistemas furtivos, através do revestimento com o polímero hidrofílico polietilenoglicol (PEG), pois tem excelente efeito estérico de estabilização e reduz a adsorção de proteínas na superfície evitando o reconhecimento pelo SFM, com aumento no tempo de circulação (YOO et al., 2011; CHAUDHARI et al., 2012).

Os polímeros sintéticos, tais como poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido-lático-*co*-ácidoglicólico) (PLGA), poli(ε-caprolactona) (PCL) e polietilenoglicol (PEG) têm sido muito utilizados no desenvolvimento de NC e NE, podendo ser utilizados como uma forma de revestimento das partículas. Eles possuem como vantagem a elevada pureza, não necessitando passos adicionais de purificação, oferecendo menor risco de toxicidade (REIS et al., 2006).

3.10 Nanoencapsulação de Antimaláricos

A necessidade de desenvolver novas estratégias para tratar a malária é urgente devido aos casos de resistência aos agentes antimaláricos atuais como a cloroquina, considerada padrão ouro do tratamento, especialmente em zonas endêmicas por *P. falciparum*, o que tornou necessária a abordagem de uma terapia antimalárica combinada (WELLS et al., 2007). Vários fármacos apresentam diferentes graus de toxicidade, o que limita a sua utilização, porque as formas de administração atuais liberam o fármaco livre na circulação sanguínea e na maioria das vezes oferecem pouca especificidade em relação às células-alvo (NA-BANGCHANG et al., 2009). Por conseguinte, para atingir níveis terapêuticos que se estendam ao longo do tempo, a concentração inicial do fármaco no corpo deve ser elevada. Por outro lado, se o fármaco administrado tem toxicidade não específica, as baixas doses contribuem para o desenvolvimento de parasitas resistentes (WHITE, 1997).

O direcionamento e a liberação de doses adequadas dos fármacos a um local-alvo específico no momento certo e de uma maneira segura ainda é um desafio. A nanoencapsulação é uma das estratégias que vem sendo utilizada a fim de minimizar problemas como a toxicidade e direcionamento aos tecidos-alvo.

Alguns trabalhos envolvendo sistemas nanoparticulados com incorporação de antimaláricos descritos na literatura podem ser citados, como por exemplo, o desenvolvimento de lipossomas contendo cloroquina, desenvolvidos por Urbán e colaboradores (2011) que demonstraram uma melhoria na eficiência da cloroquina e uma diminuição de $26,7 \pm 1,8\%$ da parasitemia quando administrada em dose muito inferior à convencional.

A QN na sua forma básica foi encapsulada por HAAS e colaboradores (2009), em que as NC-QN foram avaliadas *in vivo* num modelo experimental em ratos Wistar recém-infectados por *P. berghei*. A eficácia da NC-QN foi avaliada testando diferentes doses, e a farmacocinética foi avaliada após a administração i.v. de 25 mg/kg em ratos infectados. Houve um aumento na sobrevivência com doses reduzidas de NC-QN. O mecanismo responsável pelo aumento da eficácia de NC-QN foi o aumento da interação entre QN e eritrócitos infectados, tal como sugerido. No entanto, os parâmetros farmacocinéticos de NC-QN não foram significativamente diferentes das determinadas para QN livre ($p = 0,05$).

Em outro estudo, realizado por SINGH e SHARVANI (2008), a primaquina, um animalárico que atua sobre as células hepáticas infectadas, foi incorporada em uma nanoemulsão lipídica (PQ-NE) e sua eficácia testada em camundongos machos Swiss, infectados pelo *Plasmodium bergheii*. A PQ-NE apresentou uma atividade antimalárica aumentada após administração pela via oral, com uma dose 25% menor em comparação ao fármaco livre. A melhoria da eficácia da primaquina pode ser atribuída ao aumento na biodisponibilidade oral e consequente acréscimo dos níveis de fármaco no fígado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes químicos

Os solventes acetonitrila, metanol, acetona e o ácido fórmico foram obtidos a partir de Tedia[®] (Fairfield, EUA). A água foi purificada usando um Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, EUA). A trietilamina foi obtida a partir da Dinâmica Química Contemporânea[®] LTDA. O ácido tricloroacético (TCA) foi obtido da Merck[®] (Darmstadt, Germany). Todos os outros reagentes e produtos químicos usados eram de grau analítico farmacêutico.

4.2 Preparação dos sistemas nanoparticulados

As nanopartículas foram preparadas conforme o método descrito por Fessi e colaboradores (1988), denominado de deposição interfacial de polímero pré-formado (Haas et al., 2009). As formulações desenvolvidas estão descritas na Tabela 1, e foram denominadas de NC (nanocápsulas), NE (nanoesferas), NM (nanoemulsões) e MIC (micela) sendo a fase orgânica composta pelo polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL 80000) ou Eudragit[®], TCM, Lipoid[®] ou Span[®], QN base e acetona que foram aquecidos em banho-maria (40°C), até a completa dissolução dos constituintes. Após, esta fase foi vertida lentamente e sob agitação moderada, à temperatura ambiente, através de um funil estreito, sob uma solução de tensoativo hidrofílico de alto EHL (Tween[®]) e água destilada. No caso das formulações revestidas com PEG, o polímero PEG[®] foi adicionado na fase aquosa. Após a formação imediata das nanopartículas as suspensões foram mantidas sob agitação moderada durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as suspensões foram colocadas em um balão de fundo redondo e levadas a um evaporador rotatório (BÜCHI[®]) a fim de evaporar o solvente orgânico por completo e o solvente aquoso até atingir volume final de 10 mL. As formulações foram preparadas em triplicata e mantidas acondicionadas em frascos de vidro, protegidos da luz, na temperatura de $20 \pm 5^\circ\text{C}$.

4.3 Caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados

4.3.1 Determinação do diâmetro das partículas

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho de partícula foram analisados por difratometria a laser em equipamento Mastersizer[®] 2000 (Malvern[®]), após diluição das amostras em água destilada. As análises foram realizadas em triplicata e o diâmetro médio baseado no volume ($d_{4,3}$) foi utilizado como parâmetro para a distribuição de tamanho de partícula. A análise permitiu ainda a determinação do SPAN (índice de polidispersão), calculado a partir da medida do diâmetro médio das partículas correspondentes a 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada para a amostra, sendo calculado pela seguinte equação:

$$SPAN = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}}$$

4.3.2 Determinação do Potencial Zeta

O potencial zeta das formulações foi determinado por migração eletroforética em equipamento Zetasizer (Malvern[®]). As análises foram realizadas em triplicata, após diluição das amostras em NaCl 1 mM em cubeta específica.

4.3.3 Determinação do pH

A determinação do pH das nanopartículas foi realizada através de leituras das suspensões, sem prévia diluição, utilizando um potenciômetro (HANNA[®]) previamente calibrado com soluções tampão com pH 7,01 e 4,01. As avaliações também foram realizadas em triplicata.

4.3.4 Doseamento

Uma solução estoque de QN (1000 µg/mL) foi preparada dissolvendo 10 mg de QN, pesada com precisão, em acetonitrila dentro de um balão volumétrico de 10 mL. A solução padrão foi preparada por diluição da solução estoque, diluída com acetonitrila para uma solução com uma concentração final de 20 µg/mL.

Para preparar as soluções das amostras, 100 µL das nanopartículas (2 mg/mL de QN) foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, com diluição em acetonitrila, obtendo também a concentração final de 20 µg/mL. Essa diluição foi mantida em banho de ultra-som durante 30 minutos para o rompimento dos sistemas nanoparticulados e consequente liberação do fármaco para quantificação. As soluções

foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore®) antes da injeção.

A concentração de QN nas nanopartículas foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) utilizando um método previamente validado conforme descrito no item 4.4, utilizando como fase móvel água ACN:H₂O:triethylamina pH 3,0 (60:40:0.01 v/v/v).

4.3.5 Taxa de encapsulação

A taxa de encapsulação da QN nas nanopartículas foi determinada por CLAE-DAD, pela diferença entre a concentração total de QN (descrita no doseamento) na formulação e na quantidade presente na fase aquosa da suspensão (QN não associada). A determinação da QN na fase aquosa foi realizada por ultrafiltração-centrifugação das suspensões (400 µL) (Ultrafree® – MC Millipore 10,000), durante 5 minutos a 10000 rotações por minuto (GUTERRES et al., 1995). A concentração de QN não-associada foi quantificada no ultrafiltrado, utilizando as mesmas condições descritas para a determinação da concentração total de QN. Essa determinação foi realizada logo após a preparação e doseamento de cada formulação. Para verificar a retenção do fármaco ao dispositivo de ultrafiltração, uma solução de fármaco com concentração conhecida foi tratada da mesma forma que suspensão, sendo o filtrado quantificado.

4.4 Validação do método analítico para o doseamento da quinina nas nanocápsulas

A validação foi realizada sob os critérios estabelecidos pela Resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que disponibiliza o Guia para Validação de métodos Analíticos (2003), pela Farmacopeia Americana e pela *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use* (ICH, 1996, 2003, 2005). Os parâmetros avaliados na validação foram a Especificidade, Linearidade, Precisão, Exatidão, Robustez e Fotoestabilidade.

4.4.1 Equipamentos

As análises foram realizadas no sistema da Shimadzu[®] LC (Kyoto, Japão), que consistia numa bomba LC-20AT, um detector de matriz de arranjo de fotodiodo (DAD) SPD-M20A, um controlador de sistema CBM-20A, um desgaseificador DGU-20A3 e um auto-injetor SIL-20A. Os dados foram obtidos e processados utilizando o software LC Solution (versão 1.22 SP1). A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna Waters RP-18 (4,6 mm x 300 mm x 5µm), com uma pré-coluna (4 x 3 mm id) empacotada com o mesmo material. A fotodegradação foi realizada em uma câmara de fotoestabilidade UV (1,0 x 0,17 x 0,17 m) revestida com espelhos, com três lâmpadas de radiação UV-A (352 nm, Orion, 30 W, 130 V) e cubetas (Brand[®]), como um recipiente para amostras, dispostas a 15 centímetros das lâmpadas UV-A.

4.4.2 Condições Cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada à temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), utilizando uma fase móvel composta por acetonitrila: água com trietilamina 0,01% (60:40) (v/v). O pH da fase aquosa foi ajustado para 3,0 com ácido fosfórico. Depois da preparação, a fase móvel foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore, Bedford, EUA) e desgaseificada utilizando um banho de ultrassom durante 20 min. O fluxo foi de 1,0 mL min⁻¹, o comprimento de onda para detecção da QN foi de 232 nm, e o volume de injeção de 20 µL.

4.4.3 Preparação das amostras de Nanocápsulas de Quinina

O método foi validado utilizando as nanocápsulas NC2-QN e NC3-QN. As respectivas formulações foram escolhidas para validação da metodologia analítica por agregarem o maior número de componentes, tendo a sua constituição a mais complexa dentre as nanopartículas desenvolvidas. As nanopartículas seguiram a mesma metodologia de preparação pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (Fessi et al., 1988). A composição das nanocápsulas encontra-se descrita na tabela 1. As nanocápsulas sem QN também foram preparadas e denominadas de nanocápsulas brancas (ou NC2-BR NC3-BR).

4.4.4 Preparação da solução padrão e das amostras

Uma solução-estoque de QN (1000 µg/mL) foi preparada através da dissolução de 10 mg de QN em acetonitrila, utilizando balão volumétrico de 10 mL. A solução padrão foi preparada por diluição da solução-estoque com acetonitrila para obter uma solução com uma concentração final de 20 µg/mL.

Para preparar as soluções das amostras, 0,1 mL das nanocápsulas (2 mg/mL de QN) foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com acetonitrila, obtendo uma concentração final de 20 µg/mL. Este balão foi mantido num banho de ultrassom durante 30 minutos para extração da QN. As soluções foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm antes da injeção.

4.4.5 Especificidade

A especificidade foi realizada através da observação de possíveis interferências dos excipientes utilizados nas NC de QN. Foram realizadas análises em triplicata das duas NC brancas (sem QN). Os cromatogramas dos placebos foram comparados com os cromatogramas das nanocápsulas contendo QN, para verificar possível interferência dos excipientes no mesmo tempo de retenção da quantificação do fármaco.

4.4.6 Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para avaliação da linearidade, as seguintes concentrações, a partir de uma mesma solução-mãe, foram preparadas: 12, 13,5, 15, 16,5, 18, 21 e 24 µg/mL. Foram preparadas 3 curvas de calibração nessas mesmas concentrações, em 3 dias diferentes, obtendo uma curva de calibração média. Os resultados foram avaliados por ANOVA e análise de regressão linear, utilizada para obter a equação, o coeficiente de correlação linear (r), limite de detecção (LD) e quantificação (LQ). O limite de quantificação foi calculado através da multiplicação do fator 10 pela interseção e dividindo o valor obtido pela inclinação da média. O mesmo procedimento foi utilizado para o cálculo de LD, contudo, o fator usado foi de 3,3, de acordo com as orientações do ICH.

4.4.7 Repetibilidade e precisão intermediária

A precisão foi avaliada através da repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). Para essas determinações, 6 amostras de

nanocápsulas contendo QN, na concentração de 20 µg/mL, foram preparadas e injetadas em 3 dias diferentes. Foram determinados os desvios padrão (DP) e os coeficientes de variação (CV%) da precisão intra-dia (n=6) e precisão inter-dia (n=18).

4.4.8 Exatidão

A exatidão do método foi realizada pela adição de uma quantidade conhecida de QN em 3 concentrações diferentes, uma baixa, média e alta (16, 20 e 24 µg/mL) em soluções de nanocápsulas brancas (placebo). A partir da recuperação do fármaco, foi calculada a exatidão do método, expresso em porcentagem de recuperação.

4.4.9 Robustez

A robustez foi realizada avaliando a influência de pequenas alterações dos parâmetros do método proposto nas análises de nanocápsulas contendo 20 µg/mL de QN, como por exemplo, proporção de fase móvel ACN: MeOH: H₂O pH 3,0 (40:40:20 e 50:30:20), alteração de fluxo (0,8 e 1,2 mL/min) e pH da água (2,8 e 3,2). Foi alterado apenas um parâmetro de cada vez e os resultados foram avaliados com base no coeficiente de variação (CV) (%) entre os valores obtidos com a alteração dos parâmetros.

A robustez também foi avaliada de acordo com os seguintes parâmetros: Rt (tempo de retenção), t (tailing ≤ 2,0), K (fator capacidade ≥ 2,0) e N (número de pratos teóricos ≥ 2000) de acordo com a limites estabelecidos pelo FDA (1994).

4.4.10 Fotoestabilidade

O método indicativo de estabilidade foi realizado pela exposição da QN livre e das suspensões de nanopartículas à radiação UV-A (352 nm), a fim de avaliar a possível proteção conferida pela nanoencapsulação. As amostras de QN livre, e sistemas nanoparticulados foram adicionadas em cubetas de quartzo (2 mL) no interior de uma câmara de fotoestabilidade por um período de 8 horas. Foram realizadas coletas de hora em hora (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas) de alíquotas de 100 µL de cada amostra para análise por CLAE-DAD. As amostras (nanopartículas) foram analisadas em comparação com o controle (QN livre) a fim de observar uma possível proteção do fármaco pelas

nanopartículas. Após cada coleta, tanto as amostras quanto o controle foram submetidos à diluição em acetonitrila a fim de obter uma concentração teórica de 20 µg/mL. As amostras foram filtradas em um filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore®) de diâmetro e em seguida foi realizada a injeção. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4.11 Cinética de fotodegração e determinação da ordem de reação

A ordem de reação foi determinada relacionando a concentração residual de QN em função do tempo (ordem zero); log da concentração residual de QN em função do tempo (primeira ordem); inverso da concentração residual da QN em função do tempo (segunda ordem) (NUDELMAN, 1975).

Na aplicação de métodos modelo-dependentes, a adequabilidade dos modelos aos dados experimentais foi avaliada com auxílio do programa Micro Math Scientist®, comparando os modelos entre si com base em parâmetros como o critério de seleção de modelo (MSC), o coeficiente de correlação (r), o ajuste gráfico e a coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade de cada modelo.

Para o coeficiente de correlação (r) obtido aquele que apresentar valor mais próximo da unidade é indicativo da ordem de reação. As equações para o cálculo da constante de reação (k) e $t_{1/2}$ para cada ordem de reação estão descritas abaixo.

Tempo de meia-vida:

$$\frac{t_{1/2}}{2} = \ln 2 / k$$

Reação de Ordem Zero:

$$C = C_0 - kt$$

Reação de Primeira Ordem:

$$\ln C = \ln C_0 - kt$$

Reação de Segunda Ordem:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$$

Onde C_0 = concentração dos reagentes no tempo zero; C = concentração após reação no tempo t; e k = constante de velocidade da reação.

4.5 Coeficiente de partição da quinina aos eritrócitos

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a ligação da QN livre e nanoencapsulada aos eritrócitos saudáveis e infectados com *P. berghei*, conforme descrito por Haas e colaboradores (2009). Utilizou-se o sangue de ratos que foram infectados conforme descrito no item 4.7.2.2, com uma parasitemia média de $9,25 \pm 1,5$ %. Os animais foram decapitados e o sangue coletado foi centrifugado durante 10 minutos a 12000 rpm, e a camada formada por plaquetas e leucócitos que se localiza na interface entre o plasma e o sedimento de hemácias foi descartada. O sedimento de hemácias foi lavado 3 vezes com solução tamponada de glicose com pH ajustado para 7,4. As células foram centrifugadas em centrífuga de micro-hematócrito após inserção em capilares, para o ajuste do hematócrito a 0,48 com a ressuspensão das hemácias no mesmo tampão. A solução de fármaco livre bem como os sistemas nanoparticulados contendo QN foram adicionadas em quantidade suficiente para obter uma concentração final de 10 µg/mL. Após 30 minutos de incubação, a 37 °C, sob baixa agitação, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi precipitado com TCA 5% (ácido tricloroacético) e após nova centrifugação foi quantificado. O sedimento foi separado e hemolisado com água destilada, centrifugado, em seguida também precipitado com TCA 5%, novamente centrifugado e então quantificado. Todas as amostras foram realizadas em triplicata e a quantificação da QN foi realizada em CLAE-DAD conforme descrito no item 4.4.2. O coeficiente de ligação da QN aos eritrócitos (D), descrito por Derendorf e Garret (1987), foi determinado pela seguinte equação:

$$D = \frac{As - (Csob.Vs.(1 - H))}{H.Vs.Csob}$$

Onde As é a quantidade de fármaco adicionado ao sistema, $Csob$ é a concentração de fármaco no sobrenadante, Vs é o volume final de suspensão de eritrócitos e H é o hematócrito.

4.6 Microscopia de força atômica

A morfologia das amostras foi avaliada através de microscopia de força atômica (MFA) (Agilent Technologies 5500). As imagens de MFA foram realizadas em temperatura ambiente, no modo não-contato, utilizando uma sonda de alta resolução SSS-NCL (Nanosensor, força constante= 48 N/m, frequência de ressonância = 154 kHz). As imagens foram capturadas utilizando software PicoView 1.14.4 da Molecular Imaging Corporation e foram analisadas utilizando PicoImage 5.1. Para as análises, as amostras foram diluídas em água MilliQ (1:50) e foram fixadas sobre o substrato de mica clivada até sua secagem completa. Após 24 horas do preparo, foram realizadas as análises.

Todas as análises de MFA foram realizadas em parceria com o laboratório de física da Universidade Federal do Pampa, Campus Bagé.

4.7 Avaliação biológica das nanocápsulas de quinina

4.7.1 Animais

Os ratos Wistar machos, com peso entre 130 e 150g foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Federal do Pampa, com livre acesso à água potável e ração, com luminosidade, temperatura e umidade adequadas aos animais. Após a inoculação com *P. berghei*, os animais foram mantidos no laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Pampa. Camundongos fêmeas (20 – 25 g) utilizados para a manutenção da cepa de *P. berghei* foram mantidos nas mesmas condições dos demais animais. Todos os experimentos envolvendo animais tiveram os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIPAMPA (Protocolo 010/2013 – em anexo).

4.7.2 Infecção Experimental

4.7.2.1 Manutenção da cepa *P. Berghei*

A cepa *P. Berghei* utilizada na infecção dos animais para a realização dos experimentos foi mantida *in vivo*, por meio da inoculação dos eritrócitos infectados em camundongos fêmeas através de passagens semanais, por administração via intraperitoneal (i.p.). A cepa utilizada foi fornecida pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.7.2.2 Indução e monitoramento da infecção

Ratos Wistar (130 –150g) foram infectados *P. berghei* a partir dos eritrócitos dos camundongos fêmeas (item 4.7.2.1) através da via i.v., com um inóculo de 10^8 hemácias parasitadas no dia 0 da infecção, a partir de modelo padronizado por PEDRONI e colaboradores (2006).

A infecção dos animais foi acompanhada através de esfregaços de sangue coletados da porção terminal da cauda dos animais. O sangue foi fixado com metanol e as lâminas coradas com corante Giemsa (WILCOX, 1960). A parasitemia foi determinada pelo quociente entre o número de hemácias infectadas e totais, expresso em porcentagem de hemácias parasitadas, após contagem de 10 campos na lâmina ou aproximadamente 500 hemácias. A visualização das lâminas foi realizada em microscópio ótico, com objetiva de 1000x, utilizando óleo de imersão. Esse mesmo procedimento foi realizado com os camundongos fêmeas, infectados para a avaliação da eficácia antimalárica da QN livre e nanopartículas.

4.8 Estabelecimento da dose efetiva de Quinina

Previamente aos ensaios farmacocinéticos foram testadas diferentes doses de QN livre para o estabelecimento prévio da menor dose efetiva. O protocolo de infecção dos animais utilizado foi descrito anteriormente no item 4.7.2.2.

Uma solução aquosa de cloridrato de QN foi administrada pela via i.p. a partir do dia 0 de infecção, durante quatro dias em camundongos fêmeas de linhagem Swiss, seguindo o protocolo de supressão de PETER'S (1975). Foram testadas as doses de QN de 20 e 40 mg/kg. Os tratamentos foram monitorados pela determinação da parasitemia. Na dose de 20 mg/kg os animais apresentaram elevados picos de parasitemia, e mesmo após os três dias consecutivos de tratamento não houve redução na infecção. A dose de QN foi então dobrada para 40 mg/kg e seguiu-se o mesmo protocolo de indução da infecção e tratamento. Como para os experimentos *in vivo* as doses de QN seriam altas, buscou-se reduzir o volume de administração das suspensões a volumes adequados para a administração pela via i.v. ou i.p. em ratos (duas administrações por dia de 20 mg/kg). A porcentagem de parasitemia foi monitorada, e mesmo não levando a cura dos

animais, apresentou resultados de porcentagem de parasitemia bastante inferiores aos observados com a dose testada anteriormente.

4.9 Ensaios Farmacocinéticos

Os experimentos farmacocinéticos foram conduzidos a partir da dose de 20 mg/kg, pelo estabelecimento da menor dose efetiva de 40 mg/kg/dia dividida em duas administrações de 20 mg/kg devido ao elevado volume de administração. Foram utilizados Ratos Wistar Machos (130 – 150g) infectados com *P. berghei* (item 4.7.2.2.). Após 7 dias de infecção foram realizados os experimentos de farmacocinética para padronização de uma baixa parasitemia em todos animais utilizados (8,5 – 10% de parasitemia). Os animais tiveram livre acesso à ração e água *ad libitum*. Foram administradas as suspensões de nanocápsulas e a QN livre (QN cloridrato) pela via i.v. bolus (n=7/grupo), através da veia caudal lateral esquerda dos animais. As coletas de sangue após a administração foram realizadas nos tempos 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 e 30 horas através da veia caudal lateral, com o auxílio de *butterfly*. O sangue foi acondicionado em tubos Eppendorf de 1,5 mL, previamente heparinizados, seguindo de centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C a fim de separar o plasma. Posteriormente as amostras de plasma foram congeladas a -80°C até a quantificação por UFLC-MS.

4.9.1 Equipamentos e Condições Cromatográficas para quantificação da Quinina em amostras de plasma de rato

As concentrações plasmáticas de QN foram determinadas por UFLC-MS (Shimadzu, Quioto, Japão) de acordo com a metodologia analítica descrita por Brum Jr (2011). Utilizou-se um cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence® UFLC (*ultra fast liquid chromatography*) acoplado ao detector de massas LCMS-2020, equipado com degasser DGU-20A3, bombas LC-20AD, injetor automático SIL-20AC HT, forno de coluna CTO-20 AC, detector de massas e software LC Solution V. 1.24 SP1. As análises foram realizadas com uma coluna C₁₈ (50mm x 2.1mm x 5 µm) (Waters, Milford, EUA) com uma pré-coluna acoplada (C₁₈, 4 x 3 mm). O sistema foi operado isocriticamente com temperatura de forno controlada (35°C), usando uma fase móvel composta de acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (40:60, v/v). A fase móvel foi filtrada

através de uma membrana de 0,45 μm (Millipore, Bedford, EUA), a taxa de fluxo foi de 0,45 mL/min e o volume de injeção foi de 10 μL . A técnica de ionização utilizada foi "electrospray" em modo positivo e as massas monitoradas são 325,0 > 307,0 (quinina) e 252,8 > 159,0 (cimetidina, padrão interno, PI).

4.9.2 Preparação da solução estoque e amostras

A solução estoque de QN foi preparada por dissolução do pó em uma mistura de acetonitrila/água (50:50 v/v) a fim de obter-se uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. As soluções de trabalho foram preparadas combinando alíquotas de soluções estoque e volumes adequados da mistura de solventes citada acima para obtenção de 7 soluções-padrão contendo as seguintes concentrações: 100, 200, 500, 1000, 5000, 10000 e 25000 ng/mL.

Uma solução estoque de cimetidina (Padrão interno, PI) foi preparada em uma mistura de acetonitrila/água (50:50 v/v) para produzir uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ diluída para 50 $\mu\text{g/mL}$. Todas as soluções foram preparadas no momento das análises.

As curvas de calibração foram preparadas em 90 μL de plasma, com 10 μL da solução de trabalho apropriada e 10 μL da solução de PI resultando nas concentrações finais da curva em 10, 20, 50, 100, 500, 1000 e 2500 ng/mL de QN e 5 $\mu\text{g/mL}$ de PI. Posteriormente, 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% foram adicionados para a precipitação das proteínas plasmáticas, em seguida foram agitadas em vórtex e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para o *vial* e injetado no UFLC-MS. No caso das amostras, após descongelamento, elas foram submetidas ao mesmo processamento citado acima.

4.9.3 Análise dos dados de farmacocinética plasmática

Perfis individuais de plasma foram avaliados por abordagem não compartimental usando equações clássicas (SHARGEL, 2005) com o auxílio do programa de computador Excel[®] 2003 (Microsoft[®]). A constante de velocidade de eliminação (k_e), a área sob a curva do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$), a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$), o tempo de residência médio (MRT), o volume de distribuição em estado estacionário (V_{dss}) e a depuração plasmática total (Cl_{tot}) foram calculados.

4.10 Avaliação da eficácia das nanocápsulas contendo quinina

A eficácia das NC contendo QN foi avaliada através da administração intraperitoneal (i.p.) em camundongos fêmeas de linhagem Swiss. O protocolo de infecção dos animais utilizado foi descrito anteriormente no item 4.7.2.2.

Foram ao total nove grupos de tratamento incluindo os sistemas nanoparticulados com QN, as respectivas NC brancas, além dos grupos controles de QN livre, Cloroquina (controle positivo) e um grupo salina (controle negativo). Cada grupo foi composto por 6 camundongos. O tratamento teve início no dia 0 (dia da infecção) e teve duração de quatro dias ($D_0+D_1+D_2+D_3$), seguindo o protocolo de supressão de Peter's (PETER'S, 1975). A dose administrada tanto da QN livre quanto da QN incorporada às NC foi de 40 mg/kg, dividida em duas administrações por dia, conforme descrição no item 4.8. Após a inoculação, foram feitos esfregaços de sangue dos camundongos e corados com solução de Giemsa a 10%, para determinar a porcentagem de parasitemia microscopicamente. Foi realizado o acompanhamento da parasitemia até a morte de todos os animais. Foram avaliados o tempo de sobrevivência dos animais, a porcentagem de parasitemia média através dos esfregaços de sangue e a atividade supressora da parasitemia, que foi determinada no 5º dia pós-infecção, utilizando a seguinte equação segundo Tepongnig, 2011.

$$\% \text{ redução} = 100 \times \left[\frac{C - T}{T} \right]$$

Onde C é a porcentagem de parasitemia média do grupo controle e T é a porcentagem de parasitemia média do grupo tratado.

4.11 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando ANOVA e teste t , sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados

Diferentes sistemas nanoparticulados, foram desenvolvidos utilizando diferentes polímeros e tensoativos a fim de propor formulações com diferentes características de superfície. O objetivo foi obter nanopartículas eficazes, com o direcionamento da QN ao local-alvo (hemácias infectadas) pela consequência de um maior coeficiente de partição em eritrócitos infectados com *P. berghei* ou aumento do tempo de permanência do fármaco na circulação, com consequente diminuição da toxicidade do fármaco.

As nanopartículas compostas por PCL-PEG, também conhecidas como “furtivas” foram desenvolvidas com o objetivo de promover um maior tempo de permanência no local alvo da QN (eritrócitos infectados) pela capacidade do PEG de contornar o sistema de opsonização (SOPPIMATH et al., 2001; BARRAT et al., 2000). Ainda pensando nas características de superfície, as partículas com PCL revestidas com polissorbato (Tween[®]) foram desenvolvidas devido às características anfifílicas do tensoativo, capazes de diminuir a tensão superficial entre partícula e célula, permitindo um maior contato entre ambas (VENTURINI et al., 2011; LOBATO et al., 2013). Para cada nanocápsula (NC), uma respectiva nanoesfera (NE) foi desenvolvida, a fim de avaliar a interferência do núcleo oleoso entre esses sistemas. Também foram desenvolvidas uma nanoemulsão (NM) e uma micela (MIC) a fim de avaliar a interferência do polímero e do óleo na composição das partículas.

As nanopartículas, com diferentes características de superfície e organização estrutural, foram caracterizadas através de parâmetros físico-químicos, como diâmetro (nm), índice de polidispersão, pH, potencial zeta (mV), microscopia de força atômica, teor (%) e taxa de encapsulação (%) da QN. Comparativamente, formulações sem o fármaco foram preparadas.

Todas as NC e NE apresentaram diâmetros na faixa nanométrica, porém todas as NC apresentaram diâmetro mais adequado e com uma melhor reprodutibilidade em relação às respectivas NE, que pode ser visualizado pelo menor desvio padrão. Quanto às respectivas nanoesferas, apresentaram uma variabilidade nos resultados de diâmetro e polidispersibilidade. Como resultado, observa-se na diferença significativa no parâmetro tamanho de partícula entre todas as nanocápsulas contendo QN e suas respectivas nanoesferas.

Essa dificuldade na reprodutibilidade do diâmetro das NE pode ser atribuída a uma maior instabilidade do sistema observada durante a preparação, por não apresentar um núcleo oleoso pelo qual o fármaco tem grande afinidade, visto que o óleo pode representar um importante fator na determinação das propriedades físico-químicas e estabilidade dos sistemas nanoparticulados (MOSQUEIRA et al., 2000) além de influenciar no diâmetro das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanopartículas preparadas com Eudragit[®] apresentaram diâmetros médios significativamente inferiores àqueles encontrados para os sistemas preparados com PCL revestidos com polissorbato. As nanopartículas sem QN também apresentaram estas diferenças, que por sua vez, estão de acordo com aquelas observadas anteriormente por Schaffazick e colaboradores (2005) no desenvolvimento de NC, empregando os mesmos polímeros.

Santos e colaboradores (2014) obtiveram valores de diâmetro que variaram de 169 ± 15 nm a 173 ± 12 nm para as NC com óleo de côco, preparadas com Eudragit[®], estando de acordo com os valores obtidos pelo nosso estudo para as nanopartículas com o mesmo polímero.

Neckel e Lemos-Senna (2005), por exemplo, desenvolveram NC de Ácido poli (D,L-lático)(PLA) e Ácido poli (D,L-lático) revestidas com polietilenoglicol (PLA-PEG) e também evidenciaram uma redução do diâmetro médio pelas NC de PLA-PEG, o que atribuíram ao caráter anfifílico do mesmo.

Os valores de pH obtidos para as suspensões de PCL revestidas com polissorbato apresentaram valores significativamente mais baixos em relação as demais suspensões. Essa maior acidez pode estar relacionada à ionização dos grupos funcionais presentes nas cadeias poliméricas de PCL, como por exemplo, a de grupos carboxílicos terminais que se encontram presentes no polímero, reduzindo o pH (SCHAFFAZICK et al., 2003; SANTOS et al., 2015).

O potencial zeta é a análise do potencial elétrico de superfície, que pode ser positivo ou negativo, o qual é influenciado pelas características de superfície das nanopartículas através da utilização de diferentes componentes, como os polímeros e tensoativos. Quanto mais distanciado de zero, maior é a estabilidade física do sistema (SCHAFFAZICK et al., 2003). A avaliação do potencial zeta é muito importante para determinar a estabilidade física das suspensões, ou para determinar a eficácia do revestimento de superfície ou a adsorção dos fármacos nas nanopartículas (GUTERRES et al., 2007).

As análises de potencial zeta também têm sido utilizadas para estudar a ativação, aglutinação e adesão celular, que estão diretamente relacionadas com as propriedades de carga de superfície (LIN et al., 2006; ZHANG et al., 2008), podendo ser um parâmetro crítico para a avaliação da interação celular com as nanopartículas (ZHANG et al., 2008).

Em um estudo realizado por Zhang e colaboradores (2008), as análises do potencial zeta foram utilizadas para investigar as respostas de carga de superfície de células epiteliais normais da mama (MCF10A) e células epiteliais de câncer de mama (MCF7), incubadas em nanopartículas de óxido de ferro e nanopartículas de CPMV (*Cowpea Mosaic Virus*). Foram observadas alterações no potencial zeta de ambos os tipos de células epiteliais, indicando que o potencial zeta pode além de fornecer uma visão sobre a natureza da interação celular com as nanopartículas, também ser utilizado para investigar a natureza das respostas de células normais e cancerosas com os métodos de diagnóstico e terapêutica baseados em nanopartículas.

Analisando o potencial zeta obtido para as nanocápsulas de PCL revestidas com polissorbato observam-se valores fortemente negativos, o que pode ser atribuído ao tensoativo, em virtude principalmente da presença de lipídios ácidos (SCHAFFAZICK et al., 2006). Hafner e colaboradores (2009) sintetizaram nanopartículas de lecitina S100, S75 e S45 encapsulando a melatonina. Foram obtidas partículas de carga superficial negativas, sendo estes valores crescentes da lecitina S100 (-12,4 mV) para a lecitina S45 (-33,3 mV), confirmando, assim, a característica aniônica dessas moléculas.

A lecitina é uma mistura heterogênea de fosfolipídios e sua heterogeneidade é extremamente benéfica, devido à fluidez do filme interfacial, quando comparada com a de um fosfolipídio puro (LAWRENCE, 1996). Os principais fosfolipídios da lecitina são a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina. Pequenas quantidades de lipídios, tais como ácido fosfático, fosfatidilserina e fosfatidilglicerol, também podem estar presentes. Esses lipídios são ionizados em pH 7,0 e induzem uma carga de superfície negativada às nanopartículas, o que contribui para a sua estabilidade (WASHINGTON, 1990). O potencial zeta é dependente do pH e uma redução no mesmo resulta em uma diminuição da carga de superfície (menos negativa) e em uma taxa de floculação mais rápida (BRUXEL et al., 2014).

Bruxel e colaboradores (2014) avaliaram o diâmetro médio e o potencial zeta de nanoemulsões compostas por diferentes lecitinas em um intervalo de pH de 2,0 a 8,0 e concluíram que o pH das nanoemulsões deve ser de preferência maior do que 7,0, uma

vez que o potencial zeta atingiu um patamar negativo, onde foi observada a repulsão máxima entre as partículas.

O polímero PCL também pode ter influenciado no potencial zeta negativo das nanopartículas, decorrente da presença dos grupamentos éster do polímero e de acordo com valores anteriormente descritos na literatura para formulações preparadas com este polímero (PAESE et al., 2009; LOBATO et al., 2013; SANTOS et al., 2015; WEBER et al., 2016), além da influência do revestimento por polissorbato 80, através do mecanismo de estabilização da partícula por impedimento estérico (JÄGER et al., 2009; SARI et al., 2014).

As suspensões revestidas apresentaram carga de superfície menos negativa em relação às suspensões contendo somente PCL. Essa redução de cargas negativas na superfície das NC com PEG está provavelmente associada ao mascaramento dos grupamentos carboxílicos terminais do PCL pela presença de PEG (GREF et al., 1995; NECKEL e LEMOS-SENNA, 2005; HU et al., 2007; CHAUDARI et al., 2012).

As nanopartículas baseadas na redução da hidrofobicidade da superfície através da adsorção física de um polímero hidrofílico, como o PEG, são muito utilizadas para administração i.v. de fármacos, pois além de permitir a manutenção da forma ativa da molécula, aumentam seu tempo de residência na circulação sistêmica e sua concentração no local alvo (DORATI et al., 2007; CHAUDARI et al., 2012).

Chaudari e colaboradores (2012) desenvolveram nanopartículas de PBCA (poli(n-butilciano acrilato)) revestidas com PEG. Foi observado que o revestimento com o polímero hidrofílico protegeu as nanopartículas contra o reconhecimento pelas células fagocitárias e aumentou o tempo de $t_{1/2}$ de circulação.

As suspensões preparadas com Eudragit[®] apresentaram potencial zeta positivo, que pode ser atribuído à carga positiva de grupamento amônio quaternário presente no polímero (DOMINGUES et al., 2008; CONTRI et al., 2012; SANTOS et al., 2014). Este resultado corrobora com os encontrados por Contri e colaboradores (2012), que ao avaliarem o potencial zeta de NC contendo óleos vegetais preparadas com Eudragit[®], a partir do mesmo método empregado em nosso estudo, também verificaram valores positivos do potencial zeta para estas formulações.

Santos e colaboradores (2014) desenvolveram NC preparadas com óleo de coco e clotrimazol empregando como polímero o Eudragit[®] para tratamento antifúngico contra *Candida* spp. As NC apresentaram carga positiva na análise de potencial zeta, resultando em um maior potencial para se ligarem a compostos carregados

negativamente sobre a superfície da mucosa. A partir da avaliação microbiológica observou-se que as NC apresentaram uma elevada atividade antifúngica contra *Cândida spp.*, o que foi atribuído ao aumento do tempo de residência do fármaco na cavidade vaginal, propiciando melhores resultados.

O potencial zeta positivo pode desempenhar um papel importante na interação com a membrana das células pela diferença de cargas, possibilitando uma maior afinidade entre partícula-membrana e conseqüentemente uma maior interação com o fármaco (UBRICH et al., 2005; DURÁN-LOBATO et al., 2014).

5.2 Validação do método analítico para o doseamento da quinina nas nanocápsulas

As NC2-QN e NC3-QN foram escolhidas dentre os sistemas nanoparticulados para a validação do método para a quantificação da QN, por apresentarem a maioria de constituintes em sua formulação em relação aos demais sistemas desenvolvidos. Assim foi possível observar qualquer tipo de possível interferência no método desenvolvido por algum tipo de material utilizado.

A melhor condição cromatográfica foi conseguida utilizando uma fase móvel com acetonitrila e água com 0,01% de trietilamina (pH ajustado a 3,0 com ácido fosfórico) (60:40, v/v), com um fluxo de 1,0 mL/min e um tempo de corrida de 10 minutos. Com o detector DAD foi possível realizar uma análise em diferentes comprimentos de onda, obtendo-se uma absorção máxima para QN em 232 nm, a fim de obter o máximo de área de cada pico.

5.2.1 Especificidade

A especificidade do método para QN foi estabelecida através da determinação da pureza do pico do analito pela análise da solução padrão utilizando o detector-DAD. Nenhuma interferência de excipientes das formulações foi encontrada no mesmo tempo de retenção da QN demonstrando que o método proposto é específico para a análise de QN. A pureza do pico foi de 99,9%.

5.2.2 Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A linearidade da QN foi avaliada no intervalo de concentração de 12-24 µg/mL. As curvas de calibração construídas para QN foram lineares e a equação obtida foi $y = 103.540,2232x + 68.439,8428$, onde y é a relação da área do pico da QN e x é a concentração de QN em µg/mL. O coeficiente de correlação foi de 0,9995. A validade do ensaio foi verificada por meio de análise de variância (ANOVA), que demonstrou que a equação foi de regressão linear (era F calculado = $1.05.10^2 > F_{\text{critico}} = 4,96$; $\alpha = 0,05$), sem desvio da linearidade (F calculado = $1,10. 10^{-2} < F_{\text{critico}} = 3,33$; $\alpha = 0,05$). Os LD e LQ foram estimados em 2,29 e 6,94 µg/mL, respectivamente, indicando que a sensibilidade do método é adequada.

5.2.3 Precisão intermediária e repetibilidade

A precisão do método foi determinada pelo cálculo do Desvio Padrão Relativo (DPR) para seis determinações das amostras contendo QN, realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais (intra-dia ou repetibilidade). A precisão inter-dia foi avaliada por meio da análise de seis amostras em três dias diferentes. Um baixo DPR (%) foi obtido para a precisão intra-dia (<1,0%) e para a precisão inter-dia (0,875% para NC2-QN e 0,629% para NC3-QN). A NC2-QN apresentou um teor levemente mais alto em relação à NC3-QN, mas os diferentes sistemas nanoparticulados apresentaram um baixo DPR% na precisão intra-dia quanto na precisão inter-dia, confirmando boa precisão do método para as NC de QN.

5.2.4 Exatidão

A exatidão foi calculada como a porcentagem de recuperação pelo ensaio de adição de uma quantidade conhecida (três concentrações) de QN em NC brancas. A recuperação de quase todo fármaco na amostra em três concentrações diferentes (alta, média e baixa) com um baixo DPR% indica que o método é exato.

5.2.5 Robustez

A robustez do método proposto foi avaliada por mudanças nas condições cromatográficas como a taxa de fluxo, composição da fase móvel e do pH. Os valores dos parâmetros na avaliação da robustez são mostrados na Tabela 6. Todas as condições avaliadas resultaram em pequenas alterações no tempo de retenção, tailing e número de pratos teóricos em comparação com as condições analíticas propostas. Os resultados foram satisfatórios, de acordo com a literatura (ICH, 1996, 2003, 2005). Não houveram diferenças significativas relacionadas com a quantificação da QN ($DPR < 2,0\%$) e nenhuma dessas alterações causou um efeito significativo na sua determinação nas NC, indicando a robustez do método.

5.2.6 Fotoestabilidade

A avaliação da estabilidade em condições forçadas permite determinar o efeito de condições de degradação sobre o produto farmacêutico. É um método bastante utilizado para determinação de possível degradação dos fármacos e avaliação de possíveis produtos de degradação (CARSTENSEN e RHODES, 2000). A Conferência Internacional de Harmonização (*International Conference on Harmonisation – ICH*) (2003) bem como outros guias, preconizam que os testes de degradação forçada sejam realizados para avaliar as características de estabilidade da substância ativa e os estudos de fotodegradação são partes integrantes desses testes.

A degradação de um produto farmacêutico pode ocasionar inúmeras alterações em suas características, com sérias consequências a sua qualidade, tais como: redução da sua atividade, diminuição da biodisponibilidade, perda da uniformidade de conteúdo, perda da qualidade microbiológica, formação de produtos de toxicidade elevada, entre outras. Assim, a avaliação da estabilidade dos medicamentos, de forma a assegurar a eficácia, segurança e pureza é de extrema importância (SILVA et al., 2009).

Os sistemas nanoparticulados vêm sendo muito utilizados como estratégia para proteger os fármacos fotossensíveis da degradação à luz UV, já que muitos materiais utilizados na elaboração destes sistemas, como os polímeros biodegradáveis, e o óleo utilizado como núcleo, podem auxiliar na proteção de moléculas ativas, como por exemplo, o Resveratrol (DETONI et al., 2012).

Detoni e colaboradores (2012) avaliaram o perfil de degradação do Resveratrol, e observaram uma diminuição de 90,4% na sua concentração em solução etanólica no período de 4 horas, enquanto a fotodegradação foi significativamente mais lenta quando

o Resveratrol foi associado a lipossomas (29,3%), nanocápsulas (67,2%), nanoesferas (77,8%) e carreadores lipídicos nanoestruturados (70%).

Neste estudo a concentração de QN remanescente na amostra irradiada a partir da concentração inicial foi avaliada quantitativamente através de CLAE-DAD.

Esta estabilidade aumentada das NC pode ser explicada pela sua estrutura coloidal que restringe o contato do fármaco com a fase externa (WEBER et al., 2016). Esses resultados confirmam resultados de estudos anteriores, demonstrando que a presença de materiais poliméricos nas formulações exerce ação protetora ao fármaco, visto que a cristalinidade do polímero reflete e espalha a luz UV. Esta proteção pode ser devido às propriedades dos polímeros PCL e Eudragit[®] que possuem características cristalinas, facilitando a reflexão da luz e a dispersão da radiação UV (JIMÉNEZ et al., 2004; SAVIAN et al., 2015). Também pode ser devido à presença do núcleo oleoso, visto que muitos óleos apresentam propriedades antioxidantes, o que explica a maior proteção da QN pelas NC em relação às NE (OURIQUE et al., 2008; SANTOS et al., 2014).

Em um estudo realizado por Fontana e colaboradores (2009) a fotoestabilidade de nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões contendo propionato de clobetasol foi avaliada utilizando radiação UV-A por 24 horas. O perfil de fotodegradação da solução com o fármaco livre (solução etanólica) e dos sistemas nanoestruturados seguiram uma cinética de primeira ordem e a encapsulação do fármaco claramente reduziu a fotodegradação quando comparados com o fármaco livre. As nanocápsulas foram as que apresentaram o maior $t_{1/2}$, seguidas pelas nanoemulsões e nanoesferas. Esses resultados condizem com os encontrados neste trabalho, demonstrando a importância da presença do polímero (poli- ϵ -caprolactona) e do óleo para prevenir a fotodegradação do fármaco. A presença de ambos (polímero e óleo) conferiu a maior proteção do propionato de clobetasol contra radiação UV-A, assim como neste trabalho, uma maior proteção à QN.

Mesmo depois de 8 horas de exposição à luz UV-A não foram evidenciados produtos de degradação no mesmo comprimento utilizado, tanto para a QN livre quanto para as nanocápsulas NC2-QN e NC3-QN, apenas uma redução no teor de QN. Na análise dos cromatogramas obtidos pode-se verificar que ocorreu, para a QN livre, uma queda acentuada no pico referente ao fármaco.

Através destes resultados, fica evidente que a nanoencapsulação de QN protege o fármaco contra a sua degradação por exposição à luz UV-A. Isto indica que as NC

podem ser sistemas alternativos para proteção de fármacos que são sensíveis à degradação pela luz.

Na fotodegradação foi observada proteção da QN pelas nanopartículas depois de 8 horas de exposição à radiação UV-A, o que não aconteceu com o padrão, onde se observa o dobro da degradação em comparação com sistemas nanoparticulados.

5.2.7 Cinética de fotodegradação e determinação da ordem de reação

A fotossensibilidade da QN foi verificada a partir dos resultados obtidos nos estudos de degradação forçada e, devido à degradação encontrada, buscou-se obter dados sobre a velocidade de degradação fotoquímica da QN em solução e nos sistemas nanoparticulados.

A cinética é o estudo da velocidade em que as reações ocorrem. Entre os objetivos dos estudos de cinética de degradação estão a obtenção dos dados cinéticos, a proposição do mecanismo de reação e o estabelecimento de condições para modificar a velocidade de reação conforme necessidade (LEITE, 2005).

As reações de ordem zero são aquelas em que a velocidade de reação não depende da concentração dos reagentes. Nas reações de primeira ordem a velocidade de reação é proporcional à concentração de um dos reagentes, enquanto nas reações de segunda ordem a velocidade de reação é proporcional à concentração dos dois reagentes ou à segunda potência da concentração de um dos reagentes (NULDEMAN, 1975). A partir da determinação da ordem de reação, torna-se possível um melhor entendimento do perfil de degradação da amostra, de modo a permitir também a obtenção de outros dados cinéticos, como a constante de velocidade de reação (k) e o tempo de meia vida de degradação ($t_{1/2}$).

Sugere-se que a cinética de reação que melhor descreve a redução da concentração de QN livre em função do tempo é de segunda ordem, ou seja, a redução no teor de QN depende da concentração de dois reagentes ou a segunda potência da concentração de um deles, sendo neste caso possivelmente relacionada com a segunda potência da radiação incidida. As NC apresentam duas barreiras de difusão para liberação do fármaco, a parede polimérica e o núcleo oleoso. A parede polimérica impede o contato direto do fármaco com o tecido, que está dissolvido no núcleo oleoso, o que ajuda a impedir a liberação imediata do fármaco (RIEUX et al., 2006; TORCHILIN, 2006), causando menor porcentagem de degradação em relação às NE.

Alguns estudos anteriores também apresentaram resultados positivos a partir da nanoencapsulação de substâncias. Ourique e colaboradores (2010) desenvolveram nanocápsulas lipídicas contendo tretinoína a fim de avaliar o seu efeito protetor contra a radiação UV- A e UV-C além da determinação da ordem de reação. Os resultados demonstraram uma maior fotoproteção das NC à radiação UV-A em relação à UV-C e uma cinética de degradação de ordem zero.

Weber e colaboradores (2016) desenvolveram nanocápsulas de núcleo lipídico contendo Dipropionato de betametasona (NC-BD) e avaliaram a fotoproteção à radiação UV-C em comparação com o fármaco em solução (S-BD). A cinética de degradação do fármaco foi estimada de acordo com o melhor coeficiente de correlação (r). Uma cinética de primeira ordem foi observada para ambas as amostras (S-BD e NC-BD), demonstrando que a velocidade de reação depende da concentração da substância ativa. Com base na ordem encontrada, o $t_{1/2}$ foi calculado. A meia-vida para a NC-BD foi de 7,18 h enquanto que para S-BD foi de 1,5 h.

Savian e colaboradores (2015) avaliaram a fotoestabilidade do Ditranol incorporado em nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ácido ascórbico (DIT-LCNC_{AA}) ou ácido etilenodiaminotetracético (DIT-LCNC_{EDTA}), e em solução (DIT - S_{EDTA} e DIT-S_{AA}). As DIT-LCNC_{EDTA} apresentaram uma diminuição no teor de Ditranol em cerca de 60% após 5 horas de exposição à radiação UV-A, enquanto que a DIT - S_{EDTA} mostrou uma degradação de 70% após 1,5 h para. A DIT-LCNC_{AA} mostrou uma maior estabilidade, uma vez que após 20 h de exposição foi observada uma diminuição no teor de fármaco de cerca de 60%. Resultado semelhante foi obtido para DIT-S_{AA}, após 9 h de exposição. As soluções DIT - S_{EDTA} ($t_{1/2} = 1,04 \pm 0,01$), DIT-S_{AA} ($t_{1/2} = 7,55 \pm 0,01$) e DIT-LCNC_{EDTA} ($t_{1/2} = 3,97 \pm 0,33$) apresentaram ordem de reação zero enquanto que a DIT-LCNC_{AA} ($t_{1/2} = 16,65 \pm 0,42$ h) apresentou reação de primeira ordem e maior $t_{1/2}$.

5.3 Coeficiente de partição da quinina aos eritrócitos

O teste de coeficiente de partição da QN nos eritrócitos (D) foi realizado a fim de avaliar a possibilidade do tipo de estrutura (nanocápsulas/nanoesferas) e do tipo de revestimento aumentar a ligação do fármaco aos eritrócitos.

Nossos resultados condizem com os encontrados por Brum e colaboradores (2011), que avaliaram o coeficiente de partição (D) da Quinina/Doxiciclina (QN/DOX)

a fim de elucidar a causa da redução da dose efetiva dessa associação quando em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). O experimento foi realizado comparando os fármacos livre e nanoencapsulados utilizando sangue de ratos saudáveis e infectados com *P. berghei*. O *D* nos eritrócitos infectados aumentou quando a QN foi nanoencapsulada ($5,53 \pm 0,28$) em comparação a QN livre ($3,81 \pm 0,23$). Para a DOX não ocorreu alteração significativa no *D* nos eritrócitos entre o fármaco livre e nanoencapsulado. Os autores atribuem o resultado da diminuição da dose efetiva no experimento de ratos infectados com *P. berghei* ao aumento da penetração da QN nos eritrócitos infectados quando nanoencapsulada, uma vez que a QN age no ciclo eritrocitário da malária.

Todas as nanocápsulas mesmo com diferentes características de superfície, demonstraram altos valores de ligação da QN, dificultando o estabelecimento do mecanismo pelo qual ocorre essa maior penetração intra-eritrocitária.

A interação entre as NC e as células tem sido frequentemente estudada e algumas hipóteses vêm sendo consideradas. Sabe-se que as hemácias quando parasitadas apresentam mudanças na membrana celular, com alteração das propriedades de transporte, exposição de antígenos de superfície, além de alterações na morfologia, caracterizadas pela formação de protuberâncias, até o rompimento da hemácia (GOMES et al., 2011), o que pode ter facilitado a adesão das nanopartículas aos eritrócitos infectados, propiciando um maior contato da QN com o parasita no vacúolo celular.

Há uma hipótese de que as partículas com uma porção de hexose são capazes de se ligar ao eritrócito humano transportador de glicose GLUT-1, assim como o transportador de hexose ao parasita (PfHT1), sendo preferencialmente direcionadas aos eritrócitos infectados (IRBC) em virtude de uma maior densidade dessa ou ambas proteínas na superfície do IRBC (SLAVIC et al. 2011). Pensando nisso, Heikham e colaboradores (2015) realizaram um estudo para elucidar o possível mecanismo pelo qual as partículas portadoras de glicose possam ter como alvo os IRBC. A partir disso foram desenvolvidas nanopartículas com amido de milho (grau farmacêutico) contendo quinina, além de um marcador fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC). A avaliação foi realizada a partir de citometria de fluxo utilizando sangue humano com eritrócitos saudáveis e infectados por *P. falciparum*. Foi observado que os IRBC apresentaram maior captação das partículas do que os RBC não infectados, mostrando que as partículas podem além de melhorar a penetração do fármaco nos eritrócitos, como também direcioná-lo aos eritrócitos infectados com maior eficiência.

Valle-Delgado e colaboradores (2013) desenvolveram nanopartículas com a heparina ligada covalentemente e avaliaram em concentrado de hemácias infectadas por *P. falciparum* como um modelo para estudar as interações com os pRBC. A avaliação da microscopia de fluorescência e ensaios de separação de células por fluorescência mostraram a especificidade que a heparina tem com o concentrado de hemácias infectadas com as formas tardias do parasita. Nenhuma ligação significativa de heparina com hemácias não infectadas foi observada. Os autores sugerem que a citoaderência das nanopartículas contendo heparina aos eritrócitos pode ser mediada pela proteína de membrana do eritrócito com *P. falciparum* (PfEMP1), uma proteína antígenicamente derivada do parasita e expressa na superfície das hemácias. A PfEMP1 está localizada nas protuberâncias formadas nos eritrócitos, que apresentam propriedades aderentes após 16 horas de invasão do parasita.

5.4 Microscopia de força-atômica

A microscopia de força atômica (MFA) tem sido cada vez mais utilizada para a caracterização de sistemas nanoparticulados, como os lipossomas (RUOZI et al., 2005), nanoesferas (FENG et al., 2002), e nanocápsulas (LEITE et al., 2005; MOSQUEIRA et al., 2005).

A MFA oferece algumas vantagens em relação a outras técnicas de caracterização morfológica, tais como, resolução molecular e mínimo preparo de amostras. Por meio desta técnica é possível verificar o tamanho de partícula, as propriedades estruturais, possíveis deformações e diferentes constituintes dos sistemas nanoestruturados. A MFA fornece ainda informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície ao nível atômico (NEVES et al., 1998).

Neste trabalho a MFA foi realizada a fim de confirmar os resultados das medições de diâmetro e avaliação da morfologia. A MFA permite a caracterização da forma e estrutura da superfície das amostras. Diferentes amostras das nanopartículas foram analisadas em diferentes campos e foi observada uma homogeneidade das mesmas em relação ao formato e estruturas, apresentando partículas com estruturas esféricas e tamanhos regulares, o que condiz com os resultados obtidos na análise do índice de polidispersão.

O tamanho médio das nanopartículas pela análise da MFA apresentou-se em uma faixa nanométrica estando em concordância com os resultados obtidos por difratometria a laser, através do equipamento Mastersizer[®] 2000. Já as nanopartículas brancas apresentaram um diâmetro mais elevado quando analisadas por MFA em relação à análise por difratometria a laser, porém todas se mostraram homogêneas, esféricas e ainda dentro de uma faixa de diâmetro nanométrica.

5.5 Avaliação da Farmacocinética

Os estudos de farmacocinética foram realizados a fim de avaliar se os sistemas nanoparticulados com características de superfície modificada são capazes de alterar o perfil farmacocinético da QN. O método de processamento das amostras de plasma de ratos utilizando a extração de precipitação de proteínas com TCA e detecção da QN através de LC-MS foi desenvolvido e validado por Brum e colaboradores (2011) e adaptado para este trabalho para a análise de QN em plasma de rato. O método inclui como padrão interno a cimetidina, uma substância disponível comercialmente.

O estudo farmacocinético foi conduzido com a QN na forma livre e nanoencapsulada administradas pela via i.v. em ratos infectados com *P. berghei*. Neste estudo foram utilizados apenas ratos infectados com o objetivo de elucidar a influência da infecção malárica sobre os parâmetros farmacocinéticos da QN livre e em NC com a superfície modificada, realizada através da indução experimental da doença em ratos Wistar, pois em roedores o *P. berghei* provoca o desenvolvimento de patologia semelhante à obtida pelo *P. falciparum* em humanos, sendo geralmente utilizado como modelo experimental de malária *in vivo* (CARTER E DIGGS, 1977; PEDRONI et al., 2005). Com base no estudo de Haas e colaboradores (2009), optou-se pela realização dos experimentos com animais apresentando baixa parasitemia.

A farmacocinética não-compartimental baseia-se na aplicação de critérios estatísticos para a análise dos níveis plasmáticos, a fim de obter parâmetros representativos sem considerar o conceito de distribuição por “compartimentos”. As curvas de níveis plasmáticos são consideradas como uma lei de probabilidade estatística, em que a variável aleatória é o tempo em que o fármaco permanece no organismo (BERROZPE et al., 1997). A partir dos perfis plasmáticos individuais, foram calculados por abordagem não-compartimental os parâmetros farmacocinéticos apresentados na Tabela 9.

Após a administração i.v. de sistemas nanoparticulados, estes passam pelo processo de opsonização, que permite que estes sistemas estranhos ao organismo sejam reconhecidos pelas células do SFM e sejam removidos da corrente circulatória em direção ao baço e ao fígado (OWENS e PEPPAS, 2006; WENGER et al., 2011). Por outro lado, modificações na arquitetura das nanopartículas possibilitam alterações nesse comportamento. Nanopartículas revestidas com Polisorbato diminuem o reconhecimento das células do SFM em virtude do aumento da hidrofília da superfície, assim aumentando o tempo de circulação dos carreadores no organismo após sua administração e por consequência aumentando as concentrações teciduais de fármacos (KAUR et al., 2008; ZANOTTO-FILHO et al., 2013), o que pode ter contribuído para o aumento significativo no $t_{1/2}$ da NC1-QN. Sistemas catiônicos, têm demonstrado aumentar as concentrações de fármacos em tecidos, como em gliomas (JOSHI et al., 2014), ossos (WANG et al., 2014) e cérebro (BYEON et al., 2016), por exemplo.

Esses resultados condizem com os encontrados por Wang e colaboradores (2015). Os autores avaliaram a farmacocinética de nanopartículas de ouro contendo sílica (AuNR@SiO_2), e revestidas por PEG ($\text{AuNR@SiO}_2\text{-PEG}$), além de nanopartículas com albumina de soro bovino ($\text{AuNR@SiO}_2\text{-BSA}$). As nanopartículas foram administradas por via i.v. em camundongos machos. Os resultados também mostraram um aumento significativo no $t_{1/2}$ das nanopartículas revestidas com PEG em relação às demais, o que segundo os autores ocorreu devido à capacidade de redução da absorção fagocitária das partículas, pelo revestimento com o polímero hidrofílico, aumentando significativamente o tempo de circulação sanguínea.

Mosqueira e colaboradores (2004, 2006), desenvolveram formulações de NC contendo halofantrina e avaliaram a farmacocinética em camundongos infectados pelo *P. berghei*. Neste trabalho foram utilizadas NC furtivas de poli (ácido lático), com superfície modificada por PEG, com a finalidade de reduzir a captura pelo SFM e proporcionar aumento no tempo na circulação sanguínea. As NC demonstraram a capacidade de modificar o perfil farmacocinético da halofantrina no plasma, mantendo as concentrações plasmáticas do fármaco por mais de 70 h, indicando aumento no tempo de circulação das NC furtivas.

A farmacocinética de nanocápsulas de PLA revestidas com PEG 2000 de Gemcitabina administradas em camundongos pela via i.v. para o tratamento de câncer foi avaliada por Paolino e colaboradores (2013). Os resultados também mostraram um aumento no $t_{1/2}$ em torno de 5 vezes para o fármaco incorporado nas NC em relação ao

fármaco livre, permitindo a permanência do fármaco no sangue por mais de 24 horas. Os parâmetros farmacocinéticos como o aumento no V_{dss} e $AUC_{0-\infty}$, e redução no Cl_{tot} confirmaram este resultado.

Haas e colaboradores (2009) observaram uma diminuição não significativa do $t_{1/2}$ da QN nas NC ($1,0 \pm 0,5$ versus $0,5 \pm 0,05$ horas, para o fármaco livre e nanoencapsulado, respectivamente), e nenhum dos parâmetros farmacocinéticos da QN determinados no plasma foram significativamente alterados pela nanoencapsulação. Essa diferença pode ser atribuída ao aumento do tempo de investigação do decaimento das concentrações na QN no plasma.

5.6 Avaliação da eficácia das nanocápsulas contendo quinina

As NC contendo QN e suas respectivas NC brancas, além dos grupos controle de QN livre, cloroquina e salina foram administrados pela via i.p. em camundongos fêmeas infectadas com 10^8 hemácias parasitadas com *P. berghei*. O tratamento teve início no dia 0 (dia da infecção) e teve duração de quatro dias ($D_0 + D_1 + D_2 + D_3$) seguindo o protocolo de supressão de Peter's (PETER'S, 1975). Os animais que receberam o tratamento de QN livre e salina tiveram um tempo de sobrevivência sem diferença significativa, ao contrário dos animais tratados com as NC contendo QN que tiveram um aumento significativo em relação à salina. Os grupos tratados com as NC brancas apresentaram um baixo tempo de sobrevivência em relação às NC com QN.

A eficácia antimalárica também foi avaliada por outros autores, a partir da incorporação de outros fármacos em diferentes sistemas nanoparticulados.

Haas e colaboradores (2009) também avaliaram a eficácia de NC contendo QN revestidas com e preparadas com PCL, administradas pela via i.v. em ratos Wistar. O sistema testado foi capaz de diminuir a dose efetiva necessária para curar 100% dos ratos infectados experimentalmente com *P. berghei* em cerca de 30%, de 105 mg/kg/dia de QN livre para 75 mg/kg/dia de fármaco nanoencapsulado.

Omwoyo e colaboradores (2014) desenvolveram e avaliaram a eficácia antimalárica de nanopartículas lipídicas sólidas contendo primaquina (NLS-PQ) em camundongos infectados pelo *P. berghei*, seguindo o teste de supressão de Peter's (1975). Os camundongos foram tratados com as NLS-PQ na dose de 2 mg/kg/dia e os autores observaram uma supressão da parasitemia de 93,5% pelas NLS-PQ. Em comparação, foi observada apenas 71,9% de porcentagem de supressão quando os

camundongos foram tratados com a PQ livre na mesma dose, indicando que as NLS-PQ aumentaram a sua eficácia em 20%. O tempo de sobrevivência médio dos camundongos tratados com NLS-PQ foi igualmente superior quando comparado com o grupo que recebeu a PQ livre.

Parashar e colaboradores (2014) avaliaram a eficácia dos antimaláricos Artemeter e Lumenfantrina incorporados em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) a partir da administração pela via i.p. em camundongos infectados pelo *P. berghei*. Foram avaliados os CLNs a partir da associação dos antimaláricos na mesma suspensão e os CLNs contendo a lumefantrina e artemeter em sistemas separados. Os camundongos tratados com CLNs sem fármaco e o grupo controle (sem tratamento) apresentaram aumento contínuo da parasitemia e morreram entre 7 e 10 dias após a infecção. Embora tenha sido observada uma diminuição da parasitemia nos CLNs com os antimaláricos sozinhos, foi a associação dos dois nos CLNs que demonstrou uma redução de 90% da parasitemia e sobrevida 50% dos animais além dos 28 dias.

Os resultados encontrados neste trabalho condizem com resultados anteriores, onde a eficácia de antimaláricos incorporados em sistemas nanoparticulados aumenta significativamente em relação ao fármaco livre. Apesar de não existirem outros estudos de eficácia antimalárica com nanopartículas utilizando o mesmo polímero (Eudragit[®] RS100) para comprovar essa hipótese, um estudo com nanopartículas catiônicas de curcumina revestidas por quitosana foi realizado por Akhtar e colaboradores (2012). Os autores avaliaram a eficácia antimalárica das nanopartículas preparadas por gelatinização iônica associando quitosana e curcumina em camundongos infectados pelo *Plasmodium yoelii*. O estudo comprovou que as nanopartículas catiônicas que apresentaram potencial zeta de 78 mV suprimiram o aumento da porcentagem de parasitemia levando a uma redução gradual até a cura definitiva, enquanto que nos grupos controle (grupo sem tratamento, nanopartículas de quitosana brancas e curcumina livre) a parasitemia aumentou com o tempo acarretando na morte de todos os camundongos.

Estudos vêm utilizando o polímero Eudragit[®], com a finalidade de melhorar a bioadesividade das nanopartículas pela membrana das células. Durán-Lobato e colaboradores (2014) avaliaram as propriedades mucoadesivas de nanopartículas contendo um canabinóide sintético (CB13), de superfície modificada utilizando Quitosana, Eudragit[®], lecitina e vitamina E, e as formulações cationicas apresentaram resultados satisfatórios. Outros autores também observaram aumento da bioadesividade

a partir de nanopartículas catiônicas com Eudragit[®] RS, na mucosa vaginal (Frank et al., 2014) e no trato gastrointestinal, por exemplo (DAMGÉ et al., 2007; CATTANI et al., 2010).

6 CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos diferentes sistemas nanoparticulados contendo QN através do método de nanoprecipitação com diferentes características de superfície, como nanopartículas catiônicas, revestidas pelo polímero hidrofílico PEG ou unicamente pelo tensoativo Tween.

Foi possível desenvolver e validar um método analítico em CLAE – DAD, para quantificação da QN em sistemas nanoparticulados. O método mostrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto.

A nanoencapsulação da QN protegeu o fármaco contra a sua degradação por exposição à luz UV-A. Estes resultados indicam que esses sistemas podem ser alternativas para promover uma proteção aos fármacos que são sensíveis à degradação pela luz.

As NC aumentaram o $t_{1/2}$ em relação à QN livre. Esses resultados demonstram um aumento na permanência da QN na circulação sanguínea, possibilitando maior interação do fármaco com os eritrócitos infectados.

Referências Bibliográficas

ACHAN, J.; TALISUNA, A. O.; ERHART, A.; YEKA, A.; et al.: Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v. 10, p. 144, 2011.

ADITYA, N. P.; VATHSALA, P. G.; VIEIRA, V.; MURTHY, R. S.; SOUTO, E. B. Advances in nanomedicines for malaria treatment. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 201-202, p. 1-17, 2013.

ALMEIDA, J. S.; LIMA, F.; ROS, S.; BULHÕES, L. O. S.; CARVALHO, L. M.; BECK, R. C. R. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. **Nanoescale Research Letters**, v. 5, p. 1603 – 1610, 2010.

AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P. GREF, R.; RENOIR, J.M. In vitro and in vivo biologic evaluation of long-circulating biodegradable drug carriers loaded with the pure antiestrogen RU 58668. **International Journal of Cancer**, v. 106, p. 446 - 54, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

ARIAS, A. E.; CORREDOR, A. Low response of Colombian strains of *Plasmodium vivax* to classical antimalarial therapy. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 40, p. 21-23, 1989.

BARRAT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, p. 163 - 171, 2000.

BENVEGNÚ, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; BOUFLEUR, N.; PASE, C. S.; RECKZIEGEL, P.; FLORES, F. C.; OURIQUE, A. F.; DALLA NORA, M.; DA SILVA, C. B.; BECK, R. C. R.; et al. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules decrease its adverse motor side effects and oxidative stress markers in rats. **Neurochemistry International**, v. 61, p. 623 – 631, 2012.

BERNARDI, A.; FROZZA, R. L.; MENEGHETTI, A.; HOPPE, J. B.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. G. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by A β 1-42 in Alzheimer's disease models. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4927 – 4942, 2012.

BERROZPE, J.D. Biofarmacia y Farmacocinética. **In Farmacocinética**; BERROZPE, J.D., LANAO, J.M., DELFINA, J.M.P., Eds.; Síntesis: Madrid, Spain, 1997; Volume I.

BYEON, H. J.; THAO, L. Q.; LEE, S.; MIN, S. Y.; LEE, E. S.; SHIN, B. S.; CHOI, H.; YOUN, Y. S. Doxorubicin-loaded nanoparticles consisted of cationic- and mannose-modified-albumins for dual-targeting in brain tumors. **Journal of Controlled Release**, 2016.

BIAN, X.; LIANG, S.; JOHN, J.; HSIAO, C.; WEI, W.; LIANG, D.; XIE, H. Development of PLGA-based itraconazole injectable nanospheres for sustained release. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4521–4531, 2013.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. *Plasmodium*–Malária. In: NEVES. David Pereira. **Parasitologia Humana**, p.143-182, 2005.

BRITISH PHARMACOPEIA, London: **The Stationery Office**, 1999.

BRUCE-CHWATT, L. J. Essential malariology. **William Heinemann Medical Books**, p. 452, 1985.

BRUM, L. J.; LEAL, M. G.; UCHOA, F. T.; KAISER, M.; GUTERRES, S. S.; DALLA COSTA, T. Determination of Quinine and Doxycycline in Rat Plasma by LC–MS–MS: Application to a Pharmacokinetic Study. **Chromatographia**, v. 73, p. 1081 –1088, 2011.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação Parenteral de Fármacos. **Química Nova**, v. 35, nº. 9, p. 1827 - 1840, 2012.

CABAN, S. A. E.; SAHIN, A.; CAPAN, Y. Nanosystems for drug delivery. **Drug Delivery**, v. 2(1), p. 2 – 7, 2014.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, .p. 530, 1996.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J.; Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid and Polymer Science**, v. 275, p. 46 – 53, 1997.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. Drug Stability Principles and Practices. **Drug Stability**, p. 773, 2000.

CARTER, R.; DIGGS, C. L. Plasmodia of rodents. In: KREIER, J. P. (Ed.) **Parasitic Protozoa**, v. 3, p. 359-465, 1977.

CATTANI, V. B.; FIEL, L. A.; JÄGER, A.; JÄGER, E.; COLOMÉ, L. M.; UCHOA, F.; STEFANI, V.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 116-124, 2010.

CHAUDARI, K. R.; UKAWALA, M.; MANJAPPA, A. S.; KUMAR, A.; MUNDALA, P. K.; MISHRA, A. K.; et al. Oponization, Biodistribution, Cellular Uptake and Apoptosis Study of PEGylated PBCA Nanoparticle as Potential Drug Delivery Carrier. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 53 – 68, 2012.

CONTRI, V. R.; RIBEIRO, K. L. F; FIEL, L. A.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, v.8, p. 913 - 924, 2012.

CONTRI, R. V.; KATZER, T.; OURIQUE, A. F.; DA SILVA, A. L. M.; BECK, R. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Combined effect of polymeric nanocapsules

and chitosan hydrogel on the increase of capsaicinoids adhesion to the skin surface. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, p. 820 – 830, 2014.

DAMGE, C.; MAINCENT, P.; UBRICH, N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. **Journal of Controlled Release**, v. 117, p. 163 – 170, 2007.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, n^o. 7, p. 1971 - 1974, 2009.

DE SANTANA FILHO, F. S., ARCANJO, A. R., CHEHUAN, Y. M., et al., Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 13, p. 1125-1126, 2007.

DERENDORF, H. GARRET, E. Pharmako-kinetik einfuhrung in die Theorie und Relevanz fur die Arzneimittel therapie. **Stuttgart: Wiss. Verl-Ges.**, 1987.

DETONI, C.B.; SOUTO, G.D.; SILVA, A.L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Photostability and skin penetration off different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 913 - 921, 2012.

DIMER, F. A.; ORTIZ, M.; PASE, C. S.; ROVERSI, K.; FRIEDRICH, R. B.; POHLMANN, A. R.; BURGER, M. E.; GUTERRES, S. S. Nanoencapsulation of olanzapine increases its efficacy in antipsychotic treatment and reduces adverse effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, p. 1137–1145, 2014.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, p. 1966-1972, 2008.

DORATI, R.; GENTA, I.; COLONNA, C.; MODENA, T.; PAVANETTO, F.; PERUGINI, P.; CONTI, B. Investigation of the degradation behaviour of poly(ethylene glycol-co-D-L-lactide) copolymer). **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, p. 1660-1668, 2007.

DOKTOROVOVA, S.; SHEGOKAR, R.; MARTINS-LOPES, P.; SILVA, A. M.; MÜLLER, R. H.; SOUTO, E. B. Modified Rose Bengal assay for surface hydrophobicity evaluation of cationic solid lipid nanoparticles (cSLN). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 606–612, 2012.

DURÁN-LOBATO, M.; MUÑOZ-RUBIO, I.; HOLGADO, M. A.; ÁLVAREZ-FUENTES, J.; et al. Enhanced Cellular Uptake and Biodistribution of a Synthetic Cannabinoid Loaded in Surface-Modified Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, p. 1068–1079, 2014.

FDA – Food and Drug Administration. Validation of Chromatographic Methods. **Reviewer Guidance**, 1994.

FENG, S. S.; MU, L.; CHEN, B. H.; PACK, D. Polymeric nanospheres fabricated with natural emulsifiers for clinical administration of anticancer drug paclitaxel (Taxol®). **Materials Science and Engineering: C Journal**, v. 20, p. 85-92, 2002.

FESSI H, DEVISSAGUET J-Ph, PUISIEUX F. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

FITCH, C. D. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. **Life Sciences**, v. 74, p. 1957–1972, 2004.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R.; Nanoencapsulation as a Way to control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 254-263, 2009.

FRANÇA, T. C. C., SANTOS, M. G., FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n.º. 5, 2008.

FRANK, L. A.; SANDRI, G.; D'AUTILIA, F.; CONTRI, R.V.; BONFERONI, M. C.; CAMELLA, C., FRANK, A. G.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 3151 – 3161, 2014.

FRANK, L. A.; CONTRI, R.V.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, p. 623 – 639, 2015.

FRESTA, M. et al. Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. **Biomaterials**, v. 17, p. 751-758, 1996.

FULLERTON, D. S. Antimalarial. In: DELGADO, J. N.; REMES, W. A. (Ed.). **Wilson and Givold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, 10^a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998.

GARAVELLI, P. L.; CORTI, E. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: the first case in Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p. 128, 1992.

GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v.23, n^o.3, 2011.

GRAF, R.; DOMBB, A.; QUELLED, P.; BLUNK, T.; MILLERD, R. H. ; VERBAVATZ, J. M.; LANGERF, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews** n. 16, p. 215 - 233, 1995.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRA, G.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEUX, F. Poly(D, L-Lactide) nanocapsules containig diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57-63, 1995.

GUTERRES, S. S. et al. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147–157, 2007.

HAAS, S. E., BETTONI, C. C., DE OLIVEIRA, L. K., GUTERRES, S. S., DALLA COSTA, T. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* *in vivo*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 156-161, 2009.

HAFNER, A., LOVRIC, J., VOINOVICH, D., GRCIC, J. F., Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterization and permeability through Caco-2 cell monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 205-213, 2009.

HEBEISH, A.; EL-RAFIE, M. H.; EL-SHEIKH, M. A.; EL-NAGGAR, M. E. Ultra-fine characteristics of starch nanoparticles prepared using native starch with and without surfactant. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers**, v. 24, p. 515–524, 2014.

HU, Y.; XIE, J.; TONG, Y. W.; WANG, C. H. Effect of peg conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the hepg2 cells. **Journal of Controlled Release**, n. 118, p. 7-17, 2007.

ICH - International Conference on Harmonization. Harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedure: methodology Q2B, **ICH Steering Committee**, Step 4, 1996.

ICH – International Conference on Harmonization. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). **ICH Steering Committee**, Switzerland, 2003.

ICH – International Conference on Harmonization. Validation of analytical methods: text and methodology Q2(R1). **ICH Steering Committee**, Switzerland, 2005.

JABIR NR, TABREZ S, ASHRAF GM, SHAKIL S, DAMANHOURI GA, KAMAL MA. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4391–408, 2012.

JÄGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; et al. Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5, p. 130–140, 2009.

JANSOOK, P., KURKOV, S.V., LOFTSSON, T., MESSNER, M. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, 387, p. 199-208, 2009.

JIMÉNEZ, M.M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M.F.; MARTIN, M.C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxynamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 45 – 55, 2004.

JOSHI, S.; SINGH-MOON, R.; WANG, M.; CHAUDHURI, D. B.; ELLIS, J. A.; BRUCE, J. N.; BIGIO, I. J.; STRAUBINGER, R. M. Cationic surface charge enhances early regional deposition of liposomes after intracarotid injection. **Journal of Neuro-oncology**, v. 120(3), p. 489 – 497, 2014.

KAUR, I. P.; BHANDARI, R.; BHANDARI S.; KAKKAR, V. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 127, p. 97-109, 2008.

KARLSSON, K. K.; et al. Audiometry as a possible indicator of quinine plasma concentration during treatment of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84(6), p. 765-767, 1990.

KNOWLES R & DAS GUPTA BM. A study of monkey-malaria and its experimental transmission to man. **Ind Med Gas**, v. 67, p. 301-320, 1932.

KREUTER, J., PETROV, V.E, KHARKEVICH, D. A, ALYAUTDIN, R. N. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood–brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 49, p. 81–87, 1997.

KREUTER J. Nanoparticles - a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331(1), p. 1–10, 2007.

LAWRENCE, M. J.; Microemulsions as drug delivery vehicles. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.1, p. 826, 1996.

LEITE, E.G. Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2005.

LEROY, E. M.; ROUQUET, P.; FORMENTY, P.; SOUQUIERE, S.; KILBOURNE, A.; et al. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. **Science**, 303: 387–390, 2004.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres nanocapsules and polymersomes. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65(3), p. 259–69, 2007.

LI, H., ZHANG, A. Q., SUI, L., QIAN, D.; CHEN, M. Hyaluronan/tween 80- assisted synthesis of silver nanoparticles for biological application. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, p. 111–124, 2015.

LIN, D.; ZHONG, L.; YAO, S. Zeta potential as a diagnostic tool to evaluate the biomass electrostatic adhesion during ion-exchange expanded bed application. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, p. 185–191, 2006.

LOBATO, K. B. S.; PAESE, K.; FORGEARINI, J. C.; GUTERRES, S. S.; JABLONSKI, A.; RIOS, A. O. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3906–3912, 2013.

LOPES, E.; POHLMANN, A. R.; BASSANI, V. L. ; GUTERRES, S. S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: Preparation and physico-chemical characterization. **Die Pharmazie**, v. 55, n.7, p. 527-530, 2000.

LÓPEZ DEL PRADO, G. R. et al. Malaria in developing countries. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8(1), p. 001-004, 2014.

LOSA, C.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; ORALLO, F.; VILA JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Design of New Formulations for Topical Ocular Administration: Polymeric Nanocapsules Containing Metipranolol. **Pharmaceutical Research**, v.10, p. 80, 1993.

MAZZARINO, L.; DORA, C. L.; BELLETTINI, I. C.; MINATTI, E.; CARDOSO, S. G.; LEMOS-SENNA, E. Curcumin-loaded polymeric and lipid nanocapsules: preparation, characterization and chemical stability evaluation. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, p. 933 – 940, 2010.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, p. 673–679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, Brasil, v. 44. Nº 1 – 2013.

MOORE, S. A., SURGEY, E. G., CADWGAN, A. M.; Malaria vaccines: where are we and where are we going? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 737-743, 2002.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385(1– 2), p. 113–42, 2010.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 614 - 26, 2000.

MOSQUEIRA V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; et al. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, p. 2967–79, 2001.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; LEGRAND, P.; DEVISSAGUET, J.; BARRATT, G. Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in *Plasmodium berghei*-infected mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.1222-1228, 2004.

MOSQUEIRA, V.C.F., LEITE, E.A., BARROS, C.M., VILELA, J.M.C., ANDRADE, M.S. Polymeric nanostructures for drug delivery: characterization by atomic force microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v. 11, p. 36–39, 2005.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; BARRATT, G. Surface-modified and conventional nanocapsules as novel formulation for parenteral delivery of halofantrine. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9-10, p. 3193 - 3202, 2006.

NA-BANGCHANG, K.; KARBWANG, J. Current status of malaria chemotherapy and the role of pharmacology in antimalarial drug research and development. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 23, p. 387–409, 2009.

NAGAVARMA, B. V. Y. H., AYADAZ, A., VASUDHA, L. S., SHIVAKUMAR, H. G. Different Techniques for Preparation of Polymeric Nanoparticles - A Review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, p. 23, 2012.

NEVES, B. R. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. **Cerâmica**, v.44, n. 290, 1998.

NGUYEN, M. H.; HWANG, I. C.; PARK, H. J; Enhanced photoprotection for photolabile compounds using double-layer coated corn oil-nanoemulsions with chitosan and lignosulfonate. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 125, p. 194 – 201, 2013.

NICOLINI, P. K. Estudos de Modelagem Molecular para o Planejamento Racional de Fármacos Derivados da Artemisinina e de Chalconas. Dissertação. **FURB - Universidade Regional de Blumenau**, 2005.

NUDELMAN, N.S. Estabilidad de medicamentos. 1ª edição. Buenos Aires: **El Ateneo**, 1975.

OLLOMO, B.; DURAND, P.; PRUGNOLLE, F.; DOUZERY, E.; et al. A New Malaria Agent in African Hominids. **PLoS Pathogens**, v. 5(5): e1000446, 2009.

OMWOYO, W. N.; OGUTU, B.; OLOO, F.; SWAI, H.; et al. Preparation, characterization, and optimization of primaquine-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 3865–3874, 2014.

OTTO, D. T.; RAYNER, J. C.; BÖHME, U.; PAIN, A.; et al. Genome sequencing of chimpanzee malaria parasites reveals possible pathways of adaptation to human hosts. **Nature Communications**, v.5, p. 4754, 2014.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R. C. R. Tretinoinloaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 352, p.14, 2008.

OURIQUE, A. F.; AZOUBEL, S.; FERREIRA, C. V.; SILVA, C. B.; MARCHIORI, M. C. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R. C. R. Lipid-Core Nanocapsules as a Nanomedicine for Parenteral Administration of Tretinoin: Development and In Vitro Antitumor Activity on Human Myeloid Leukaemia Cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, p. 214 – 223, 2010.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 93–102, 2006.

PAESE, K.; JÄGER, A.; POLETTO, F. S.; PINTO, E. F.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid formulation containing a nanoencapsulated sunscreen: effectiveness, *in vitro* photostability and immune response. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 240–246, 2009.

PAOLINO, D.; COSCO, D.; CELANO, M.; MORETTI, S.; PUXEDDU, E.; RUSSO, D.; FRESTA, M. Gemcitabine-loaded biocompatible nanocapsules for the effective treatment of human câncer. **Nanomedicine**, v. 8, p. 193 – 201, 2013.

PARASHAR, D.; ADITYA, N. P.; MURTHY, S. R. S. Development of artemether and lumefantrine co-loaded nanostructured lipid carriers: physicochemical characterization and *in vivo* antimalarial activity. **Drug Delivery**, p. 1 – 7, 2014.

PARK, M. J.; BALAKRISHNAN, P.; YANG, S. G.; Polymeric nanocapsules with SEDDS oil-core for the controlled and enhanced oral absorption of cyclosporine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, p. 757 – 764, 2013.

PEDRONI, H. C., Desenvolvimento de modelo de malária experimental em ratos Wistar e avaliação da influência da infecção no perfil farmacocinético e na distribuição tecidual da quinina. 2005. Dissertação (Mestrado). **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

PERUGINI, P.; SIMEONI, S.; SCALIA; GENTA, I.; MODENA T.; CONTI, B.; PAVANETTO, F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the

sunscreen agente, 2 - ethylhexilpmethoxynnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 3745, 2002.

PETERS W. The chemotherapy of rodent malaria: XXII. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 69(2), p. 155 – 171, 1975.

REIS, C. P., NEUFELD, R. J., RIBEIRO, A. J., VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2(1), p. 8-21, 2006.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3ª ed, Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 2001.

RICHARDS, J. S.; BEESON, J. G. The future for blood-stage vaccines against malaria. **Immunology and Cell Biology**, v. 87, p. 377-390, 2009.

RIECKMANN K. H., DAVIS D. R., HUTTON, D. C. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? **The Lancet**, v. 2, p. 1183-1184, 1989.

RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHNEIDER, Y.; PRÉAT, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 1 - 27, 2006.

RUOZI, B.; TOSI, G.; FORNI, F.; FRESTA, M.; VANDELLI, M. A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 81-89, 2005.

SANTOS, S. S.; LORENZONI, A.; PEGORARO, N. S.; DENARDI, L. B.; ALVES, S. H.;
SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. Formulation and in vitro evaluation of coconut oilcore

cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids And surfaces B: Biointerfaces Journal**, v.116, 2014.

SANTOS, P. P.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; COSTA, T. H.; JABLONSKI, A.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. O. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 17, p. 107, 2015.

SAFARI J, ZARNEGAR Z. Advanced drug delivery systems: nanotechnology of health design: a review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 85–99, 2014.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S., MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2010.

SALAKO, L. A.; SOWUNMI, A. Disposition of quinine in plasma, red blood cells and saliva after oral and intravenous administration to healthy adult Africans. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42(2), p.171-174, 1992.

SARI, T. P., MANN, B.; KUMAR, R; SINGH, R.R.B.; et al.. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. **Food Hydrocolloids xxx**, p. 1-7, 2014.

SAVIAN, A. L.; RODRIGUES, D.; WEBER, J.; RIBEIRO, R. F.; MOTTA, M. H.; et al. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in vitro irritation potential of this drug. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 69 –76, 2015.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S.; Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, p. 99 – 106, 2002.

SCHAFFAZICK, S.R., GUTERRES S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n.º. 5, p. 726 - 737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsule Suspensions Containing Melatonin: Preparation, Characterization and Stability Evaluation. In: **The Network of Nanotechnology- Third Meeting- Research in Progress. Notebook of Summaries**, p. 122-123, 2005.

SCHAFFAZICK, S. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina. **Tese de doutorado apresentada na UFRGS**, 2006.

SHANKS, G. D. Treatment of *falciparum* malaria in the age of drug resistance. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 52, p. 277-280, 2006.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. Introduction and biopharmacokinetics. In: **Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics**. New York: Appleton & Lange Reviews/McGraw-Hill, Medical Pub. Division, 2005.

SILVA, K. E. R., et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30; n. 2, p. 129-135, 2009.

SILVEIRA, E. F. D.; CHASSOT, J. M.; TEIXEIRA, F. C.; AZAMBUJA, J. H.; DEBOM, G.; BEIRA, F. T.; DEL PINO, F. A. B.; LOURENCO, A.; HORN, A. P.; CRUZ, L.; et al. Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth *in vitro* and in preclinical model of glioblastoma multiforme. **Investigational New Drugs**, v. 31, p. 1424 – 1435, 2013.

SINGH, K. K.; VINGKAR, S. K. Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 22, n.º. 347(1-2), p. 136-43, 2008.

SMITH, A. (Ed) – **THE MERCK INDEX**. 13^a ed., New Jersey, 2001.

SOPPIMATH, K. S, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70(1–2), p. 1–20, 2001.

STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE , M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 416 – 427, 2013.

The United States Pharmacopeia, 37 th edn. **USP Convention Inc.**, Rockville, USA, 2014.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery**, v. 58, p. 1532- 1555, 2006.

TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. Jr. Fármacos usados no tratamento das protozooses: Malária. In: HARDMANN, J. G., LIMBIRD, L. E. (Ed.) Goodman & Gilman: As bases Farmacológicas da Terapêutica. 9^aed. Rio de Janeiro: **McGraw Hill**, 1996.

TRIPATHY, S.; DAS, S.; CHAKRABORTY, S. P.; et al.; Synthesis, characterization of chitosan–tripolyphosphate conjugated chloroquine nanoparticle and its in vivo anti-malarial efficacy against rodent parasite: A dose and duration dependent approach. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 292– 305, 2012.

UBRICH, N.; SCHMIDT, C.; BODMEIER, R.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P.; Oral evaluation in rabbits of cyclosporin-loaded Eudragit RS or RL nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 169, 2005.

URBÁN, P.; ESTELRICH, J.;CORTÉS, A. et al. A nanovector with complete discrimination for targeted delivery to *Plasmodium falciparum*-infected versus non-

infected red blood cells in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 151, p. 202–211, 2011.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, PAULA.; Quimioterapia da malária: Um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química 099**, 2005.

VALLE-DELGADO, J. J.; URBÁN, P; Fernandez-Busquets, X. Demonstration of specific binding of heparin to Plasmodium falciparum-infected vs. non-infected red blood cells by single-molecule force spectroscopy. **Nanoscale**, v. 5, p. 3673, 2013.

VAN HEUVERSWYN, F.; LI, Y. Y.; NEEL, C.; BAILES, E.; KEELE, B. F.; et al. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. **Nature**, v. 444, p.164–164, 2006.

VENTURINI, C. G., JAGER, E., OLIVEIRA, C. P., BERNARDI, A., BATTASTINI, A. M. O., GUTERRES, S. S., & POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200 –208, 2011.

VYTHILINGAM, I.; NOORAZIAN, Y. M.; HUAT, T. C.; JIRAM, A. I.; YUSRI, Y. M.; et al. *Plasmodium knowlesi* in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia. **Parasites e Vectors**, v. 1, p. 26, 2008.

WANG, J.; FU, Y.; JIAN, S.; WANG, Y.; LIU, P.; HO, M.; WANG, C. Synthesis and characterization of cationic polymeric nanoparticles as simvastatin carriers for enhancing the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 432, p. 190 – 199, 2014.

WANG, J.; BAI, R.; YANG, R.; LIU, J.; TANG, J.; LIU, Y.; LI, J.; CHAI, Z.; CHEN, C. Size- and surface chemistry-dependent pharmacokinetics and tumor accumulation of

engineered gold nanoparticles after intravenous administration. **Metallomics**, v. 7, p. 516, 2015.

WANWIMOLRUK, S.; CHALCROFT, S.; COVILLE, P. F.; CAMPBELL, A. J.; Pharmacokinetics of quinine in young and elderly subjects. **The Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v. 85, 714-717, 1991.

WANWIMOLRUK, S.; NYIKA, S.; KEPPLER, M.; FERRY, D. G.; CLARK, C. R.; Effects of capsaicin on the pharmacokinetics of antipyrine, theophylline, and quinine in rats. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v. 45, p. 618-21, 1993.

WASHINGTON, C.; The stability of intravenous fat emulsions in total parenteral nutrition mixtures. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 66, p. 1 - 21, 1990.

WASSMER, S. C. et al. Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 42–56, 2015.

WELLS, T.N., ALONSO, P.L., GUTTERIDGE, W.E., New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 879–891, 2009.

WENGER, Y.; SCHNEIDER, R. J.; REDDY, G. R.; KOPELMAN, R.; JOLLIET, O.; PHILBERT, M. A. Tissue Distribution and Pharmacokinetics of Stable Polyacrylamide Nanoparticles Following Intravenous Injection in the Rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 15, p. 181–190, 2011.

WEBER, J.; FUNL, N. L.; MOTTA, M. H.; GUEDES, A. M.; VISINTAINER, A. P. C.; TEDESCO, S. B.; SILVA, C. B. Association of Borage Oil and Betamethasone Dipropionate in Lipid-Core Nanocapsules: Characterization, Photostability and *in vitro* Irritation Test. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, p. 1354–1362, 2016.

WHITE, N. J. The treatment of malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 335 (11), p. 800-806, 1996.

WHITE, N.J. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs *in vivo*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, p. 1413–1422, 1997.

WHITE, N.J., *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 172–173, 2008.

WILCOX, A. Manual for the microscopical diagnosis of malaria in man. U. S. **Department of Health**. Education and Welfare, Washington, D. C., 1960.

World Health Organization. Severe and complicated malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 1-90, 2000.

World Health Organization. Peter B. Bloland. **Malaria Epidemiology Branch**. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/malaria.pdf>

World Health Organization, 2013. **World Malaria Report**. Available at: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/w.

World Health Organization, 2014. **World Malaria Report**. Available at: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/

World Health Organization, 2014. **World Malaria Report**. Available at: <http://www.who.int/malaria/en/>

XIAO, Y.; WIESNER, M. R. Characterization of surface hydrophobicity of engineered nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 15, p. 146 – 151, 2012.

YAKOUB, A.; GUSTAFSSON, L. L.; ERICSSON, O.; HELLGREN, U. **Handbook of Drugs for Tropical Parasitic Infections**, 2nd Ed., 1995.

YOO, J. W.; DOSHI, N.; MITRAGOTRI, S. Adaptative micro and nanoparticles: Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery. **Advanced Drug Reviews**, v. 63, p. 1247 – 1256, 2011.

ZANOTTO-FILHO, A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; SCHRÖDER, R.; DE OLIVEIRA, C. M.; SIMÕES-PIRES, A.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; FORCELINI, C. M.; BECK, R. C. R.; MOREIRA J. C. F. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, p. 156, 2013.

ZHANG, Y.; YANG, M.; PORTNEY, N. G.; et al. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. **Biomedical Microdevices**, v. 10, p. 321 – 328, 2008.

ZHAO, Y.; WANG, Z.; ZHANG, W.; JIANG, X. Adsorbed Tween 80 is unique in its ability to improve the stability of gold nanoparticles in solutions of biomolecules. **Nanoscale**, v. 2, p. 2114–2119, 2010.

ANEXO A – Certificado de aprovação de Protocolo para uso de animais em pesquisa.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO FUNDAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA (Lei nº
11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Data: **09 de Maio de 2013**

PROTOCOLO Nº **010/2013**

Pesquisador: **SANDRA ELISA HAAS**

Campus: **URUGUAIANA**

Telefone: **(55) 3402 2494**

Título: **AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE SISTEMAS NANOPARTICULADOS CONTENDO
QUININA**

E-mail: Sandra.haas@gmail.com

Luiz E. Henkes

Professor Adjunto

Coordenador do CEUA/Unipampa