



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA – UNIPAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CO-ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS: ESTUDO DE
FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM *C. elegans***

**Kéle Velasques Pereira
2016**

KÉLLE VELASQUES PEREIRA

**CO-ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS: ESTUDO DE
FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM *C. elegans***

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.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Elisa Haas

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Daiana Silva Ávila

Uruguaiana

2016

KÉLLE VELASQUES PEREIRA

**CO-ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS: ESTUDO DE
FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM *C. elegans***

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:
Banca examinadora:

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

Prof. Dr^a. (Cristiane Denardin)
UNIPAMPA

Prof. Dr. (Rodrigo José Freddo)
UNIPAMPA

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

À Deus, suas bênçãos a mim concedidas foram sustento e me deram coragem para superar os desafios e encontrar nas adversidades um mundo novo de possibilidades.

À minha família, em especial minha mãe Maria Luiza e meu pai Ari, por não medirem esforços para me auxiliar e incentivar nesta caminhada. Às minhas irmãs Kátia e Arielly pelos cuidados, obrigado pelo carinho, paciência e por me trazerem paz nos momentos difíceis dessa jornada. Amo incondicionalmente todos vocês.

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Sandra Haas pela paciência e incentivo que tornaram possível a realização deste trabalho tão bonito. Obrigada pela confiança depositada e oportunidade de trabalhar ao seu lado, pelo aprendizado transmitido e pelo exemplo de profissionalismo.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Daiana Silva Ávila, pela colaboração e por proporcionar os meios necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Levo comigo teus ensinamentos.

À Ana Helena e Luana pela amizade, companheirismo, pela parceria na longa jornada de experimentos, colaboração e incentivo. Guardo vocês no meu coração.

Aos meus colegas do laboratório 105 pelo auxílio nos experimentos, em especial à Tamara. Aos colegas do laboratório 435 onde fui tão bem acolhida e recebida, agradeço a vocês pela colaboração.

Ao Eginio pelo seu amor, pela compreensão nos momentos difíceis e incentivo incondicional.

E por último mas não menos importante, dedico este trabalho aos meus filhos Murilo e Lorenzo que são a razão do meu viver. É por vocês e para vocês todo meu esforço e dedicação, mesmo ficando longe de casa por horas, tenho a certeza que tudo valeu a pena pois cada sorriso e abraço recebido me fortalecia para ir mais além. Amo vocês incondicionalmente.

A todos que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

CO-ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS: ESTUDO DE FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM *C. elegans*

A malária é um importante problema de saúde pública mundial e que vem provocando inúmeros casos de incidência e mortalidade. Dentre o arsenal terapêutico para o tratamento da malária destaca-se a quinina (QN). No entanto, esta apresenta algumas limitações no seu uso, como por exemplo, as altas doses requeridas durante o tratamento, bem como seus efeitos adversos. A curcumina (CR) é um composto natural que vem demonstrando diversas atividades terapêuticas, dentre estas a atividade antimalárica. Porém o seu uso por via oral também é comprometido pela baixa solubilidade em água. A encapsulação em nanocápsulas poliméricas (NCs) é uma abordagem farmacotécnica que pode superar as dificuldades do uso terapêutico destes dois compostos. Além disso, a avaliação biológica destas novas formulações em um modelo *in vivo* é relevante. Em vista disto, o presente trabalho visou desenvolver e caracterizar NCs pelo método de nanoprecipitação e caracterizá-los de acordo com o diâmetro, índice de polidispersão, pH, potencial zeta, teor, taxa de encapsulação, bem como avaliar a sua segurança em *Caenorhabditis elegans*. Todas as nanocápsulas preparadas apresentaram diâmetro médio de cerca de 200 nm para QN e 274 nm para a CR, pH e potencial zeta ligeiramente ácido e negativo. No estudo de pseudo-fases as NCs mostraram um comportamento do tipo III para a QN e tipo VI para a CR. Em relação à avaliação de toxicidade, os vermes expostos as NCs mostraram uma maior sobrevivência, enquanto que os fármacos na forma livre tiveram uma taxa de mortalidade. Além disso, observou-se que o fármaco livre diminuiu a capacidade reprodutiva dos vermes, enquanto que a NC não causou diferença significativa neste parâmetro quando comparada ao controle. Para o ensaio de longevidade os vermes expostos as NC apresentaram um aumento no tempo médio de vida em relação ao controle. Foi possível comprovar através de microscopia de fluorescência que as NCs foram absorvidas oralmente pelos

vermes. A co-encapsulação de QN e CR mostrou-se eficaz, minimizando os efeitos tóxicos causados pela exposição crônica de suas formas livres.

Palavras-chave: Malária, nanocápsulas, quinina, curcumina, *Caenorhabditis elegans*, Toxicidade.

ABSTRACT

CO-ENCAPSULATION PHARMACEUTICALS ANTIMALARIALS: FORMULATION STUDY AND TOXICITY ASSESSMENT IN *C. elegans*

Malaria is a major problem of public health worldwide and has caused numerous cases of incidence and mortality. Amongst the therapeutic arsenal for the treatment of malaria stands out quinine (QN). However, it has some limitations in its use, for example, the high doses required during treatment and its adverse effects. Curcumin (CR) is a natural compound that has demonstrated various therapeutic activities, among them the antimalarial activity, but its use orally is also compromised by its low solubility in water. Encapsulation in polymeric nanocapsules (NCs) is a pharmacological approach that can overcome the difficulties of the therapeutic use of these two compounds. In addition, the biological evaluation of these new formulations in an in vivo model is relevant. The present study aimed to develop and characterize NCs by nanoprecipitation method and to characterize according to the diameter, polydispersity index, pH, zeta potential, content, encapsulation rate and assess their safety in *Caenorhabditis elegans*. All nanocapsules prepared had an average diameter of about 200 nm to 274 nm and QN to CR, slightly acidic pH and negative zeta potential. In the pseudo-phase study the NCs showed a behavior type III to type VI and QN of CR. Regarding the assessment of toxicity, the worms exposed the NCs showed a higher survival, while the drug in free form had a mortality. In addition, it was observed that free drugs decreased reproductive capability of worms, while the CN did not cause significantly difference in this parameter compared to control. For the longevity test the worms exposed to the NC showed an increase in the average lifetime compared to control. It was possible to observe by fluorescence microscopy that the NCs were absorbed orally by worms. Co-encapsulation of QN and CR was effective, minimizing the toxic effects caused by chronic exposure of their free forms.

Keywords: Malaria, nanocapsules, quinine, curcumin, *Caenorhabditis elegans* toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	23
Figura 2. Estrutura química da QN.....	27
Figura 3. Estrutura química da CR.....	29
Figura 4. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	32
Figura 5. Ciclo de vida do <i>C. elegans</i> Fonte: WORMATLAS.....	33
Figura 6. Modelo de distribuição dos fármacos QN e CR na formulação NC-QC adaptados do modelo de OLIVEIRA et al, 2012.....	47
Figura 7. Curva dose-resposta para a curcumina e quinina após a exposição aguda dos vermes por 30 min.....	50
Figura 8. Análise da toxicidade do <i>C. elegans</i> N ₂ exposto a diferentes grupos de tratamento.....	52
Figura 9. Efeito da QN e CR sobre a reprodução do <i>C. elegans</i> . Erro! Indicador não definido. 57	
Figura 10. Curva da longevidade em <i>C. elegans</i> após os tratamentos.....	55
Figura 11. Microscopia de fluorescência em <i>C. elegans</i>	58
Figura 12. Percentual de recuperação da QN e CR no sobrenadante e nos vermes após 30 min de exposição.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição qualitativa e quantitativa das nanocápsulas (10 mL).	Erro! Indicador não definido.
Tabela 2. Caracterização físico-química das nanocápsulas.	44
Tabela 3. Resultados do ensaio de distribuição nas pseudo-fases.....	46
Tabela 4. Resultados dos parâmetros da cinética de fotodegradação.....	48
Tabela 5. Caracterização físico-química das formulações em meio M9	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

ANOVA: Análise de Variância

C. elegans - *Caenorhabditis elegans*

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CR- Curcumina

DAD - Detector de Arranjo de Fotodiodos

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPR - Desvio Padrão Relativo

E. coli - *Escherichia coli*

i.v. -Via Intravenosa

K - Constante da Velocidade de Reação

MeOH - Metanol

MSC - Critério de Seleção de Modelo

NC - Nanocápsulas

NC-Br - Nanocápsulas brancas

NC-QC - Nanocápsulas contendo quinina e curcumina

NGM - Nematode growth media

NP - Nanopartículas

NE - Nanoesferas

OMS - Organização Mundial da Saúde

QC - Solução contendo quinina e curcumina

QN - Quinina

r - Coeficiente de correlação

RBC - Red blood cells

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

TE - Taxa de Encapsulação

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 Malária.....	21
3.2 Aspectos gerais da doença e ciclo de vida do plasmódio	22
3.3 Terapia Antimalárica	24
3.3.1 Plano de combate ao paludismo	24
3.3.2 Resistência antimalárica.....	25
3.3.3 Quinina	26
3.3.4 Curcumina	28
3.4 Nanotecnologia	30
3.4.1 Nanocápsulas.....	31
3.5 <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Solventes e reagentes.....	35
4.2 Preparação dos sistemas nanoparticulados.....	35
4.3 Caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados	36
4.3.1 Determinação do diâmetro das partículas	36
4.3.2 Determinação do Potencial Zeta	36
4.3.3 Determinação do pH	36
4.3.4 Doseamento	37
4.3.5 Taxa de encapsulação	37
4.4 Fotoestabilidade	37
4.5 Cinética de degradação e determinação da ordem de reação	38
4.6 Determinação da distribuição dos compostos nas nanocápsulas	38

4.7 Cepas e manutenção	39
4.8 Sincronização do <i>C. elegans</i>	39
4.9 Preparação das soluções	40
4.10 Ensaio para a avaliação da toxicidade	40
4.10.1 Determinação da Dose Letal (LD ₅₀)	40
4.10.2 Ensaio de sobrevivência.....	40
4.10.3 Tamanho da ninhada.....	40
4.10.4 Ensaio de Longevidade	41
4.11 Avaliação da absorção e distribuição da quinina e curcumina livres e nanoencapsuladas	41
4.12 Avaliação da estabilidade das nanopartículas no meio M9	42
4.13 Análise estatística	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados	43
5.1.1 Ensaio de Distribuição.....	45
5.2 Fotoestabilidade	48
5.3. Ensaio para a avaliação da toxicidade	49
5.3.1 Determinação da Dose Letal (LD ₅₀)	49
5.3.2 Ensaio de sobrevivência.....	50
5.3.3 Ensaio de Reprotoxicidade.....	53
5.3.4 Ensaio de Longevidade	54
5.4 Avaliação da absorção e distribuição dos compostos em <i>C. elegans</i>	55
5.5 Estabilidade das formulações em meio de cultivo	58
6 CONCLUSÕES	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

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), sendo um problema de saúde pública em vários países do mundo todo. Entre as quatro espécies de parasita da malária que infectam os seres humanos, (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*), o *Plasmodium falciparum* é o mais perigoso pois provoca a malária grave que apresenta níveis inaceitáveis de morbidade e mortalidade (WHO, 2014).

Ao picar uma pessoa infectada, os plasmódios circulantes no sangue humano, na fase de gametócitos, são sugados pelo mosquito, que atua como hospedeiro principal e permite o desenvolvimento do parasito, gerando esporozoítos no chamado ciclo esporogônico. Por sua vez, os esporozoítos são transmitidos aos humanos pela saliva do mosquito no momento das picadas seguintes. O ciclo do parasito dentro do mosquito tem duração variada conforme as espécies envolvidas, com duração média de 12 a 18 dias, sendo, em geral, mais longo para *P. falciparum*. (REY, 2001; FRANÇA *et al.*, 2008; OMS, 2016).

Como estratégia para a diminuição de casos de incidência e mortalidade da malária, a Organização Mundial da Saúde, desenvolveu a Estratégia Técnica Mundial para o Paludismo 2016–2030, que inclui investimentos em todas as intervenções, como medidas preventivas, testes de diagnóstico, tratamento e vigilância das doenças, bem como aproveitamento de inovações.

O conhecimento acerca das limitações para o tratamento da malária, como por exemplo a resistência a cloroquina, traz a necessidade do desenvolvimento e produção de novos antimaláricos. 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 (SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010).

A quinina (QN), principal alcalóide da chinchona, tem sido o fármaco de escolha para o tratamento da malária, em virtude da resistência à cloroquina. A QN age principalmente como esquizonticida sangüíneo, tendo poucos efeitos nos esporozoítos ou nas formas pré-eritrocitárias dos parasitas da malária (FRANÇA *et al.*, 2008). A QN possui excelente eficácia nos tratamentos, e possui grandes propriedades antitérmicas, analgésicas e antimaláricas. Porém a elevada dose requerida na administração por via i.v. pode causar arritmia cardíaca grave e mesmo hipotensão fatal (VALE *et al.*, 2005).

Assim como a QN, vários estudos têm utilizado a curcumina, um polifenol natural abundante no rizoma da erva perene cúrcuma, *Curcuma longa Linnaeus*, (PARIZE *et al.*, 2009), para o tratamento da malária. Os efeitos citotóxico e antiparasitário da CR já foram demonstrados em culturas de células contra *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Giardia* e *Plasmodium falciparum* (LONG CUI *et al.*, 2007). Porém a instabilidade frente à luz, pH, baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade, comprometem o tratamento oral, já que sua disponibilidade torna-se muito baixa (HEGER *et al.*, 2014).

Em vista disso, torna-se necessário o desenvolvimento e uso de tecnologias que minimizem estes efeitos, como por exemplo, a nanotecnologia com a finalidade de co-encapsular em nanopartículas (NP) que sejam capazes de associar estes dois compostos (QN e CR), que são eficazes no tratamento da malária, mas que apresentam inconvenientes. (MOHANTY & SAHOO, 2010).

As nanopartículas (NP) poliméricas, como as nanocápsulas (NC), vem sendo utilizadas como carreadores de fármacos com diferentes objetivos terapêuticos, como a vetorização dos mesmos para a biofase de interesse com consequente redução de efeitos adversos (HANS & LOWMAN, 2002). O objetivo do uso de (NPs) é o de promover a proteção do fármaco contra a degradação extracelular e melhorar a seletividade em relação ao alvo, a fim de reduzir a frequência de administração e a duração do tratamento e para melhorar o perfil farmacocinético do fármaco (SAFARI *et al.*, 2014).

Para avaliar os efeitos benéficos das NP e possíveis efeitos tóxicos é necessário a utilização de um modelo experimental adequado. Vários estudos mostram o *Caenorhabditis elegans*, um nematoide de vida livre do solo, como

um modelo potencial para testes de toxicidade e ainda como método alternativo para substituir modelos animais (WANG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009). Uma das principais razões para isto é devido à grande semelhança que existe entre *C. elegans* e mamíferos, tanto a nível celular quanto molecular. Cerca de 60-80% dos genes homólogos aos humanos foram identificados no *C. elegans* (KALETTA E HENGARTER, 2006).

As vantagens da sua utilização em relação aos modelos de invertebrados incluem o curto ciclo de vida, o tamanho pequeno, a facilidade do cultivo em laboratório. Os vermes atingem a maturidade com 2,5 dias a 25° C e tem um tempo de vida curto de 20 dias a 25°C, portanto é considerado um modelo de fácil avaliação do desenvolvimento biológico e possíveis danos toxicológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo quinina (QN) e curcumina (CR) em associação e avaliar a toxicidade da formulação desenvolvida em *C. elegans*.

2.2 Objetivos específicos

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Malária

A malária é a doença parasitária mais prevalente no mundo, sendo responsável por mais de 1 milhão de mortes por ano. É o principal problema de saúde pública em mais de 100 países, colocando sob risco aproximadamente 40% da população mundial (cerca de 2,4 bilhões de pessoas). É uma doença de notificação obrigatória, sendo também conhecida como paludismo, febre terçã (benigna ou maligna), além de nomes populares como febre quartã, sezão, tremedeira ou bateadeira (OMS, 2015).

O número total de mortes por malária excede o número de mortes por AIDS, uma vez que a morbimortalidade desta doença é maior do que qualquer outra doença transmissível, exceto tuberculose. Em 2015 houve um aumento no número de infecções por malária, com 214 milhões de casos reportados no mundo todo (WHO, 2016). Embora a malária seja tipicamente associada aos países em desenvolvimento e aos trópicos, sua distribuição geográfica se estende além dessas áreas e inclui pequenos focos ocasionais na Europa e América do Norte. Distribui-se por extensas regiões tropicais e subtropicais, sobretudo nas nações em desenvolvimento e subdesenvolvidas (GOMES *et al.*, 2011).

O Brasil é o país que concentra o maior número de casos no continente americano, estimando-se a ocorrência de mais de 150.000 casos anuais. 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* (84% e 16% dos casos notificados em 2014), respectivamente. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A área endêmica da doença no Brasil compreende a região amazônica (estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), que é responsável por 99% dos casos autóctones. Em 2015, houve redução de apenas 1% no número de casos

autóctones em comparação com 2014, passando de 139.204 para 138.069 casos notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

3.2 Aspectos gerais da doença e ciclo de vida do plasmódio

Causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, a malária está presente em todos os trópicos, onde quatro espécies, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* são as responsáveis pela doença. Entre as quatro espécies de parasita da malária que infectam os seres humanos, o *Plasmodium falciparum* é o mais perigoso porque provoca a malária grave que apresenta níveis inaceitáveis de morbidade e mortalidade (WHO, 2015).

A malária é uma doença complexa, e os sintomas tardam sete dias ou mais a aparecer (geralmente entre 10 e 15 dias), após a picada do vetor e as manifestações da doença variam entre crianças e adultos, dependendo do estado imunológico do hospedeiro (MUTIS, 2005; DEL PRADO et al., 2014). Os sintomas podem variar entre nenhum, em indivíduos com parasitemia assintomática, 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).

Os parasitas da malária são transmitidos por mosquitos do gênero *Anopheles* fêmea, sendo mais importante a espécie *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são a combinação de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo (REY, 2001; FRANÇA et al., 2008). O ciclo começa quando os esporozoítos são inoculados na corrente sanguínea do humano e infectam os hepatócitos do fígado (Figura 1), onde amadurecem em merozoítos (esquizogônico exoeritrocítico) que, após a ruptura dessas células, continuam o seu ciclo nas células vermelhas do sangue (fase eritrocítica) (REY, 2001; GOMES et al., 2011).

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, parte delas diferenciam-se em formas sexuadas: os macrogametas (feminino) e microgametas (masculino) (MILLER *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2011). Os gametócitos não se dividem e são liberados para o sangue circulante e quando ingeridos pelo mosquito vetor que irá sugar o sangue do doente, irão fecundar-se dando continuidade ao ciclo sexuado do parasita (REY, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

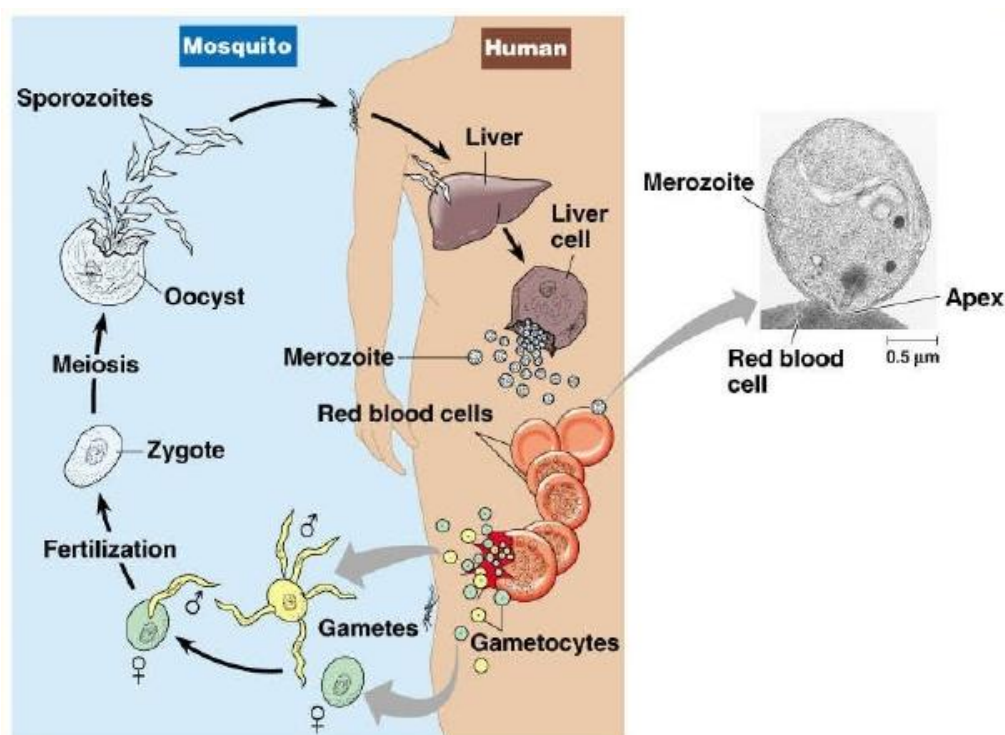


Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*.

A fase eritrocítica é responsável pelas manifestações clínicas da doença. Os sintomas típicos da malária, são os calafrios e acessos febris intermitentes, com intervalos variáveis, conforme a espécie de parasita considerada. Além disso, é comum a ocorrência de anemia, pois o número de hemácias destruídas é muito grande, levando à perda da hemoglobina e causando sérios problemas para a manutenção da fisiologia normal. Problemas hepáticos são comuns, pois parte das células do fígado também é destruída pelo parasita,

levando ao aumento de volume do órgão (SANTOS-MAGALHÃES E MOSQUEIRA, 2010).

As infecções por *P. falciparum*, na ausência de um diagnóstico precoce e tratamento adequado, podem evoluir para a forma mais séria da doença denominada malária grave. A manifestação da malária grave é dependente da idade do paciente e também de uma exposição prévia ao parasito e é caracterizada pela malária cerebral (MC) que é tipificados por febre, alterações da consciência e sinais de danos neurológico (GOOD, 2005).

3.3 Terapia Antimalárica

3.3.1 Plano de combate ao paludismo

A Organização Mundial da Saúde tem como estratégia para a diminuição de casos de incidência e mortalidade da malária (também conhecida como paludismo), a Estratégia Técnica Mundial para o Paludismo 2016–2030. O método foi elaborado com a finalidade de ajudar os países a aliviarem o sofrimento humano causado pela doença mais mortal do mundo, mostrando a necessidade de aumentar os investimentos em todas as intervenções, incluindo medidas preventivas, testes de diagnóstico, tratamento e vigilância das doenças, bem como aproveitar as inovações e expandir a investigação.

Embora a implementação de intervenções essenciais tenha se expandido muito entre 2000 e 2014, as conquistas alcançadas são frágeis e desigualmente distribuídas. O número de mortes causadas pelo paludismo, ou malária e o risco que a doença ainda representa em todo o mundo continuam a ser inaceitavelmente elevados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

As intervenções contra o paludismo embora demonstrem um dos maiores investimentos na saúde, mostram alguns desafios, como por exemplo, muitas pessoas que são infectadas pelo parasita do paludismo se mantêm assintomáticas e desta forma não são diagnosticadas tornando-se, portanto, invisíveis ao sistema de saúde. Dentre os pilares para o combate ao paludismo

é necessário salientar a importância de garantir o acesso universal à prevenção, diagnóstico e tratamento da malária, conter a resistência aos medicamentos antiparasitários, proteger a eficácia e retirar do mercado todos os medicamentos inapropriados, utilizados no tratamento da doença (WHO, 2016).

3.3.2 Resistência antimalárica

A eficácia de um fármaco antimalárico depende de sua capacidade de inibir e interromper funções vitais do parasita. Os medicamentos antipalúdicos eficazes são fundamentais para o controle da malária e a monitorização contínua da sua eficácia é necessária (WHO, 2016). 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) (BRAGA e FONTES, 2005).

A OMS definiu como resistência a fármacos, em relação à malária, “a habilidade de uma cepa parasita sobreviver e/ou se multiplicar, a despeito da administração e absorção de um fármaco administrado em doses iguais ou maiores do que as usualmente recomendadas, mas dentro dos limites de tolerância de tais substâncias” (OMS, 2015). Portanto, 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).

A partir da década de 60 houve o aparecimento de cepas de *P. falciparum* e *P. vivax* resistentes a todos fármacos antimaláricos, o que tem se tornado um problema para o controle e tratamento da doença. A resistência aos antimaláricos sintéticos desenvolvidos a partir de 1940 estende-se até os

dias de hoje em todas as regiões endêmicas. Um exemplo de resistência se deu a partir da extensiva utilização da cloroquina (WELLEMS, 2001; DE SÁ, 2011).

A grande capacidade de adaptação dos parasitas da malária evidencia-se na rapidez com que se desenvolveu, particularmente em *P. falciparum*, a resistência a praticamente todos os antimaláricos sintéticos desenvolvidos a partir de 1940. O uso inadequado dos medicamentos e/ou a administração de fármacos com baixa qualidade também contribuiu para o surgimento de resistência. A utilização de um único fármaco no tratamento ocasiona uma seleção e espalhamento de parasitas mutantes resistentes ao fármaco (FRANÇA *et al.*, 2008).

O problema da resistência aos medicamentos antimaláricos é agravado pela resistência cruzada, em que um fármaco confere resistência a outros medicamentos que pertencem a uma mesma família química ou que tenham mecanismos de ação semelhantes. Durante as últimas décadas, vários antimaláricos tiveram que ser removidos do mercado depois da propagação da resistência do parasita (WHO, 2016).

Com o impacto da resistência a cloroquina, particularmente pelo fato deste fármaco ser produzido a baixo custo e ter nível de toxicidade relativamente baixo, há a necessidade do desenvolvimento e produção de novos antimaláricos. Embora a cloroquina fosse a primeira linha de tratamento para todos os tipos de malária, a falha do tratamento devido ao desenvolvimento de resistência levou ao renascimento de outros fármacos como a quinina, uma segunda linha de escolha (HAAS *et al.*, 2009).

3.3.3 Quinina

A quinina é o principal alcalóide da cinchona, extraída da casca desta árvore que é nativa da América do Sul (DE OLIVEIRA e SZCZERBOWSKI, 2009). Apesar de ter sido sintetizada, a quinina ainda é obtido a partir de fontes naturais. Esta age principalmente como esquizonticida sangüíneo, tem poucos

efeitos nos esporozoítos ou nas formas pré-eritrocitárias dos parasitas da malária (FRANÇA *et al.*, 2008).

Quimicamente, a QN é denominada (8- α ,9R)-6'-metoxicinchon-9-ol, apresentando peso molecular de 324,42 e fórmula molecular de $C_{20}H_{24}N_2O_2$ (Figura 2) (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.

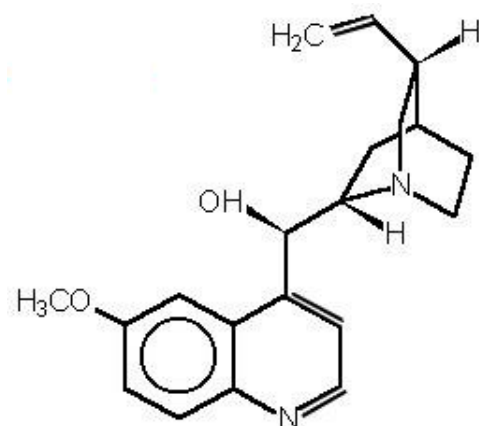


Figura 2. Estrutura química da quinina

A QN é um composto extremamente básico, apresenta-se como um pó cristalino branco e inodoro, com um intenso sabor amargo. 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 (FULLERTON, 1998; SMITH, 2001; FRANÇA *et al.*, 2008). 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).

Embora o mecanismo de ação anti-malárico da quinina ainda não esteja totalmente elucidado, algumas hipóteses são consideradas em estudos já realizados. É provável que a ação da QN, sendo uma base fraca, esteja associada à sua alta concentração nos vacúolos alimentares ácidos do *P. falciparum*. Essa interação com a membrana do vacúolo inibe algumas vias de

transporte de íons, como a de cálcio, comprometendo a degradação da hemoglobina (heme) levando à morte do parasita (FITCH, 2004).

A QN possui excelente eficácia nos tratamentos e apresenta propriedades antitérmicas, antimaláricas e analgésicas. É importante salientar que a principal via para o tratamento da malária com QN é a via oral, porém em casos de malária grave por *P. Falciparum* faz-se necessária a administração por via intravenosa (i.v.). Entretanto, a elevada dose requerida por esta via pode causar cardiotoxicidade e até mesmo hipotensão fatal (VALE *et al.*, 2005). Mesmo após o tratamento com doses terapêuticas padrões, pode-se obter concentrações tóxicas e uma sintomatologia conhecida por chinchonismo caracterizada por zumbidos, cefaléias, náuseas e distúrbios visuais, podendo agravar-se quando em terapia continuada, com anemia, trombocitopenia, efeitos gastrointestinais, cardiovasculares e dérmicos (VIEIRA, 2000). A partir de um estudo realizado anteriormente por Haas e colaboradores (2009), ficou provado que nanocápsulas contendo QN e testadas em camundongos infectados por *P. berguei*, são capazes de reduzir a dose eficaz da QN administrada pela via i.v. em quase 30%.

A QN manteve-se a base do tratamento da malária até a década de 1920, quando outros antimaláricos sintéticos mais eficazes se tornaram disponíveis. Tendo em vista as propriedades antimaláricas da QN e conseqüentemente, seus efeitos adversos, faz-se necessário a utilização de técnicas apropriadas para o desenvolvimento de novas formulações contendo QN e que sejam eficazes para o tratamento da malária.

3.3.4 Curcumina

A curcumina (CR) é um polifenol natural abundante no rizoma da erva perene cúrcuma (*Curcuma longa Linnaeus*) também conhecida como açafrão da Índia. É uma planta herbácea da família do gengibre, e considerada o composto ativo do açafrão (PARIZE *et al.*, 2009). Na sua composição estão presentes, entre outros, os chamados pigmentos curcuminóides e óleos

essenciais (HEGER *et al.*, 2014). Dentre os curcuminóides que podem ser extraídos da Curcuma, encontra-se a CR (Figura 3).

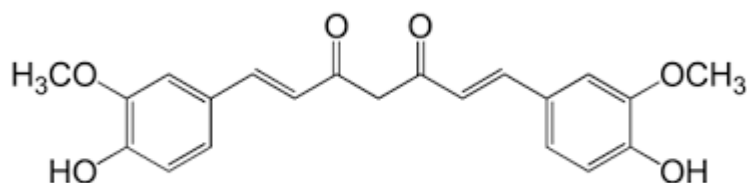


Figura 3. Estrutura química da curcumina (PARIZE *et al.*, 2009).

A CR (1,7-bis[4-hidroxi-3-metoxifenil]-1,6-heptadieno-3,5-diona) apresenta-se como um pó cristalino de coloração amarela a castanho, com baixa solubilidade em água e soluções aquosas ácidas, apresentando boa solubilidade em meio básico e solventes como etanol, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e clorofórmio (PARIZE *et al.*, 2012). A CR tem sido considerada um dos compostos naturais mais promissores para o tratamento de diversos tipos de doenças e tem sido utilizada na medicina Ayuverdica, a medicina tradicional da Índia, por mais de 6000 anos, devido as várias propriedades farmacológicas, incluindo ação anti-inflamatória, anti-carcinogênica e anti-infecciosa (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2012).

Os efeitos citotóxico e antiparasitário da CR já foram demonstrados em culturas de células contra *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Giardia* e *Plasmodium falciparum* (CUI *et al.*, 2007). GOMES e colaboradores (2014) realizaram a avaliação *in vitro* da ação antimalárica, contra *Plasmodium falciparum*, de compostos sintéticos derivados da CR, utilizando hemácias humanas. Os resultados demonstraram que os compostos sintetizados apresentaram uma redução na concentração inibitória (IC₅₀ - concentração que inibe 50% da

viabilidade dos parasitas) nos ensaios *in vitro*, o que é esperado uma vez que os compostos avaliados possuem potencial ação antimalárica.

Vários estudos têm utilizado a CR para o tratamento da malária, porém a instabilidade frente à luz, pH, baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade, comprometem o tratamento oral, já que sua disponibilidade torna-se muito baixa (HEGER *et al.*, 2014). Em vista disso, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que minimizem estes efeitos, como por exemplo, co-encapsular em nanopartículas que sejam capazes de associar dois fármacos que são eficazes no tratamento da malária, mas que tem inconvenientes que podem ser contornados pelo uso da nanotecnologia (MOHANTY-SAHOO, 2010).

O desenvolvimento de sistemas de liberação modificada, visa possibilitar o uso da CR associada a QN por via oral, aumentando a sua solubilidade e permeabilidade e conseqüentemente sua biodisponibilidade por esta via (LI *et al.*, 2013) e desta forma potencializando a atividade antimalárica.

3.4 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um novo campo que tem crescido rapidamente, a fim de proporcionar uma melhoria na utilização de fármacos já existentes e que envolve o desenvolvimento, caracterização e aplicação de dispositivos e sistemas de controle de forma e tamanho na escala nanométrica (EZHILARASI *et al.*, 2013).

Por reduzir o tamanho das partículas, a nanotecnologia pode melhorar as propriedades de compostos bioativos, como por exemplo, a solubilidade, prolongar o tempo de residência no trato gastrointestinal; aumentar a eficácia na absorção pelas células e diminuir a toxicidade (MAZZARINO *et al.*, 2010; BERNARDES *et al.*, 2014). Além disso, oferecem uma gama de possíveis soluções para problemas de liberação e ainda ajudam a superar obstáculos importantes, como barreiras intestinais e a barreira sangue-cérebro (CABAN *et al.*, 2014).

Dentre os sistemas carreadores de fármacos, os nanoparticulados, são os que apresentam diâmetro entre 10 e 1000 nm (1 μm), e podem ser definidos como partículas coloidais, ou carreadores de fármacos farmacologicamente ativos (SOPPIMATH *et al.*, 2001; NAGAVARMA *et al.*, 2012). A propriedade mais importante de um nanocarreador no contexto de malária é a capacidade deste permanecer na corrente sanguínea durante um longo período de tempo, a fim de melhorar a interação com as células vermelhas do sangue infectadas (RBC) e a membrana do parasita (ADITYA *et al.*, 2013).

As nanopartículas (NP) poliméricas têm desempenhado um papel importante para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos nos últimos anos. O objetivo do uso de (NPs) como sistemas de entrega de fármacos é o de promover a proteção do fármaco contra a degradação extracelular; melhorar a seletividade em relação ao alvo, para reduzir a frequência de administração e a duração do tratamento e para melhorar o perfil farmacocinético do fármaco (SAFARI *et al.*, 2014). Dessa forma utilizam-se doses menores e, conseqüentemente, há menos efeitos colaterais e diminuição da toxicidade.

3.4.1 Nanocápsulas

A metodologia utilizada no preparo das NP poliméricas define o tipo da formulação, podendo obter-se nanocápsulas (NC) ou nanoesferas (NE), as quais diferem uma da outra de acordo com sua composição e organização estrutural (Figura 4) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As NC são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Já as NE, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido e não apresentam óleo em sua composição (DE MELO *et al.*, 2010; STEICHEN *et al.*, 2013).

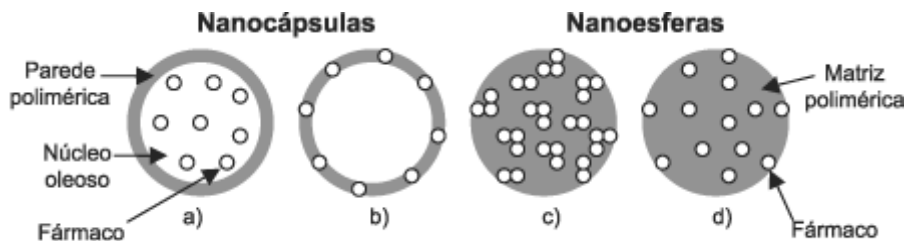


Figura 4. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. Fonte: (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Destacando a importância das NC no tratamento da malária, estudos anteriores realizados com NCs poliméricas demonstraram a sua eficácia e proteção. MICHELS (2016) desenvolveu NC poliméricas de QN revestidas com PEG, que apresentaram características físico-químicas adequadas a esse tipo de sistema. A nanoencapsulação protegeu o fármaco contra a fotodegradação, bem como demonstrou um aumento na eficácia antimalárica quando as NC foram testadas em camundongos infectados por *P. berguei*.

3.5 *Caenorhabditis elegans*

O *Caenorhabditis elegans* é um nematoide de vida livre que habita a parte líquida do solo, alimentando-se de micróbios, especialmente bactéria (RIDDLE *et al.*, 1997). Sydney Brenner (1974) estabeleceu seu uso como um modelo para estudar desenvolvimento e comportamento animal por motivos hoje bem conhecidos: o rápido ciclo de vida (figura 5) e de reprodução, a grande capacidade reprodutiva, o pequeno tamanho (até 1 mm quando adulto), a transparência, o fácil cultivo e manuseio no laboratório e grande potencial para análises gênicas (BRENNER, 1974). A alta homologia com o genoma humano (80% dos genes é homóloga ao humano) e a fácil manipulabilidade genética (KALETTA; HENGARTNER, 2006) são outras vantagens do modelo.

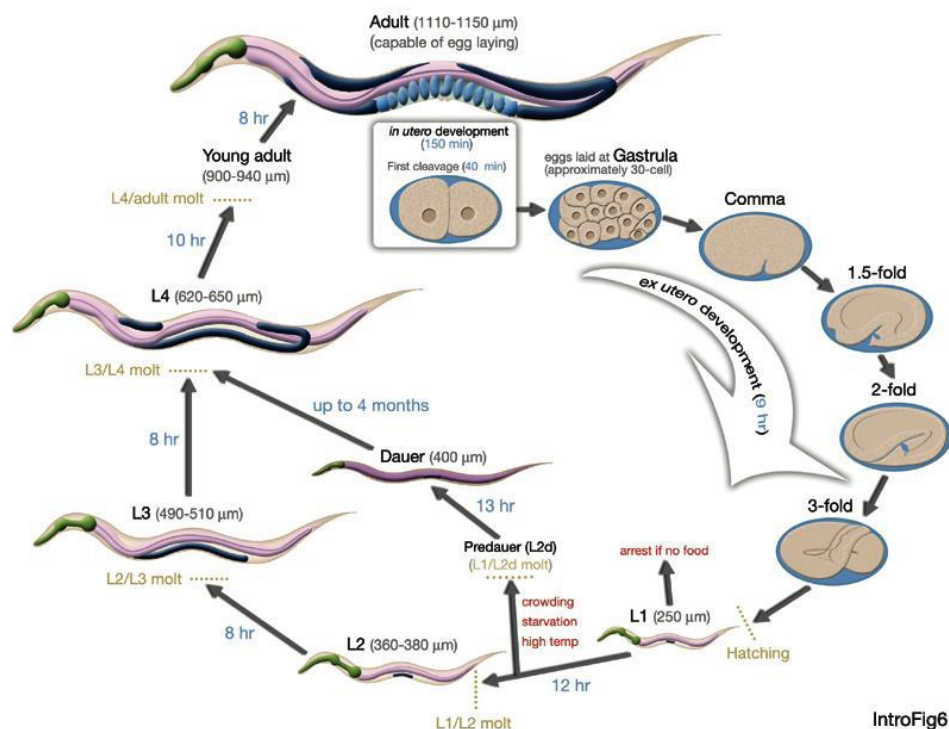


Figura 5. Ciclo de vida do *C. elegans* Fonte: Wormatlas.

O rápido aumento da nanotecnologia tem estimulado o uso de metodologias para avaliar o perfil toxicológico dos nanossistemas. Para a realização de ensaios de toxicidade é necessário o uso de modelos *in vivo* e que especialmente estejam de acordo com a política dos três Rs (para reduzir, substituir e refinar os animais utilizados para este fim). Desta forma, o *C. elegans* tem sido muito utilizado devido as suas características que possibilitam inúmeros testes farmacológicos e toxicológicos (JUNG *et al.*, 2015).

Este modelo está cada vez mais sendo utilizado em estudos aplicados à nanotecnologia, particularmente para avaliar a nanotoxicidade de nanopartículas inorgânicas e atualmente para nanopartículas orgânicas (MORAES *et al.*, 2016; CHARÃO *et al.*, 2015). De acordo com o estudo desenvolvido por CHARÃO e colaboradores (2015), foram desenvolvidas NC contendo melatonina, a fim de avaliar a redução dos efeitos tóxicos induzidos por paraquat. Os resultados encontrados neste estudo mostraram que as NC

foram eficazes na redução da toxicidade, aumentando a taxa de sobrevivência e diminuindo os efeitos adversos ao desenvolvimento dos nematoides.

O *C. elegans* tem sido utilizado como modelo alternativo em ensaios toxicológicos e farmacológicos a fim de desvendar mecanismos que seriam mais difíceis de serem investigados em organismos mais complexos. Fagundez e colaboradores (2015) avaliaram os efeitos citotóxicos do Ferro (Fe) em *C. elegans* e, embora o Fe seja um micronutriente essencial para diferentes tipos de desenvolvimento celular, foi observado que este causou severos efeitos após a sua exposição aguda, causando alterações na sobrevivência, longevidade e reprodução, bem como dano neuronal e indução ao estresse oxidativo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solventes e reagentes

4.2 Preparação dos sistemas nanoparticulados

As nanocápsulas foram preparadas conforme o método descrito por Fessi e colaboradores (1988), denominado de deposição interfacial de polímero pré-formado. A fase orgânica é composta pelo polímero, pelo fármaco na sua forma básica, por um tensoativo de baixo EHL, óleo e acetona que foram solubilizados em banho-maria e sob aquecimento moderado (37 a 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, sobre uma solução de tensoativo hidrofílico de alto EHL (Tween 80[®]) e água destilada. Após a formação imediata das nanopartículas as suspensões foram mantidas sob agitação moderada durante 10 minutos. Em uma próxima etapa, 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 o ajuste da concentração do fármaco em um volume final de 10 mL. Todas as formulações foram preparadas em triplicata e mantidas acondicionadas em frascos de vidro âmbar, protegidas da luz, na temperatura de 20 ± 5°C. As alíquotas para avaliação foram retiradas cuidadosamente, sem agitação prévia da formulação.

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 (d4.3) foi utilizado como parâmetro para avaliar a distribuição de tamanho de partícula. O diâmetro das partículas foi expresso em nanômetros. 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.

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 suspensões foi realizada logo após a preparação das mesmas, através de leituras das suspensões, sem prévia diluição, utilizando um potenciômetro, previamente calibrado com soluções tampão de pH 7,01 e 4,01. Os resultados representam a média de três determinações, por formulação.

4.3.4 Doseamento

Uma solução estoque de QN e CR foi preparada. Para preparar as soluções das amostras, as nanopartículas foram transferidos para um balão volumétrico. 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 e CR nas nanopartículas foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) utilizando um método previamente validado, utilizando como fase móvel.

4.3.5 Taxa de encapsulação

A taxa de encapsulação da QN e CR nas nanopartículas foi determinada por CLAE-DAD, pela diferença entre a concentração total de QN e CR (descrita no item 4.3.4) na formulação e na quantidade presente na fase aquosa da suspensão (QN e CR não associada). A determinação da QN e CR na fase aquosa foi realizada por ultrafiltração-centrifugação das suspensões (Vieira *et al.*, 2016). A concentração de QN e CR não-associadas foram quantificadas no ultrafiltrado, utilizando as mesmas condições descritas para a determinação da concentração total de QN e CR. 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 a suspensão, sendo o filtrado quantificado.

4.4 Fotoestabilidade

O método indicativo de estabilidade foi realizado pela exposição da QN e CR livre e das suspensões de nanopartículas à radiação UV-, para avaliar a possível proteção conferida pela nanoencapsulação. As amostras de QN e CR

livre e associadas em sistemas nanoparticulados foram adicionadas em cubetas de quartzo no interior de uma câmara de fotoestabilidade. Foram realizadas coletas de hora em hora de alíquotas de 100 μ L de cada amostra para análise por CLAE-DAD. As amostras (nanopartículas) foram analisadas em comparação com o controle 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 para obter uma concentração teórica. As amostras foram filtradas em um filtro de membrana de 0,45 μ m (Millipore®) de diâmetro e em seguida foi realizada a injeção. O experimento foi realizado em triplicata.

4.5 Cinética de degradação e determinação da ordem de reação

Na determinação da ordem de reação foram utilizados os grupos QN, CR, QC (quinina e curcumina associadas na forma livre) e NC-QC. A ordem de reação foi determinada relacionando a concentração residual dos compostos em função do tempo (ordem zero); log da concentração residual em função do tempo (primeira ordem); inverso da concentração residual em função do tempo (segunda ordem) (NUDELMAN, 1975; MORAES *et al*, 2016).

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.

4.6 Determinação da distribuição dos compostos nas nanocápsulas

A distribuição dos fármacos (QN e CR) entre as diversas pseudo-fases da suspensão de NC, foi determinada utilizando um algoritmo desenvolvido por Oliveira e colaboradores, 2012. Inicialmente as suspensões foram diluídas com

água ultrapurificada. Foram coletadas alíquotas de cada amostra diluída e transferidas para filtros Ultrafree® - Millipore® e centrifugadas. O ultrafiltrado foi coletado e injetado no CLAE-DAD. Este experimento foi realizado em triplicata. Os valores representam o percentual de fármaco detectado no ultrafiltrado.

4.7 Cepas e manutenção

As cepas utilizadas neste projeto foram obtidas através do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), University of Minnesota, EUA (<http://www.cbs.umn.edu/cgc>). Foram utilizadas as cepas tipo selvagem N₂ Bristol, mantidas em placas de Petri contendo NGM (nematode growth media) semeadas com *E. coli* OP50 como alimento e incubada a 20°C, o que permitiu o desenvolvimento normal do ciclo de vida. A manutenção das cepas foi feita transferindo animais em diferentes estágios para novas placas NGM/OP50 à medida que a camada de bactéria ficava escassa.

4.8 Sincronização do *C. elegans*

A sincronização foi feita através da lise alcalina. Este método baseia-se no tratamento de hermafroditas adultos grávidos utilizando uma mistura de água destilada, hipoclorito de sódio, NaOH (50:40:10), a fim de romper a cutícula dos vermes e liberar ovos, que foram separados por centrifugação. Os ovos resistentes a este tratamento foram coletados e colocados em meio líquido M9 (KH₂PO₄ 20mM; Na₂HPO₄ 42mM; NaCl 86mM; MgSO₄ 1mM) de um dia para o outro na ausência de alimento. Isto permite que os ovos eclodam, liberando vermes que após 14 horas serão L1. Os animais foram então utilizados para o protocolo de tratamento.

4.9 Preparação das soluções

As soluções foram preparadas utilizando cloridrato de QN e CR previamente dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfóxido), gerando soluções-mãe nas concentrações, respectivamente.

4.10 Ensaio para a avaliação da toxicidade

4.10.1 Determinação da Dose Letal (LD₅₀)

Em torno de 14 horas após a sincronização, os vermes no estágio L1 foram expostos por 30 minutos a diferentes concentrações de QN e CR livre a fim de determinar a dose letal 50%. Após o tratamento, o meio foi lavado com tampão M9 (KH₂PO₄ 20mM; Na₂HPO₄ 42mM; NaCl 86mM; MgSO₄ 1mM) a fim de finalizar o tratamento e os animais foram dispostos em placas NGM/OP50. Vinte e quatro horas depois desse procedimento, o número de animais sobreviventes foi contado e um gráfico com os valores foi construído.

4.10.2 Ensaio de sobrevivência

O tratamento foi realizado utilizando os vermes no estágio larval L1, em meio líquido de NaCl 0,05% e expostos aos diferentes grupos de tratamento. Após o tratamento crônico (sem lavagens), os vermes foram transferidos para placas NGM / OP50 para permitir a recuperação e crescimento. Para o ensaio de sobrevivência, os vermes vivos foram contados após 24 h de tratamento. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram expressos como uma porcentagem do controle expressos através da curva de sobrevivência.

4.10.3 Tamanho da ninhada

No ensaio de tamanho da ninhada, o qual avalia o potencial para a toxicidade reprodutiva das formulações, os vermes foram tratados de acordo com o protocolo de sobrevivência (item 4.10.2) e foram individualmente transferidos para novas placas NGM / OP50. Posteriormente, as larvas provenientes dos ovos postos foram contadas durante todo o período reprodutivo (em torno de 5 dias). Os experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$) e os resultados foram expressos como o número total de larvas ao final do período reprodutivo.

4.10.4 Ensaio de Longevidade

Os ensaios de longevidade foram iniciados com 20 animais por grupo, previamente tratados e com idade sincronizada no estágio larval L4. Os vermes foram transferidos para novas placas NGM a cada 2 dias para a alimentação. A sobrevivência dos vermes foi verificada diariamente até que todos os vermes morressem. Os dados foram submetidos no programa estatístico GraphPad Prisma versão 6.0 para a construção dos gráficos de longevidade e cálculo de valores de p (Log-Rank).

4.11 Avaliação da absorção e distribuição da quinina e curcumina livres e nanoencapsuladas

A absorção e distribuição dos compostos livres ou em nanoformulações foi avaliado através de microscopia de fluorescência e por quantificação por CLAE-DAD.

Para a quantificação da QN e CR nos vermes, após os diferentes tratamentos, utilizou-se o método cromatográfico previamente descrito em 4.3.4, com alterações na forma de tratamento das amostras. Os vermes inicialmente foram tratados de acordo com o protocolo de sobrevivência (item 4.10.2). Para a quantificação dos fármacos cada amostra de sobrenadante e sedimento contendo os vermes. Para cada ciclo. As amostras foram sonicadas em sonicador (Hielscher®), em três tempos de 10 segundos e posteriormente

centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rotações por minuto à 4°C. Uma alíquota do sobrenadante foi retirada e analisada por CLAE-DAD (item 4.3.4). A quantificação dos fármacos foi realizada a partir dos picos cromatográficos registrados por comparação com uma curva padrão preparada em solvente orgânico e análise de dados no Microsoft Excel 2016.

4.12 Avaliação da estabilidade das nanopartículas no meio M9

Uma alíquota da NC-BR e da NC-QC foram diluídas em meio M9 da mesma forma que está descrito no item 4.8.1. Os parâmetros tamanho de partícula, SPAN e potencial zeta foram avaliados nos tempos zero e até 30 minutos.

4.13 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo teste de post hoc de Bonferroni.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A erradicação das doenças negligenciadas continua sendo um desafio para a sociedade moderna. Além disso, muitas doenças têm demonstrado um aumento na transmissão e letalidade, especialmente em grupos especiais, como crianças e gestantes. Nesse cenário, destaca-se a malária e a preocupação da OMS com a sua disseminação e dificuldade de tratamento, transformada no “Plano 2016-2030 para Erradicação do Paludismo”. Nosso grupo de pesquisa tem se preocupado em desenvolver estratégias terapêuticas para o tratamento da malária baseadas em nanotecnologia. A formulação inovadora descrita nesse trabalho baseia-se na associação de fármacos como nova estratégia para controle da doença. Assim, surge a co-encapsulação de um fármaco antimalárico de segunda linha, a quinina com um composto de origem natural com promissora atividade antimalárica, a curcumina. Na sequência, estão descritos os resultados obtidos para a etapa de desenvolvimento e caracterização tecnológica da formulação, bem como a avaliação da toxicidade em *Ceanorhabditis elegans*.

5.1 Caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados

Nos últimos anos tem havido considerável interesse no desenvolvimento de partículas poliméricas em escala nanométrica como sistema efetivo de liberação controlada dos fármacos (HAAS *et al.*, 2014; CHARÃO *et al.*, 2015). Como exemplo temos as nanopartículas com PCL revestidas com polissorbato 80 (Tween® 80) que são capazes de diminuir a tensão superficial entre partícula e célula, promovendo um maior contato entre ambas o que permite uma melhor absorção dos fármacos e modulação da distribuição pelo corpo, melhorando a eficácia e diminuindo a toxicidade de fármacos (HAAS *et al.*, 2009; VENTURINI *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2016).

A incorporação de fármacos nas NC é dependente do seu grau de lipofilia, do pH da fase aquosa e da afinidade do mesmo pelo óleo empregado

na preparação e da capacidade do polímero em encapsular os compostos (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; 2012). Em condições apropriadas, a eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos nas NC pode alcançar até 100% se as condições de preparação e a formulação forem otimizadas. Desta forma a caracterização físico-química das suspensões de NC é de suma importância, pois avalia a estabilidade das preparações e permite determinar o perfil de distribuição das nanoestruturas, bem como sua interação com células, e possibilita garantir suas propriedades nanotecnológicas e sua estabilidade. Os parâmetros físico-químicos avaliados nas NC foram em relação ao diâmetro médio (nm), índice de polidispersão (Span), pH, potencial zeta (mV), doseamento (%) e taxa de encapsulação (%), fotoestabilidade (Tabela 2).

Tabela 1. Caracterização físico-química das nanocápsulas.

Logo após vertida a fase orgânica sobre a fase aquosa, as formulações imediatamente tornaram-se leitosas e com um aspecto semelhante a um fluido opalescente leitoso, o que é característico das NC, e conhecido como efeito de Tyndall (MAGENHEIM E BENITA, 1991; HAAS *et al.*, 2009). Todas as NC mostraram-se com características homogêneas, apresentaram diâmetro médio na faixa nanométrica como mostra a Tabela 2, com pouca variabilidade nos valores de desvio padrão e valores de polidispersão (Span) abaixo de 2,00 o que indica uma uniformidade no tamanho das NC. Essa informação é corroborada pelo fato de que os diâmetros, seja pela expressão dos resultados na forma de número ou volume, mostraram-se muito próximos entre si para cada formulação. Os diâmetros obtidos demonstram que o método de polímero pré-formado desenvolvido por FESSI e colaboradores (1988) é apropriado para a preparação de nanopartículas poliméricas. O diâmetro médio da partícula é um importante parâmetro a ser considerado na otimização de uma formulação, pois, influencia as características biofarmacêuticas e o perfil de liberação do fármaco a partir da nanoestrutura (HERMANS *et al.*, 2012).

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas e utilizadas para estudar a modificação de superfície de nanopartículas poliméricas. Um método eficiente

para avaliar este parâmetro é a determinação do potencial zeta da superfície de nanopartículas. 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 (SHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As superfícies das NC obtidas neste estudo se apresentaram carregadas negativamente, como esperado para este tipo de sistema (CHARÃO *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2016). O potencial zeta variou de $-28,9 \pm 1,0$ a $-34,1 \pm 1,4$ mV para a NC-Br e NC-QC, respectivamente, mostrando que houve uma diferença significativa para a NC sem o fármaco e a NC contendo QN e CR. Este potencial zeta negativo também pode ter sido influenciado pelas cargas dos grupamentos éster do polímero PCL, que confere carga negativa (SANTOS *et al.*, 2015). Vieira e colaboradores (2016) desenvolveram NC contendo clozapina e obtiveram valores de potencial zeta negativo para estas partículas, porém, quando a NC foi revestida com quitosana os valores de potencial zeta aumentaram de forma significativa tornando a partícula carregada positivamente.

As formulações apresentaram valores de pH igual a 6 e 7 para NC-Br e NC-QC respectivamente, demonstrando que o pH é influenciado pela adição das moléculas, o que pode ser atribuído ao caráter básico, em especial da QN que contém um grupo quinolínico (Figura 2). A recuperação das moléculas foi próxima a 100% para todas as moléculas (Tabela 2), sugerindo que não há perda ou degradação dos compostos durante o processo de preparo. No caso da taxa de encapsulação, os valores foram superiores a 90% para as duas moléculas encapsuladas, Valores altos já eram esperados tendo em vista a lipofilia da CR (Log P $\sim 3,0$) e da QN (Log P = 3,44) (PRIYADARSINI 2009; SMITH 2001) e conseqüentemente ínfima solubilidade aquosa.

5.1.1 Ensaio de Distribuição

Para determinar a distribuição dos compostos nas pseudo-fases das NC (núcleo oleoso, interface e pseudo-fase externa) utilizou-se o algoritmo descrito por Oliveira e colaboradores (2012). O algoritmo é composto por seis perguntas e baseia-se na utilização de diluições em série da suspensão de nanopartículas antes da ultrafiltração-centrifugação, a fim de deslocar o equilíbrio da distribuição dos fármacos, permitindo a quantificação da distribuição dos mesmos entre as diferentes pseudo-fases da formulação.

Conforme a Tabela 3 podemos analisar os resultados detalhados obtidos para a diluição e a concentração recuperada. Estes resultados foram utilizados para responder as perguntas do algoritmo, assim como outros estudos já têm utilizado este modelo para descrever a distribuição de fármacos, como Carreno e colaboradores (2015) que investigaram o mecanismo de distribuição da quietiapina nas pseudo-fases das nanocápsulas, assim como Yurgel e colaboradores (2014) para o metrotexato.

Tabela 2. Resultados do ensaio de distribuição nas pseudo-fases.

O algoritmo proposto por Oliveira e colaboradores (2012) aplica-se apenas a sistemas nanoparticulados, portanto, a primeira questão é referente ao tamanho das partículas na formulação que deve ser exclusivamente nanométrico. Este parâmetro é importante, pois se o tamanho estiver alterado, estudos de pré-formulação ainda são necessários, segundo sugestão dos autores. Conforme os dados da Tabela 2 as formulações desenvolvidas neste trabalho apresentaram diâmetro médio ($D_{4,3}$) na faixa nanométrica com o índice de polidispersão inferior a 2,0 ($\text{Span} < 2,0$), o que indica que são formulações exclusivamente nanométricas.

A segunda questão é: "O fármaco é detectado no ultrafiltrado sem diluição?", de acordo com o algoritmo se a resposta for sim à esta questão as formulações são separadas por distribuição do tipo I, II e III enquanto que uma resposta negativa refere-se aos tipos IV, V e VI. A CR não foi detectada no

ultrafiltrado, enquanto a QN foi, o que indica que há uma concentração deste fármaco disperso na solução aquosa. A percentagem de QN encontrada no ultrafiltrado sem diluição (19,3%) responde a terceira questão do algoritmo que é: "100% do fármaco é detectado no ultrafiltrado?", o que permite concluir que a QN não está dispersa unicamente na água. A diluição seriada das formulações promove um deslocamento no equilíbrio de distribuição dos fármacos entre as pseudo-fases, o que é necessário a fim de diferenciar os tipos de distribuição.

Para responder a quarta questão foi necessário analisar se "Após a diluição de 1:10 (v / v) foi possível detectar 100% do fármaco no ultrafiltrado? ". Os resultados da Tabela 3, mostram que a QN foi detectada na concentração de 53,3%, o que indica que a NC-QC tem uma distribuição de QN na fase contínua, dispersa na interface e dissolvida no núcleo das nanopartículas, o que mostra que a QN pertence ao.

A quinta questão é "Após diluir 1:100, os fármacos são mais do que 50% detectados no ultrafiltrado? ", esta questão é para o fármaco que não foi detectado no ultrafiltrado sem diluição, como é o caso da CR. Na diluição 1:100 foi detectado apenas 6,3 % de CR. Na sexta questão é necessário avaliar se "após diluir 1:1000, os fármacos são detectados 100% no ultrafiltrado? ". Conforme podemos analisar nos dados obtidos na Tabela 3, foi detectado apenas 3, 8% de CR, portanto ela se distribui conforme o tipo VI do algoritmo, mas tendendo a apresentar alguns agregados na fase aquosa, porém é distribuída principalmente no núcleo oleoso nas NC.

De acordo com os resultados é possível perceber que a técnica de ultrafiltração-centrifugação é a ferramenta básica para elucidar a maioria das questões. Todos os resultados encontrados estão de acordo com o que foi debatido por Oliveira e colaboradores (2012), ao propor uma relação entre o Log D e o tipo de distribuição.

Figura 6. Modelo de distribuição dos fármacos QN e CR na formulação NC-QC adaptados do modelo de OLIVEIRA et al, 2012.

5.2 Fotoestabilidade

A fim de elucidar se a nanoencapsulação pode melhorar a fotoestabilidade da QN e da CR, a formulação NC-QC foi avaliada em comparação com os compostos livres (QN ou CR) e com a mistura de ambos (QC) durante 12 horas de exposição à radiação UVA (352 nm). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

O percentual de QN livre restante em função do tempo foi melhor descrito pelo modelo biexponencial. A constante de degradação foi de $0,00037 \text{ h}^{-1}$ e o tempo de meia-vida de degradação ($t_{1/2}$) foi de aproximadamente 1754 h. Em comparação com o fármaco nanoencapsulado, observou-se uma redução significativa no percentual de fotodegradação bem como um aumento de duas vezes no $t_{1/2}$. O comportamento de degradação da QN também sofreu alteração, pois a ordem de reação passou para zero, característico da liberação sustentada de fármacos. Em relação à CR, em todos os grupos avaliados observou-se degradação biexponencial. A degradação da CR foi maior no grupo QC (quinina e curcumina associadas na forma livre), entretanto, diminuída em cerca de duas vezes após a nanoencapsulação.

De acordo com os resultados, a nanoencapsulação é capaz de proteger a QN e a CR da exposição à luz UVA em um fator de 1,4 vezes. Essa melhora pode ser atribuída à estrutura supramolecular da nanocápsula, constituída por uma parede polimérica a qual é capaz de impedir a passagem da luz. Resultados semelhantes já foram relatados para a CR (CORADINI *et al.*, 2014) e outros fármacos (OURIQUE *et al.*, 2008; DETONI *et al.*, 2012; SAVIAN *et al.*, 2015).

Tabela 3. Resultados dos parâmetros da cinética de fotodegradação.

	Ordem de reação	MSC	K (h^{-1})	$T_{1/2}$ (h)	Fotodegradação (%)
Quinina					
QN (Livre)					
QN (+CR)					

NC-QC

Curcumina

CR (Livre)

CR (+QN)

NC-QC

R: coeficiente de correlação; MSC: critério de seleção de modelo; K: constante da velocidade de reação; $T_{1/2}$ tempo de meia vida de degradação. ^adiferença significativa entre livre e em nanopartícula; ^bdiferença entre associado e nanopartícula. (Anova *on Ranks* - $p < 0,05$.)

5.3. Ensaio para a avaliação da toxicidade

5.3.1 Determinação da Dose Letal (LD₅₀)

Devido ao imediatismo da utilização de *C. elegans* como modelo para a avaliação da toxicidade *in vivo*, a primeira etapa do trabalho foi estabelecer as concentrações ideais para o tratamento. Inicialmente foram testadas as concentrações de QN e CR separadamente em meio de cultura contendo *E. coli*, a qual serve como alimento para o nematoide. Observou-se que o desenvolvimento dos animais tratados com de CR e QN, respectivamente, ocorreu normalmente. Por outro lado, o tratamento com de QN e CR apresentou certa toxicidade pois os animais não se desenvolveram e ficaram estacionados no estágio larval L1.

A Figura 7 mostra a curva dose-resposta de CR e QN em *C. elegans*. Através do programa Excel foi calculada a LD₅₀ de ambos os compostos. Para a CR a LD₅₀ foi de. Portanto, todos os experimentos de avaliação da reprotoxicidade, sobrevivência e longevidade realizados em *C. elegans* foram realizados usando as concentrações de 0,05 µg/mL para a curcumina e de 0,1 µg/mL para quinina, tanto nas formas livres quanto nanoencapsulada.

A**B**

Figura 7. Curva dose-resposta para a curcumina (A) e quinina (B) após a exposição aguda dos vermes por 30 min (n=3). A letalidade foi avaliada através da porcentagem da sobrevivência dos animais quando comparada com o grupo controle $p < 0,05$ (*) e $p < 0,0001$ (**)

5.3.2 Ensaio de sobrevivência

O *C. elegans* é um importante modelo animal empregado em várias áreas de pesquisas, incluindo estudos de toxicidade, genética e aplicações farmacêuticas. Suas propriedades como o tamanho reduzido, transparência, rápida reprodução, ciclo de vida curto (aproximadamente 21 dias) e facilidade na manutenção contribuem para seu sucesso e amplo emprego (LEUNG *et al.*, 2008). É importante ressaltar que os vermes têm diversos tipos de células semelhantes aos seres humanos, incluindo neurônios, células musculares, intestinais e células excretoras, além de compartilhar diversos genes (60% a 80% de homologia) e mecanismos celulares como dos seres humanos (FURUHASHI e SAKAMOTO, 2014; PALLAUF *et al.*, 2013). Este estudo utilizou o *C. elegans*, a fim de desvendar o potencial farmacológico na associação de dois fármacos antimaláricos e avaliar a toxicidade pela co-encapsulação dos fármacos, levando em consideração as amplas vantagens no emprego deste modelo.

A QN é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de pessoas com malária grave causada por *P. falciparum* e que não respondem à Cloroquina (OMS, 2016). A nanoencapsulação da QN em nanocápsulas poliméricas com superfície modificada por Polissorbato 80, PEG ou Eudragit RS 100 já foi capaz de melhorar a sobrevivência de ratos e camundongos infectados com *P. berghei*, um modelo animal que gera sintomas semelhantes à malária grave em humanos (HAAS *et al.*, 2009; MICHELS, 2016; SCHEUER,

2015). A CR também tem demonstrado efeito antimalárico em vários estudos. Ghosh e colaboradores desenvolveram NP de CR que demonstrou ser dez vezes mais eficaz para a inibição do crescimento de *P. falciparum*, quando comparada com a sua forma livre. Além disso a CR nanoencapsulada prolongou a sobrevivência de camundongos infectados por *P. berguei* em até dois meses e eliminou por completo o parasita em comparação com os animais não tratados que sobreviveram até oito dias.

Os efeitos destas moléculas em *C. elegans* ainda são pouco conhecidos e a literatura relata que *C. elegans* pode ser um modelo para avaliação sensorial da QN, devido ao seu gosto amargo e resposta quimiotóxica gerada no verme (KRZYZANOWSKI *et al.*, 2013). A CR tem demonstrado melhorar a disfunção neuronal induzida pela proteína *tau* em *C. elegans* transgênico do tipo R406W (Miyasaka *et al.*, 2016), reverter a infecção em *C. elegans* infectados com *Bulkholderia pseudomallei* (ENG e NATHAN, 2015), e reverter os danos causados por Arsênio nos vermes (YU e LIAO, 2014). Entretanto, até o momento, o efeito de ambos os compostos livres, associados ou co-encapsulados em nanocápsulas poliméricas sobre o sistema reprodutivo, sobrevivência e longevidade de *C. elegans* N₂ ainda não haviam sido relatados.

Os animais tratados com as moléculas na sua forma livre (CR e QN) mostraram uma diminuição na sobrevivência dos vermes (Figura 8). A taxa de sobrevivência do grupo CR mostrou-se significativamente menor quando comparado com o grupo controle, ficando em torno de de sobrevivência para um total de vermes avaliados. O tratamento crônico com o grupo QC reduziu a sobrevivência dos vermes em cerca de quando comparados com o grupo controle, indicando que há toxicidade dos fármacos livres associados. Por outro lado, o grupo NC-QC teve uma taxa de sobrevivência em torno de 95%, sem diferença significativa em relação ao controle e aumentou em aproximadamente em comparação ao grupo QC (P<0,0001) como mostra a Figura 8. Todos os grupos foram tratados com a mesma dose dos fármacos pré-estabelecida no ensaio da LD₅₀.

Estes resultados indicam que o grupo NC-QC teve um efeito de proteção melhor do que a solução dos compostos livres ou associados, e estão

de acordo com um estudo realizado por Charão e colaboradores (2015), que desenvolveram NC de núcleo lipídico contendo melatonina, a fim de avaliar a nanotoxicidade e a eficácia da melatonina nanoencapsulada como antioxidante. No estudo em questão, os vermes expostos ao tratamento agudo com Paraquat (PQ) apresentaram uma redução na sobrevivência em cerca de em comparação com o grupo controle, enquanto que a taxa de sobrevivência dos vermes pré-tratados com a formulação contendo melatonina e, em seguida, expostos ao PQ, foi de cerca de. Logo, um aumento significativo de aproximadamente em comparação com o grupo PQ ($P < 0,05$). É importante ressaltar que essa proteção não foi observada quando o tratamento utilizado foi a melatonina livre.

O efeito de nanopartículas de carbono (CNPs) sobre a sobrevivência de *C. elegans* foi relatada em um estudo realizado por Pramanik e colaboradores (2016), em que verificou-se que houve uma diminuição no percentual médio de sobrevivência dos vermes tratados com CNPs em altas concentrações quando comparados com o controle. Por outro lado, a porcentagem de sobrevivência é próxima ao do grupo controle quando os vermes foram expostos a concentrações mais baixas de CNPs. Os resultados indicam que as NPs em concentrações ideais são extremamente benéficas ao desenvolvimento e crescimento dos vermes.

Os resultados do nosso estudo demonstram que as NCs poliméricas diminuem a toxicidade causada pela exposição crônica dos compostos livres aos vermes. Apesar de haver poucos estudos com NCs poliméricas para comprovar esta hipótese, os resultados deste trabalho condizem com resultados de trabalhos anteriores realizados com *C. elegans* e NC preparadas com o polímero PCL e triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico como óleo (CHARAO *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2016).

Figura 8. Análise da toxicidade do *C. elegans* N₂ exposto a diferentes grupos de tratamento (n=4). (**) indica diferença significativa em relação ao grupo

controle $p < 0,0001$. (##) indica diferença significativa de QC em relação a NC-QC.

5.3.3 Ensaio de Reprotoxicidade

Acredita-se que a avaliação da fecundidade seja um dos parâmetros toxicológicos significativos para avaliar a toxicidade em *C. elegans*. Este nematóide é um organismo modelo já bem estabelecido para estudos da toxicidade reprodutiva assim como para a avaliação dos efeitos biológicos de diferentes compostos (ROGERS *et al.*, 2015).

Neste trabalho, os dados encontrados na avaliação da toxicidade reprodutiva mostram que o número total de larvas geradas pelos vermes tratados com NCs, seja a formulação branca ou contendo os fármacos co-encapsulados, ficou muito próximo ao grupo controle, enquanto que os vermes expostos à CR e aos compostos associados (grupo QC) demonstraram uma diminuição significativa na reprodução. Os vermes tratados com o grupo CR demonstraram uma redução em torno de na reprodução, significativa quando comparado ao grupo controle. De acordo com a Figura 9, é possível perceber que o grupo QC teve uma diminuição de aproximadamente na reprodução dos vermes tratados com este grupo, quando comparados com o grupo NC-QC que manteve o número de larvas próximo ao do grupo controle, em torno de.

Figura 9. Efeito da QN e CR sobre a reprodução do *C. elegans*. O experimento foi realizado por quatro dias e os ovos de cada verme individualmente, foi contado até o final do período reprodutivo ($n=3$). (**) indica diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,0001$. (##) indica diferença significativa de QC em relação a NC-QC.

De acordo com estudo realizado por Moraes e colaboradores (2015), utilizando NCs poliméricas preparadas com PCL e contendo clozapina para o mesmo ensaio descrito (Tamanho da ninhada) não houve efeito tóxico das NCs. Além disso, observou-se que os vermes quando tratados apenas com a

CZP livre diminuíram a sua capacidade reprodutiva, enquanto que a CZP nanoencapsulada não apresentou diferença significativa neste parâmetro quando comparada com o grupo controle.

Para Tyne e colaboradores (2015) foi difícil identificar o mecanismo direto pelo qual a exposição a NP de prata (Ag) diminuiu a fertilidade dos vermes, porém as diferentes concentrações e o tempo de exposição das NPs aos vermes são considerados fatores importantes. Na exposição com AgNP, o tamanho da ninhada de nematóides quando comparada com o controle foi de aproximadamente 92%, porém poucos ovos foram colocados por nematóides expostos a altas concentrações de AgNP.

5.3.4 Ensaio de Longevidade

Na Figura 10 estão representadas as curvas de longevidade de *C. elegans* tratados com NC contendo QN e CR ou em soluções isoladas.

O tempo máximo de vida de *C. elegans* no grupo controle foi de 17 dias. O tempo máximo de vida de *C. elegans* tratado com NC-QC aumentou significativamente em ($P < 0,05$) em relação ao controle e em relação ao grupo QC. Entre todos os grupos de tratamento, o grupo QC mostrou uma taxa de mortalidade maior. de vermes permaneciam vivos. Estes dados sugerem que a alta taxa de inclusão de substâncias lipofílicas permite uma diminuição da toxicidade do fármaco.

Figura 10. A longevidade foi determinada em *C. elegans* a partir do estágio larval L4 (expostos aos tratamentos em estágio L1) para cada grupo. Os animais foram transferidos para uma nova placa NGM/OP50 todos os dias até a morte de todos os animais (n=3). (#) indica diferença significativa do grupo QC em relação ao grupo NC-QC ($p < 0.05$).

5.4 Avaliação da absorção e distribuição dos compostos em *C. elegans*

O *C. elegans* é um nematóide frequentemente usado como um modelo de organismo vivo, levando em consideração que seu genoma tem aproximadamente de 60 a 80% de semelhança com os seres humanos (ZHANG *et al.*, 2013). A boca de um *C. elegans* adulto tem seis lábios simétricos em torno da sua abertura (MCGHEE *et al.*, 2007) e forma uma cavidade circular de onde os alimentos são transportados para a faringe. Em laboratório, o *C. elegans* ingere *Escherichia coli* como fonte de alimentação, bombeando-os para a boca e concentrando-os na faringe antes da passagem para o intestino (SOLIS & PETRASCHECK, 2011). Esta ação de bombeamento ocorre independentemente da presença de alimentos. O uso de *C. elegans* para estudos da digestão, absorção oral e a distribuição de compostos têm sido cada vez mais frequente. O tamanho e a transparência do verme facilitam a visualização dos compostos utilizados como tratamento, seja por microscopia de fluorescência, seja por observação direta ou com a utilização de marcadores. Outras técnicas podem ser aliadas com o objetivo de avaliar ingestão e distribuição de fármacos pelos vermes, tais como a quantificação de compostos por cromatografia (SURCO-LAOS *et al.*, 2012).

As moléculas com atividade antimalárica de escolha para este estudo possuem fluorescência própria, portanto não foi necessária a utilização de um marcador fluorescente para a realização deste experimento. Aliada à microscopia por fluorescência, quantificamos as concentrações de QN e CR presentes nos vermes utilizando método cromatográfico previamente validado.

As avaliações foram realizadas após 30 minutos e 24 horas da exposição aos tratamentos.

A Figura 11 apresenta as imagens de microscopia dos vermes após os diferentes tratamentos e tempos de exposição. A emissão de fluorescência foi visualizada em todos os grupos contendo os compostos no tempo 30 min (Fig 11 A, B, C, D e E), indicando que os tratamentos foram ingeridos pelos vermes, pois a via oral é a principal forma de administração de fármacos para o *C. elegans*.

As NP podem se comportar de forma inesperada *in vivo* com relação a sua emissão de fluorescência como resultado de sua interação com o *C. elegans*, portanto o uso de outras técnicas para localizar as NP dentro do verme pode fornecer resultados mais precisos para compreender o destino das NPs. Assim, a quantificação da QN e CR também foi realizada nesse estudo. Após 30 minutos de tratamento, os vermes foram sedimentados por centrifugação e ambos sobrenadante e sedimento separados, congelados, processados e quantificados por CLAE-DAD. Os resultados apresentados na Figura 12 foram calculados considerando o somatório das concentrações obtidas no sobrenadante e sedimento como 100%. A avaliação dos percentuais de recuperação de cada composto corrobora com os resultados visualizados por fluorescência. No caso da CR, altos níveis do composto foram obtidos no sedimento, indicando que os vermes ingeriram o curcuminóide livre, associado à QN ou co-encapsulado em nanocápsulas poliméricas. No caso da QN, os valores obtidos foram na ordem de 50% do total recuperado. As imagens mostram que a CR está apresentada na forma de pontos específicos no corpo do verme (Fig 11 A, D, E) enquanto que a QN encontra-se mais distribuída em todo o verme (Fig. 11B). Além disso, pudemos observar que a fluorescência estava presente não só no lúmen intestinal, mas também em outras células e partes do corpo, como por exemplo, na faringe para o grupo NC-QC, o que indica que a formulação tem grande absorção e taxa de distribuição *in vivo*. Este é um fato muito relevante, considerando que as imagens foram feitas após a exposição de 30 minutos e após a exposição de 24 horas.

Observamos que 24 horas após o tratamento existe uma migração da fluorescência a partir do intestino dos vermes para outros tecidos, indicando a

distribuição do tratamento pelos tecidos. Estes resultados estão de acordo com Charão e colaboradores (2015), quando observaram que os vermes tratados com solução salina não apresentaram fluorescência, entretanto os vermes tratados com NC de melatonina mostram fluorescência após 30 minutos de tratamento, o que indica que a fluorescência observada deve-se a rodamina B co-encapsulada com a melatonina. Após 3 horas do tratamento, a fluorescência migrou para outros tecidos, mostrando que houve uma distribuição das NCs.

A fluorescência também foi observado nos vermes após as 24 horas do tratamento, indicando que os compostos co-encapsulados foram digeridos e absorvidos pelos vermes permanecendo dentro do seu corpo. De acordo com Colmenares e colaboradores (2016), NPs com tamanhos entre 200-500 nm foram os mais adequados para assegurar a ingestão elevada destes compostos por *C. elegans*. Os autores desenvolveram nanoemulsões com ácido linoleico incorporado a esse sistema, e observaram um aumento na intensidade de fluorescência dos nematódeos com o aumento do tamanho das NPs.

Os teores de QN e CR obtidos após 24 hs foram inferiores aos demonstrados na Figura 12, mais ainda quantificáveis. No caso da CR, cerca de 90% do composto se encontrava no sedimento nos grupos CR livre e CR (QC), e após 24 horas esses valores foram inferiores a 10% e nem chegando a ser quantificada no grupo NC-QC. Sabe-se que a CR administrada é uma mistura composta por 70% de curcumina e o restante é composto por demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina, os quais também emitem fluorescência. Ainda não há relatos da metabolização da CR e outros curcuminóides em *C. elegans*. Os teores de QN após 24 horas caíram para em torno de 5, 50 e 30% para os grupos QN livre, QN associada (QC) e NC-QC, condizentes com a intensidade de fluorescência observada nos mesmos grupos (Fig. 11 B-2, D-2 e E-2). Cabe destacar que a quantificação dos compostos pela técnica cromatográfica foi realizada com detecção por ultravioleta, nos comprimentos de onda definidos de 426 nm e 232 nm para CR e QN, respectivamente. A absorção de substâncias é um pré-requisito essencial para os seus efeitos sistêmicos, levando em consideração que a principal via de absorção das NC em *C. elegans* é o oral, é importante ressaltar

que os vermes ingerem as NC ativamente durante a sua alimentação. Recentemente, a absorção e distribuição de NC lipídicas preparadas com polietilenoglicol e marcadas com um corante fluorescente celular foi demonstrada pela internalização e direcionamento das LNC para células de tumor *in vivo* (HIRSJÄRVI *et al.*, 2013).

De acordo com os resultados aqui apresentados, as NC foram bem captadas e distribuídas pelos vermes e, conseqüentemente, minimizaram os efeitos tóxicos dos fármacos livres *in vivo*, demonstrando a importância deste tipo de formulação.

Figura 11. Microscopia de fluorescência em *C. elegans*. (A) CR (B) QN (C) NC-Br (D) QC (E) NC-QC. O número dois indica a microscopia após as 24h de exposição do verme ao tratamento.

Figura 12. Percentual de recuperação da QN e CR no sobrenadante e nos vermes após 30 min de exposição.

5.5 Estabilidade das formulações em meio de cultivo

A integridade das NC utilizadas neste estudo foi avaliada após a diluição com o meio de exposição dos vermes (M9). De acordo com a Tabela 5, observou-se que este meio não interfere na estabilidade das formulações, pois as NC não sofreram alterações no diâmetro médio das partículas (D [4,3]) e na distribuição de tamanho em ambas as formulações NC-QC e NC-Br. Os

resultados deste experimento não indicaram nenhuma aglomeração ou agregação das NPs nas suspensões coloidais.

As análises de difratometria a laser não mostraram nenhuma aglomeração nas suspensões de NC-QC e NC-Br após a adição ao meio de exposição M9 (após 30 minutos). Os diâmetros médios ($D_{(4,3)}$) para as formulações, após a adição do meio M9 foi de $0,177 \pm 1,3$ e $179 \pm 1,6$ nm para NC-Br e NC-QC respectivamente. Os valores de Span mantiveram-se praticamente constantes, com valores iniciais de $1,3 \pm 1,3$ e $1,3 \pm 0,5$, e 30 minutos após o contato das formulações com o meio M9, não houve alteração significativa nos valores de Span.

O potencial zeta das formulações mostrou-se mais negativo após as diluições, o que pode ser atribuído a adsorção dos sais presentes no tampão na superfície das nanopartículas. O pH inicial da formulação NC-QC foi de $7,04 \pm 0,3$ e de $7,15 \pm 0,5$ para a NC-BR.

Tabela 4. Caracterização físico-química das formulações em meio M9

Tempo (min)	NC-Br			NC-QC		
	$D_{(4,3)}(\mu\text{m})$	SPAN	Zeta	$D_{(4,3)}(\mu\text{m})$	SPAN	Zeta
0	$0,202 \pm 0,9$	$1,3 \pm 1,3$	$-51,7 \pm 1,1$	$0,194 \pm 1,4$	$1,3 \pm 0,5$	$-38 \pm 1,2$
10	$43 \pm 6,3$	$0,7 \pm 1,1$	$-41,3 \pm 1,5$	$0,197 \pm 1,9$	$1,3 \pm 1,2$	$-47,4 \pm 2,1$
20	$1,0 \pm 1,6$	$1,6 \pm 1,2$	$-42,2 \pm 1,2$	$0,181 \pm 1,2$	$1,3 \pm 0,8$	$-47,8 \pm 1,4$
30	$0,177 \pm 1,3$	$1,3 \pm 1,4$	$-41,4 \pm 2,1$	$0,179 \pm 1,6$	$1,2 \pm 1,1$	$-48,3 \pm 1,2$

6 CONCLUSÕES

As nanocápsulas desenvolvidas contendo QN e CR, através do método de nanoprecipitação, apresentaram valores dentro do esperado para a caracterização físico-química.

Os valores de diâmetro médio, encontram-se dentro da faixa manométrica, valores de potencial zeta mais distante de zero, o teor foi próximo de 100%, e valores de pH adequados.

A nanoencapsulação da QN e CR 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.

Na avaliação da distribuição dos compostos nas pseudo-fases, a distribuição de QN está na fase contínua, dispersa na interface e dissolvida no núcleo das nanopartículas, o que mostra que a QN pertence ao tipo. A CR é distribuída principalmente no núcleo oleoso nas NC, e se distribui conforme o tipo do algoritmo.

A exposição crônica de QN e CR livre em *C. elegans*, causou toxicidade e conseqüentemente afeitos biológicos indesejáveis, diminuindo a taxa de sobrevivência em até 50%. O tempo máximo de vida de *C. elegans* tratado com NC-QC aumentou significativamente em 30%.

Os compostos nanoencapsulados, demonstraram um maior efeito protetor em *C. elegans*, diminuindo os efeitos tóxicos. A sobrevivência dos vermes foi de 95% e o número de larvas colocadas durante o período reprodutor, foram duas vezes maiores do que com o fármaco livre.

Foram obtidas imagens de microscopia dos vermes após os diferentes tratamentos e tempos de exposição. A emissão de fluorescência foi visualizada em todos os grupos contendo os compostos, indicando que os tratamentos foram ingeridos pelos vermes.

A avaliação dos percentuais de recuperação de cada composto por CLAE-DAD, está de acordo com os resultados visualizados por fluorescência. Foi possível quantificar os níveis de compostos ingeridos pelos vermes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. F. Nanotechnology in the food industry nanotecnologia na indústria de alimentos. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1919-1932, 2014.

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

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, p.71-94, 1974.

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

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

CARREÑO, F.; PAESE, K.; SILVA, C. M.; GUTERRES, S. S.; DALLA-COSTA, T. Characterizing the mechanism of quetiapine distribution in lipid-core nanocapsules pseudo-phases using a validated lc/uv method. *Química Nova*, v. 38, n. 9, p. 1181-1186, 2015.

CHARÃO, M. F. et al. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core

nanocapsules on paraquat damage. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5093–5106, 2015.

CORADINI, K., LIMA, F. O.; OLIVEIRA, C. M.; CHAVES, P. S.; ATHAYDE, M. L.; CARVALHO, L. M. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 178-185, 2014.

CUI, L.; MIAO, J.; CUI, L. Cytotoxic Effect of Curcumin on Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*: Inhibition of Histone Acetylation and Generation of Reactive Oxygen Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 488-494, 2007.

DE MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (l-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 65-69, 2010.

DEL PRADO, G. R. L.; GARCÍA, C. H.; CEA, L. M.; ESPINILHA, V. F.; MORENO, F. M.; MARQUEZ, A. D.; POLO, J. P. Malaria in developing countries. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 1, p. 01-04, 2014.

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

DE SÁ, I. M. Chloroquine resistance and the search for antimalarial drugs from the 1960s to 1980s. **História, Ciências, Saúde**. Manginhos/RJ, v.18, n.2, p.407-430, 2011.

DETONI, C. B.; SOUTO, G. D.; DA SILVA, A. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p. 913-921, 2012.

ENG, S.; NATHAN, S. Curcumin rescues *Caenorhabditis elegans* from a *Burkholderia pseudomallei* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 6:290. 2015.

FAGUNDEZ, D. et al. Behavioral and dopaminergic damage induced by acute iron toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology. Research*, v.4, p. 878-884, 2015.

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.

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.

FURURASHI, T.; SAKAMOTO, K. FoxO/Daf-16 restored thrashing movement reduced by heat stress in *Caenorhabditis elegans*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 170, p. 26–32, 2014.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEIROA-VILLAR, J. D. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. **Revista Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008

GOMES, A. P. et al. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358-369, 2011.

GOMES, P. R. et al. Síntese e avaliação da atividade antimalárica de compostos derivados da curcumina. **Revista Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 492-496, 2014.

GOOD, M. F.; XU, H.; WYKES, M.; ENGWERDA, C. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: Implications for vaccine research. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 69-99, 2005.

GHOSH, A.; BANERJEE, T.; BHANDARY, S.; SUROLIA, A. Formulation of nanotized curcumin and demonstration of its antimalarial efficacy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 20, n. 9, p. 5373-5387, 2014.

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.

HAAS, S.E.; DE ANDRADE C.; SANSONE, P. E.; GUTERRES, S.; DALLA COSTA, T. Development of innovative oil-core self-organized nanovesicles prepared with chitosan and lecithin using a 2(3) full-factorial design. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 7, p. 769-78, 2014.

HANS, M.L.; LOWMAN, A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State & Material Science**, v.6, p. 319 – 327, 2002.

HEGER, M.; GOLEN, R. F.; BROEKGAARDEN, M.; MICHAEL, M. C. The Molecular Basis for the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin and Its Metabolites in Relation to Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 66, p. 222-307, 2014.

HERMANS, C.; PLAS, D. V.; EVERAERT, A.; WEYENBERG, W.; LUDWIG, A. Full factorial design, physicochemical characterisation and biological assessment of cyclosporine A loaded cationic nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, p. 27-35, 2012.

HIRSJÄRVI, S. et al. Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. **Nanomedicine**, v. 9, p. 375–387, 2013.

ISER, W. B.; GAMI, M. S.; WOLKOW, C. A. Insulin signaling in *Caenorhabditis elegans* regulates both endocrine-like and cell-autonomous outputs. **Developmental Biology**, v. 303, n. 2, p. 434-472, 2007.

JUNG, I. et al. A multi-endpoint, high-throughput study of nanomaterial toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Environ Sci Technol**, v. 49, n. 4, p.2477–2485, 2015.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Review Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-398, 2006.

KRZYZANOWSKI, M. C.; BRUEGGEMANN, C., EZAK, M. J.; JORDAN F. WOOD, J. F.; MICHAELS, L. K.; JACKSON, C. A.; JUANG, B.; COLLINS, K. D.; YU, M. C.; L'ETOILE, N. D.; FERKEY, D. M. The *C. elegans* cGMP-Dependent Protein Kinase EGL-4 Regulates Nociceptive Behavioral Sensitivity. **PLoS Genet**, v. 9, n. 7, 2013.

LEUNG, M. C. K.; WILLIAMS, P. L.; BENEDETTO, A.; AU, C.; HELMCKE, K. J.; ASCHNER, M.; MEYER, J. N. *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental **Toxicology**. **Toxicology Sciences**, v.106, n. 1, p. 5-28, 2008.

LI, Y., WANG, Y., YIN, L., PU, Y.; WANG, D. Using the nematode *Caenorhabditis elegans* as a model animal for assessing the toxicity induced by microcystin-LR. **Journal Environ Science**, v. 21, p. 395-401, 2009.

LI, B.; KONECKE, S.; WEGIEL, L. A.; TAYLOR, L. S. Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1108– 1116, 2013.

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

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles characterization. A comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sci**, v. 4, p. 221-241, 1991.

MAZZARINO, L.; BELLETTINI, I. C.; MINATTI, E.; LEMOS-SENNA, E. Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 46, n. 2, 2010.

MCGHEE, J. D. et al. The ELT-2 GATA-factor and the global regulation of transcription in the *C. elegans* intestine. **Dev. Biology**, v. 302, p. 627-645, 2007.

MICHELS, L. R. **Desenvolvimento, caracterização, avaliação da eficácia *in vitro*, *in vivo* e farmacocinética de nanopartículas de superfície modificada contendo quinina**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2016.

MICHELS, L. R.; BAJERSKI, L.; MACIEL, T. R.; COLOMÉ, L. M.; HAAS, S. E. Quinine-Loaded Polymeric Nanoparticles: Validation of a simple HPLC-PDA

Method to Determine Drug Entrapment and Evaluation of its Photostability. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 2, p. 09-15, 2016.

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. Estratégia Técnica Mundial para o Paludismo 2016–2030. v. 1, 2015.

MIYASAKA, T.; XIE, C.; SATOMI YOSHIMURA, S.; SHINZAKI, Y.; YOSHINA, S.; KAGE-NAKADAI, E.; MITANI, S.; IHARA, Y. Curcumin improves tau-induced neuronal dysfunction of nematodes. **Neurobiology of Aging**, v. 39, p. 69-81, 2016.

MOHANTY, C., & SAHOO, S. K. The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. **Biomaterials**, 31, 6597–6611, 2010.

MORAES, B. C. S.; VIEIRA; S. M.; SALGUEIRO, W. G.; MICHELS, L. R.; COLOMÉ, L. M.; AVILA, D. S.; HAAS, S. E. Clozapine-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules: Physico-chemical characterization and toxicity evaluation in *Caenorhabditis elegans* Model. **Journal of Nanoscience and nanotechnology**, v. 15, p. 1-8, 2015.

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

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 1, p. 235-239, 2012.

MUTIS, M. C. S.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E.; ALBUQUERQUE, B. C.; et al. Malária. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, p. 833-58, 2005.

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.

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

OLIVEIRA, C. P.; VENTURINI, C. G.; DONIDA, B.; POLETTO, F. S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. *Soft Matter*, v. 9, p. 1141, 2012.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1, p. 1-4, 2008.

PALLAUF, K.; BENDALL, J.; SCHEIERMANN, C.; WATSCHINGER, K.; HOFFMANN, J.; ROEDER, T.; RIMBACH, G. Vitamin C and lifespan in model organisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 255–263, 2013.

PARIZE, A. L. **Desenvolvimento de sistemas microarticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PARIZE, A. L.; STULZER, H. K.; LARANJEIRA, M. C. M.; BRIGHENTE, I. M. C.; SOUZA, T. C. R. Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray-drying. **Química Nova**, V. 35, n. 6, p. 1127-1132, 2012.

PRAMANIK, A.; KOLE, A. K.; KRISHNARAJ, R. N.; BISWAS, S.; TIWARY, C. S.; VARALAKSHMI, P.; RAI, S. K.; KUMAR, K. B; A Novel Technique of Synthesis of Highly Fluorescent Carbon Nanoparticles from Broth Constituent and In-vivo Bioimaging of *C. elegans*. **Journal of Fluorescence**, p. 1-8, 2016.

PRIYADARSINI, K. I. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent, *Molecules*, v. 19, p. 20091-20112, 2014.

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

RIDDLE, D.L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B.J.; PRIESS, J.R. C. ELEGANS II. **Cold Spring Harbor Laboratory**, p. 393–412, 1997.

ROGERS, S.; RICE, K. M.; MANNE, N. D.; SHOKUHFAR, T.; HE, K.; SELVARAJ, V.; BLOUGH, E. R. Cerium oxide nanoparticle aggregates affect stress response and function in *Caenorhabditis elegans*. **SAGE Open Medicine**. v. 3, 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.

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.

SAVIAN, A. L.; RODRIGUES, D.; WEBER, J.; RIBEIRO, R. F.; MOTTA, M. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; ADAMS, A. I.; DE ANDRADE, D. F.; BECK, R. C.; DA SILVA, C. B. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in vitro irritation potential of this drug. **Materials Science and Engineering C Materials for Biological Applications**, v. 46, p. 69-76, 2015.

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

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

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

SOLIS, G. M.; PETRASCHKEK, M. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates. **Journal of Visualized Experiments**, v. 18, n. 49, p. 2496, 2011.

SOPPIMATH, K. S, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1, 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.

SURCO-LAO, F. et al. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. **Food Research International**, v. 46, p. 514–521, 2012.

TYNE, W.; SIMON, L.; SPURGEON, D. J.; SVENDSEN, C. Hormesis depends upon the life-stage and duration of exposure: Examples for a pesticide and a nanomaterial. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p.117–123, 2015.

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

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.

VIEIRA, J. L. F.; & MIDIO, A. F. Aspectos toxicológicos da quinina no Tratamento da malária por *P. falciparum*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 34, p. 33-37, 2000.

VIEIRA, S. M.; MICHELS, L. R.; METZC, V. G.; ROVERSI, K.; MORAES, B. K. S.; PIEGAS, E. M.; FREDDO, R. J.; GUNDEL, A.; DALLA-COSTA, T.; BURGER, M. E.; COLOMÉ, L. M.; HAAS, S. E. A surface modification of clozapine-loaded nanocapsules improves their efficacy: A study of formulation development and biological assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.145, p. 748–756, 2016.

WANG, D.; XING, X. Assessment of locomotion behavioral defects induced by acute toxicity from heavy metal exposure in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal Environ Science**, v. 20, p. 1132-1137, 2008.

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.

WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. V. Chloroquine-resistant malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 6, p. 770-776, 2001.

World Health Organization, 2015. World Malaria Report. Available at: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/

World Health Organization, 2016. World Malaria Report. Available at: <http://www.who.int/malaria/en/>

YU, C.; LIAO, H. Arsenite induces neurotoxic effects on AFD neurons via oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. **Metallomics**, v. 6, p. 18-24, 2014.

YURGEL, V. C. et al. Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant breast cancer cell line. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1583-1591, 2014.

ZHANG, Y.; BONSLow, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M. C.; ANDYATES, J. R. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical Rev**, v. 113, p. 2343-2394, 2013.

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.