

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da Eficácia e Farmacocinética de  
Nanocápsulas Poliméricas de Quinina em Ratos  
Infectados com *Plasmodium berghei*

**SANDRA ELISA HAAS**

Porto Alegre, 2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da Eficácia e Farmacocinética de  
Nanocápsulas Poliméricas de Quinina em Ratos  
Infectados com *Plasmodium berghei*

Dissertação apresentada por  
**SANDRA ELISA HAAS** para  
obtenção de GRAU DE MESTRE  
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Dalla Costa  
Co-orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Porto Alegre, 2007

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado/Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 21/03/2007 e pela Comissão/Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Eduardo Fröhlich  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Graziela Maria Zanini  
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

H112a	Haas, Sandra Elisa Avaliação da eficácia e farmacocinética de nanocápsulas poliméricas de quinina em ratos infectados com plasmodium berghei / Sandra Elisa Haas – Porto Alegre : UFRGS, 2007. – xxii, 127 p.: IL., gráf., tab.  Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.  1. Quinina. 2. Nanocápsulas. 3. Plasmodium berghei. 4. Farmacocinética. 5. Eficácia antimalárica. I. Dalla Costa, Teresa Cristina Tavares. II. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. III. Título
-------	---

CDU:615.2.015.4

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e no Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com bolsa de estudos financiada pela CAPES



“Não importa onde você parou... Em que momento da vida você cansou... O que importa é que sempre é possível e necessário recomeçar. Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo... É renovar as esperanças na vida e, o mais importante, acreditar em você de novo. Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado... Chorou muito? Foi limpeza da alma... Ficou com raiva das pessoas? Foi para poder perdoá-las um dia...

Sentiu-se só por diversas vezes? É porque fechou a porta até para os anjos. Acreditou que tudo estava perdido? Era o início de sua melhora. Aonde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto, queira o melhor do melhor. Se pensarmos pequeno, coisas pequenas teremos, mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor, o melhor vai se instalar em nossa vida. Porque sou do tamanho daquilo que vejo e não do tamanho da minha altura.”

*Carlos Drummond de Andrade*





## **AGRADECIMENTOS**

À professora Teresa, pelo exemplo profissional, incentivo a vida acadêmica, orientação e paciência.

À professora Sílvia, por oportunizar os meus primeiros passos na iniciação científica e pela co-orientação deste trabalho.

Aos todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação e Faculdade de Farmácia.

A todos os amigos do laboratório 405, pelos auxílios, pelos cafezinhos e pelas risadas compartilhadas. Aos amigos de outros laboratórios que fiz durante este período, em especial ao Clésio Paim, Leonardo Munari e Gustavo Provensi.

Aos meus amigos farmacocinéticos (ou PKs): Bibiana Araújo, Daniela Conrado, Rodrigo Freddo, Vitória Cattani, Clarissa Bettoni, Eduardo Palma, Cristófer Farias, Laura K. de Oliveira, Cândice Felippi, Flávia Uchoa, Leandro Tasso, Letícia Guigui e Helen Pedroni. Muito obrigada pelos momentos de alegria, revolta, companheirismo, aprendizado, enfim, pelas diversas emoções compartilhadas neste período. Tenho certeza que construímos laços que não serão desfeitos com o tempo, pelo contrário, serão cada vez mais fortalecidos.

Aos bolsistas que me ajudaram no decorrer deste trabalho: Clarissa Bettoni, Cristófer Farias e Laura K. de Oliveira.

A toda a minha família, pelo apoio imparcial, em especial a minha mãe, por ter me educado seguindo os seus bons princípios, fundamentais para a minha formação pessoal.

Ao Fabiano, pela paciência, compreensão e carinho no decorrer desta caminhada. Em especial, pelo incomparável apoio nos momentos mais difíceis do desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xv</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xix</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xxi</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>5</b>
2.1 Objetivo geral .....	9
2.2 Objetivos específicos .....	9
<b>3. Revisão de Literatura</b> .....	<b>9</b>
3.1 Malária .....	11
3.1.1 A malária no mundo .....	11
3.1.2 A malária na América Latina .....	12
3.1.3 Ciclo de vida do parasita e patogenia da doença .....	15
3.1.4 Terapia antimalárica e resistência .....	19
3.1.5 Quinina .....	21
3.1.6 Alternativas para o tratamento de doenças infecciosas .....	25
3.2 Sistemas carreadores de fármacos .....	27
3.2.1 Nanocápsulas .....	28
3.2.1.1 Métodos de preparação de nanocápsulas .....	28
3.2.1.2 Matérias-primas utilizadas na produção de nanocápsulas .....	30
3.2.1.3 Caracterização físico-química .....	31
3.2.1.3.1 Morfologia.....	31

3.2.1.3.2 Distribuição do tamanho de partícula .....	32
3.2.1.3.3. pH das suspensões .....	32
3.2.1.3.4. Determinação do potencial zeta .....	33
3.2.1.3.5 Determinação da quantidade total de fármaco associado .....	33
3.2.2 Nanopartículas com superfície modificada .....	34
3.2.3 Sistemas nanoparticulados contendo fármacos antimaláricos .....	37
3.2.3.1 Lipossomas.....	38
3.2.3.2 Nanopartículas.....	40
<b>4. Materiais e Métodos .....</b>	<b>47</b>
4.1 Solventes e reagentes .....	49
4.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios .....	50
4.3 Metodologia .....	51
4.3.1 Purificação da quitosana .....	51
4.3.2 Preparação das suspensões de nanocápsulas contendo quinina .....	52
4.3.3 Preparação das suspensões de nanocápsulas de quinina revestidas com quitosana .....	53
4.3.4 Preparação das suspensões de nanocápsulas mistas .....	54
4.3.5 Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo quinina .....	54
4.3.5.1 Determinação do pH .....	54
4.3.5.2 Determinação do diâmetro de partícula .....	54
4.3.5.3 Determinação do potencial zeta.....	55
4.3.5.4 Determinação do teor e da taxa de encapsulação da quinina nas nanocápsulas.....	55
4.3.6 Validação de método analítico para o doseamento de quinina nas nanocápsulas .....	56
4.3.7 Avaliação biológica das nanocápsulas de quinina .....	57
4.3.7.1 Animais .....	57
4.3.7.2 Infecção experimental.....	58
4.3.7.2.1 Manutenção da cepa.....	58
4.3.7.2.2 Preparação do inóculo .....	58
4.3.7.2.3 Indução e monitoramento da infecção .....	59
4.3.7.3 Avaliação da eficácia das nanocápsulas contendo quinina .....	59

4.3.7.3.1 Nanocápsulas revestidas com quitosana contendo 4 mg/mL de quinina.....	60
4.3.7.3.2 Nanocápsulas contendo 4 mg/mL de quinina.....	60
4.3.7.3.3 Nanocápsulas mistas contendo 4 mg/mL de quinina .....	61
4.3.7.3.4 Nanocápsulas contendo 3 mg/mL de quinina.....	61
4.3.7.3.5 Nanocápsulas contendo 2 mg/mL de quinina.....	62
4.3.7.4 Experimentos farmacocinéticos .....	63
4.3.7.4.1 Metodologia analítica para a quantificação de quinina em amostras de plasma .....	65
4.3.7.4.2 Validação de metodologia analítica para o doseamento da quinina em amostras de plasma .....	66
4.3.7.5 Avaliação da Ligação da quinina aos eritrócitos .....	66
4.3.8 Descarte de resíduos .....	67
<b>5. Resultados e Discussão .....</b>	<b>69</b>
5.1 Nanocápsulas revestidas com quitosana contendo 4 mg/mL de quinina (NC-QTS) .....	72
5.2 Nanocápsulas contendo 4 mg/mL de quinina (NC4-QN) .....	74
5.3 Nanocápsulas contendo 3 mg/mL de quinina (NC3-QN) .....	79
5.4 Nanocápsulas mistas contendo 2 mg/mL de quinina .....	83
5.5 Nanocápsulas contendo 2 mg/mL de quinina (NC2-QN) .....	84
5.6 Avaliação farmacocinética das nanocápsulas de quinina (NC2-QN) .....	89
5.7 Avaliação da ligação da quinina aos eritrócitos .....	95
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>99</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>103</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>115</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos casos de malária na América do Sul e Central, em 2001. Valores expressos em percentagem. ....	13
Figura 2. Curva da percentagem de casos de malária causadas por <i>P. falciparum</i> na Amazônia Legal 1999-2004. ....	14
Figura 3. Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> . ....	16
Figura 4. Morfologia dos eritrócitos em células normais, células infectadas com trofozoítos e em parasitada por esquizonte. ....	17
Figura 5. Áreas de transmissão da malária e distribuição da resistência a alguns antimaláricos. ....	20
Figura 6. Estrutura química da quinina . ....	23
Figura 7. Métodos empregados na preparação de nanopartículas poliméricas. ....	30
Figura 8. Estrutura da Quitosana . ....	36
Figura 9. Avaliação da parasitemia após o tratamento de camundongos infectados com <i>P. chabaudi</i> . ....	40
Figura 10. Avaliação da parasitemia de camundongos infectados com <i>P. berghei</i> após a administração de halofantrina (1 mg/kg). ....	45
Figura 11. Esquema da administração do fármaco através de infusão contínua. ....	60
Figura 12. Perfil de sobrevivência de ratos Wistar infectados após tratamento com nanocapsulas de quinina ou quinina livre em diferentes doses, através de infusão contínua, a cada 12 horas. ....	78

Figura 13. Perfil de parasitemia de animais tratados com NC3-QN através de infusão contínua, q12h, nas doses de 30 mg/kg e 40 mg/kg. ....	81
Figura 14. Perfil de parasitemia de animais tratados com QN livre (doses de 100 e 150 mg/kg/dia) e NC3-QN (doses de 70 e 100 mg/kg/dia). ....	83
Figura 15. Parasitemia média obtida após o tratamento de ratos Wistar machos infectados com <i>P. berghei</i> pela via i.v., nas doses efetivas de QN encapsulada e não-encapsulada a cada 8 horas. ....	87
Figura 16. Perfis de concentração plasmática médios de QN livre e NC2-QN em animais sadios e infectados após uma dose de 25 mg/kg de fármaco através da via intravenosa .....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mecanismos que contribuem para a anemia na malária . . . . .	18
Tabela 2. Combinação de terapias com fármacos antimaláricos . . . . .	22
Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos relatados na literatura para a quinina em humanos e animais de experimentação sadios e infectados. . . . .	26
Tabela 4. Fármacos antimaláricos nanoestruturados utilizados no tratamento da malária e de outras doenças causadas por protozoários. . . . .	38
Tabela 5. Parâmetros farmacocinéticos da halofantrina calculados após a administração i.v. do fármaco. . . . .	44
Tabela 6. Composição quali-quantitativa das formulações de nanocápsulas avaliadas. . . . .	53
Tabela 7. Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da quinina em nanocápsulas. . . . .	55
Tabela 8. Doses, intervalos entre-doses, forma de administração intravenosa e tamanho amostral dos grupos tratados com NC4-QN e quinina livre. . . . .	61
Tabela 9. Doses, via de administração e tamanho amostral dos grupos tratados com de NC3-QN e quinina livre. . . . .	62
Tabela 10. Grupos avaliados no estabelecimento da dose efetiva de quinina livre e nanoencapsulada (2 mg/mL) . . . . .	63
Tabela 11. Caracterização físico-química e estabilidade das NC4-QTS e brancas (NC-QTS-Br). . . . .	73

Tabela 12. Caracterização físico-química e estabilidade das nanocápsulas de quinina (4 mg/mL) sem revestimento (NC4-QN). .....	74
Tabela 13. Caracterização físico-química e estabilidade das nanocápsulas de quinina (3 mg/mL) sem revestimento (NC3-QN). .....	80
Tabela 14. Percentual de cura para as diferentes doses de quinina livre e NC3-QN após a administração intraperitoneal a cada 12 horas. ....	82
Tabela 15. Caracterização físico-química e estabilidade das NC2-QN durante 30 dias. ....	84
Tabela 16. Efetividade do tratamento com quinina livre ou nanoencapsulada, quando administrada através da via i.v, 8/8h. ....	86
Tabela 17. Parasitemia e parâmetros farmacocinéticos determinados após a administração de quinina livre ou NC2-QN na dose de 25 mg/kg, i.v., a ratos Wistar sadios ou infectados com <i>P. berghei</i> . ....	92
Tabela 18. Coeficiente de ligação da quinina e da NC2-QN aos eritrócitos .....	96

## ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva do tempo zero ao infinito
$ASC_{0-t}$	Área sob a curva do tempo zero ao tempo t
$ASC_{extr}$	Área sob a curva extrapolada
$ASMC_{0-\infty}$	Área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao infinito
$ASMC_{0-t}$	Área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao tempo t
$ASMC_{extr}$	Área sob a curva no primeiro momento extrapolada
$CL_{total}$	<i>Clearance</i> ou depuração
$C_{máx}$	Concentração máxima
CQ	Cloroquina
CV	Coefficiente de variação
$DL_{50}$	Dose necessária para matar 50 % dos animais
DP	Desvio padrão
$ED_x$	Dose efetiva para obtenção de “x” % do efeito
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
IC	Infusão continua
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LIQ	Limite inferior de quantificação
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MRT	Tempo de residência médio

n	Tamanho amostral
NC	Nanocápsulas
NC2-QN	Nanocápsulas contendo 2 mg/mL de quinina
NC3-QN	Nanocápsulas contendo 3 mg/mL de quinina
NC4-QN	Nanocápsulas contendo 4 mg/mL de quinina
NC-Br	Nanocápsulas sem fármaco
NC4-QTS	Nanocápsulas contendo 4 mg/mL de quinina e revestidas com quitosana
NC-QTS-Br	Nanocápsulas revestidas com quitosana sem fármaco
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. chabaudi</i>	<i>Plasmodium chabaudi</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PEG	Poli(etileno-glicol)
PLA	Poli(ácido láctico)
QN	Quinina
QTS	Quitosana
qxh	A cada “x” horas
SER	Sistema Retículo Endotelial
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TE	Taxa de encapsulação
$t_{máx}$	Tempo para atingir $C_{máx}$
$Vd_{ss}$	Volume de distribuição no <i>steady state</i>
$\lambda$	Constante de velocidade de eliminação

## RESUMO

**Objetivos:** Desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia in vivo e o perfil farmacocinético de suspensões de nanocápsulas (NC) poliméricas contendo quinina (QN). **Metodologia:** As NC-QN foram preparadas através de nanoprecipitação com diferentes concentrações de QN: 2 (NC2-QN), 3 (NC3-QN) e 4 mg/mL (NC4-QN). A NC4-QN também foi revestida com quitosana. Todas as formulações foram caracterizadas através de taxa de encapsulação, teor, diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta e pH, sendo a estabilidade avaliada por 30 dias. A avaliação da eficácia foi realizada com diferentes doses de cada formulação, em modelo de malária experimental em ratos Wistar infectados com *Plasmodium berguei*. A dose de NC-QN com a qual se obteve 100 % de cura dos animais foi selecionada para a avaliação farmacocinética. Nesses experimentos, os animais sadios ou infectados receberam a QN livre ou a NC2-QN, 25 mg/kg, iv bolus. As amostras de plasma coletadas em tempos pré-determinados foram quantificadas por CLAE com método validado para a determinação da QN. Os protocolos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (#2005477). **Resultados e discussão:** As suspensões coloidais preparadas com diferentes concentrações de QN apresentaram diâmetro adequado, população modispersa, potencial zeta diferente de zero, doseamento e taxa de encapsulação superior a 90 %. Somente a NC2-QN, na dose de 75 mg/kg/dia, q8h, curou todos os animais. Nas doses de 30 e 60 mg/kg/dia, q8h, 28,6 e 85,7% dos animais sobreviveram, respectivamente, com a NC2-QN. Houve uma diminuição significativa no  $t_{1/2}$  das NC2-QN ( $32,9 \pm 8,9$  min) em relação ao fármaco livre ( $69,8 \pm 44,6$  min), no grupo de animais infectados ( $\alpha = 0,05$ ) em função de uma tendência de aumento do CLtotal ( $7,1 \pm 3,3$  versus  $9,9 \pm 2,1$  L/h/kg) do fármaco nanoencapsulado. **Conclusões:** A nanoencapsulação da QN reduziu a dose efetiva do fármaco no modelo animal avaliado em 30 % e aumentou a sobrevivência dos animais infectados em cerca de 60 %, apresentando-se como uma alternativa potencial para o tratamento da malária.

**Palavras-chave:** quinina, nanocápsulas, eficácia antimalárica, *Plasmodium berguei*, farmacocinética.



## ABSTRACT

### **Efficacy and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles containing quinine in *Plasmodium berghei* infected rats**

**Objectives:** The aims of this study were to develop and characterize polymeric nanocapsules (NC) containing quinine (QN) and to evaluate their efficacy *in vivo* as well as the pharmacokinetic profile of the nanoencapsulated drug. **Methodology:** NC-QN were prepared by nanoprecipitation with different drug concentration 2 (NC2-QN), 3 (NC3-QN) and 4 mg/mL (NC4-QN). All formulations were characterized in terms of encapsulation efficacy, drug loading, zeta potential, particle size, polydispersion index, and pH. The stability nanocapsules suspensions were evaluated during 30 days. An experimental malaria model with *Plasmodium berghei* was used to evaluate NC-QN efficacy in Wistar rats. Different doses were tested for each formulation. The pharmacokinetic evaluation was performed with the dose of NC-QN which presented 100 % efficacy in malaria model. The NC2-QN or QN free were administrated by i.v. route (25 mg/kg) to health and infected rats. Blood samples were collected at pre-determined time points and quantified by an HPLC validated method. Animal protocols were approved by UFRGS Ethics in Research Committee (# 2005477). **Results and discussion:** All suspensions presented adequate particle size, monodisperse population, negative zeta potential, drug content and encapsulation efficiency higher than 90 %. The formulation NC2-QN (75 mg/kg/day) administrated q8h daily during 7-9 days post-infection cured all infected rats. For NC2-QN, 30 and 60 mg/kg/day, q8h, 28.6 and 85.7 % of survival were observed, respectively. NC2-QN presented significant decrease in QN  $t_{1/2}$  compared to the free drug ( $32.9 \pm 8.9$  min and  $69.8 \pm 44.6$  min, respectively), in infected rats ( $\alpha = 0,05$ ). This occurs due to the tendency of increase in  $CL_{total}$  ( $7.1 \pm 3.3$  to  $9.9 \pm 2.1$  L/h/kg, for free QN and NC2-QN, respectively).  $CL_{total}$  increased in the encapsulated group. **Conclusion:** Nanoencapsulation reduced QN effective dose in 30 % and increased in 60 % the survival of the infected animals. These results indicate that NC-QN is a potential strategy to be investigated for malaria treatment.

**KEY-WORDS:** quinine, nanocapsules, antimalarial efficacy, *Plasmodium berghei*, pharmacokinetics.



## 1. INTRODUÇÃO

---



A malária, causada pelo protozoário intracelular do gênero *Plasmodium*, é uma infecção mundial que afeta 300 milhões de pessoas e mata 1,5 milhões por ano (SUH *et al.*, 2004; OMS, 2005). O quadro clínico desta doença manifesta-se basicamente por episódios de febre elevada, com tremores musculares acentuados, que ocorrem a cada 3 ou 4 dias, conforme a espécie infectante (BRAGA e FONTES, 2000). Esses episódios correspondem ao término do ciclo eritrocítico (sangüíneo) do parasita. Vários fármacos antimaláricos atuam nesta fase do ciclo, como a quinina.

A quinina (QN) é um esquizotocida sangüíneo eficaz, mas tem seu uso limitado em virtude de seus efeitos adversos tóxicos como a cardiotoxicidade, e sua estreita janela terapêutica. Ela é utilizada, através da via intravenosa (i.v.), no tratamento de malária severa causada por cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina e outros fármacos (KOROLKOVAS e FRANÇA, 2004).

Atualmente, todos os fármacos utilizados na terapia da malária apresentam relatos de resistência, exceto os derivados da artemisinina. Para a cloroquina, a resistência é especialmente importante, pois trata-se de um fármaco de baixo custo, acessível e bastante eficaz, que está deixando de ser utilizado em quase todo o mundo (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002; SUH *et al.* 2004). Alternativas terapêuticas devem ser buscadas a fim de contornar este grave problema mundial.

Os carreadores nanoestruturados têm sido estudados para o tratamento de infecções intracelulares tais como as bacterianas (FATTAL *et al.*, 1989) ou as causadas por protozoários, como a toxoplasmose (SORDET *et al.*, 1998), a leishmaniose (RODRIGUES *et al.*, 1995; CAUCHETIER *et al.*, 2003a) e a malária (MOSQUEIRA *et al.*, 2004). Esses estudos têm demonstrado que a utilização de sistemas nanoparticulados permite reduzir a toxicidade do fármaco, como a cardíaca (GRISLAIN *apud* COUVREUR *et al.*, 1991<sup>1</sup>), além de aumentar a sua eficácia

---

<sup>1</sup> GRISLAIN, L.; COUVREUR, P.; LENAERTS, V.; ROLAND, M.; DEPRez-DECAMPENEERE, D.; SPEISER, P. Pharmacokinetics and distribution of biodegradable drug-carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 15, p. 335-345, 1983 *apud* COUVREUR, P.; FATTAL, E.; ANDREMONT, A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. *Pharmaceutical Research*, v. 8, n. 9, 1991.

terapêutica. Desta forma, pode ser formulada a hipótese de que a associação da QN a sistemas nanoestruturados poderia otimizar a terapia desse antimalárico, uma vez que a administração i.v. do fármaco nanoencapsulado conduziria a concentrações esquizonticidas mais elevadas nos eritrócitos, diminuindo a distribuição do fármaco para tecidos não infectados. Por outro lado, valendo-se da característica destes sistemas carreadores de serem captados por células do Sistema Retículo Endotelial (SRE) (SOPPIMATH *et al.*, 2001; OWENS e PEPPAS, 2006), um aumento da penetração do fármaco no fígado, outro órgão-alvo do *Plasmodium*, poderia ser esperado.

A avaliação da eficácia e atividade *in vivo* da QN nanoencapsulada deve ser investigada, em etapa inicial, em modelos animais. Em roedores, o *Plasmodium berghei* provoca o desenvolvimento de patologia semelhante à obtida pelo *P. falciparum* em humanos. Em trabalho anterior realizado no nosso grupo de pesquisa, PEDRONI e colaboradores (2006) propuseram um modelo de infecção de ratos Wistar com *P. berghei* que permite realizar tanto a avaliação da eficácia do fármaco quanto a determinação de sua farmacocinética.

Nesse contexto, este trabalho propõe-se a preparar e avaliar, *in vivo*, nanocápsulas contendo QN, visando aumentar a penetração eritrocitária deste fármaco e, conseqüentemente, melhorar a sua utilização terapêutica.

## **2. OBJETIVOS**

---



## 2.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia *in vivo* e o perfil farmacocinético de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo quinina.

## 2.2 Objetivos específicos

- ◆ Preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) contendo QN, através do método de nanoprecipitação.
- ◆ Preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas de PCL contendo QN e revestidas com quitosana (QTS), através do método de nanoprecipitação.
- ◆ Avaliar a eficácia *in vivo* da QN livre e nanoencapsulada utilizando o modelo de infecção desenvolvido por PEDRONI e colaboradores (2006), para *P. berghei*.
- ◆ Avaliar a farmacocinética da QN livre e nanoencapsulada em animais sadios e infectados por *P. berghei* após administração intravenosa.



### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

---



---

### 3.1 Malária

#### 3.1.1 A malária no mundo

A malária é uma infecção causada pelo protozoário intracelular do gênero *Plasmodium*, que atinge cerca de 40 % da população de mais de 100 países. Hoje, a malária é encontrada em regiões tropicais e subtropicais do mundo e é responsável por cerca de 300 milhões de novos casos e pelo menos um milhão de mortes anualmente (REY, 2001; SUH *et al.*, 2004; OMS, 2005). Noventa por cento das mortes devido a esta doença ocorrem na África, atingindo principalmente crianças. A malária mata uma criança a cada 30 segundos neste continente (OMS, 2005).

O efeito da doença se estende além da quantificação da mortalidade e da morbidade. A doença pode reduzir o desempenho escolar e a produtividade no trabalho e também pode prejudicar o desenvolvimento intelectual (FERNANDO *apud* GREENWOOD *et al.*, 2005)<sup>2</sup>.

A malária, juntamente com a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e a tuberculose, é um dos maiores problemas de saúde pública, dificultando o desenvolvimento de países pobres em todo o mundo (OMS, 2005). O “Relatório sobre a Saúde no Mundo” da Organização Mundial da Saúde (OMS) (1999) reconhece que a malária e o subdesenvolvimento estão intimamente ligados. Cerca de 60 % das mortes associadas à doença ocorre em 20 % dos países mais pobres do mundo (SUH *et al.*, 2004; OMS, 2005). A OMS estima que pelo menos US\$ 3 bilhões por ano são necessários para financiar o controle da malária no mundo, sendo US\$ 2 bilhões para a África e o restante para as demais áreas endêmicas. Estes valores são bastante superiores aos arrecadados anualmente – cerca de 450

---

<sup>2</sup> FERNANDO, S.D.; GUNAWARDENA, D. M.; BANDAR, M.R., et al. The impact of repeated malaria attacks on the school performance of children. *American Journal of Medicine and Hygiene*, v. 69, p. 582-588, 2003, *apud* GREENWOOD, B. M.; BOJANG, K.; WHITTY, J.M.; TARGETT, G.A.T. *Malaria, Lancet*, v. 365, p. 1487-98, 2005.

milhões – pelo fundo global de luta contra SIDA, tuberculose e malária (RUXIN *et al.*, 2005).

Pela importância da doença, esforços para erradicar a malária têm sido realizados em várias partes do mundo. O programa Roll Back Malaria (RBM) é um programa mundial estabelecido pela OMS, UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância) e o Banco Mundial, e conta com a participação de governos, entidades não-governamentais, grupos privados e pesquisadores. Os principais objetivos deste programa são melhorar o acesso da população a um tratamento efetivo, prevenir a malária durante a gravidez, reduzir o contato com o mosquito (pela utilização de inseticidas) e garantir ações de saúde adequadas durante uma epidemia de malária (SUH *et al.*, 2004; OMS, 2005). Para atingir estes objetivos, as estratégias deste programa são: melhorar o nível de informação sobre a doença nas localidades atingidas; disponibilizar um acesso efetivo e de alta qualidade aos medicamentos e promover a qualificação dos profissionais da saúde na prevenção e tratamento da doença (OMS, 2005).

### **3.1.2 A malária na América Latina**

Na América do Sul e Central cerca de 35 % da população residente em 21 países vive em áreas com risco de transmissão da malária, com uma média de 1,3 milhões de casos novos por ano, sendo que 40 % destes casos encontram-se no Brasil (Figura 1) (OPAS, 2002).

Em nosso País, a malária ainda continua sendo um grave problema de Saúde Pública na Região Amazônica, devido à alta incidência e aos efeitos debilitantes para as pessoas acometidas por essa doença, dificultando o desenvolvimento daquela região.

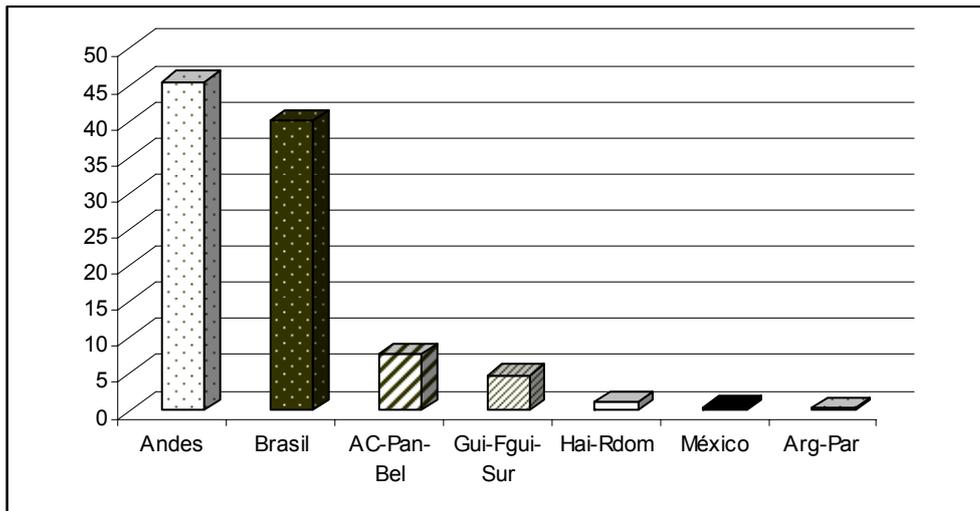


Figura 1. Distribuição dos casos de malária na América do Sul e Central, em 2001. Valores expressos em porcentagem. (Andes: Bolívia, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela; Gui-Fgui-Sur: Guiana, Guiana Francesa e Suriname; Arg-Par: Argentina e Paraguai; Hai-Rdom: Haiti e República Dominicana; AC-PAN-Bel: América Central, Panamá e Belize) (OPAS, 2002).

As espécies que causam a doença, no Brasil, são *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e, eventualmente, *Plasmodium malariae*. A malária é transmitida por vetores, os mosquitos do gênero *Anopheles*, destacando-se pela sua importância o *Anopheles darlingi*. Aproximadamente 99,5 % dos casos de malária no Brasil ocorrem na Amazônia Legal, que é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão. Nos últimos anos, por meio da intensificação das ações de controle da malária no Brasil, têm sido alcançados resultados positivos, provocando a redução do dano produzido por essa doença (SVS/MS, 2003).

Em 2000, deu-se o lançamento, por parte do Ministério da Saúde e Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), de um programa para controlar a malária, o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM) (LOIOLA *et al.*, 2002). Este plano vigorou de 2000-2002, produzindo uma redução de 45 % na incidência da malária na região da Amazônia Legal ao final do ano de 2002, comparando-se com 1999. Neste mesmo período, o número de municípios de alto risco passou de 160 para 76. As internações reduziram em 69,2 % e o número de óbitos por malária diminuiu em 36,5 % (OPAS, 2002; SVS/MS, 2003). No entanto,

a incidência da doença, causada por *P. falciparum*, na região Amazônica ainda é muito elevada (Figura 2) e precisa ser reduzida. O Ministério da Saúde criou, no final de 2002, um programa permanente para prevenção e controle da endemia, chamado de Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) (SVS/MS, 2003). Ao final de 2004, o número de municípios com alto risco de transmissão de malária (onde a Incidência Parasitária Anual (IPA) é acima de 49,9 casos/1.000 habitantes) reduziu cerca de 49 %, de 160 municípios para 81 (SVS/MS, 2005).

Em 2001, a OPAS (Organização Panamericana de Saúde) em iniciativa conjunta com o RBM, propôs o estabelecimento de um programa da Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas (RAVREDA), englobando regiões do Brasil, Colômbia, Guiana, Suriname, Equador e Venezuela, com o objetivo de prover informações sobre a efetividade de fármacos antimaláricos e usar estas informações na tomada de decisões em políticas de utilização destes medicamentos (OPAS, 2002). No Brasil, a RAVREDA instalou e mantém localidades sentinelas em sete dos nove estados da Amazônia Legal, onde o tratamento de pacientes está sendo monitorado para avaliação da eficácia dos medicamentos antimaláricos. Atualmente, estão sendo realizados estudos de resposta terapêutica dos esquemas de primeira linha preconizados pelo Ministério da Saúde tanto para malária *vivax* quanto para malária *falciparum* (SVS/MS, 2005).

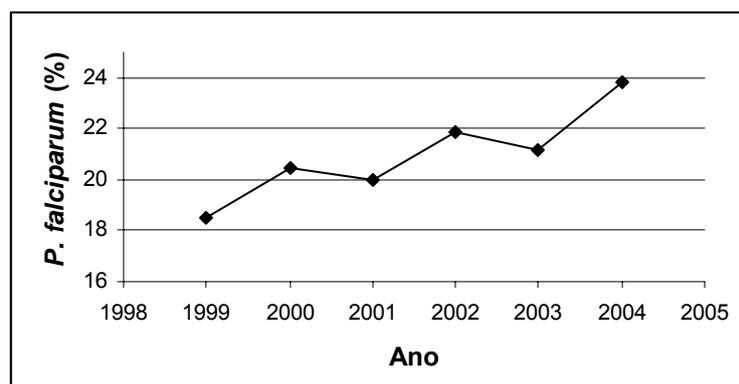


Figura 2. Curva da porcentagem de casos de malária causadas por *P. falciparum* na Amazônia Legal 1999-2004 (SVS/MS, 2005).

Maiores esforços devem ser dirigidos à malária, tanto na sua prevenção como no tratamento, não apenas pela sua alta incidência no Brasil e em muitos outros países em desenvolvimento, como pelos seus efeitos debilitantes, na capacidade

física e intelectual das pessoas infectadas, e letalidade, fatores estes que influenciam negativamente o desenvolvimento das áreas geográficas afetadas pela doença.

### 3.1.3 Ciclo de vida do parasita e patogenia da doença

No hospedeiro vertebrado, o ciclo inicia-se com a picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado com as formas esporozoítas do *Plasmodium*, que então dirigem-se para o fígado, onde se transformam em trofozoítas e, logo a seguir, em esquizontes (Figura 3). Esse estágio tissular assintomático (pré-eritrocítico, exoeritrocítico ou tissular) da infecção dura de 5 a 15 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium* (TRACY & WEBSTER, 2003). Dentro dos hepatócitos, os parasitas da malária se multiplicam rapidamente, de modo que até 30.000 merozoítos são liberados quando o hepatócito se rompe (SAMUELSON, 2000).

Uma vez liberados, os merozoítos de *P. falciparum* ligam-se por uma molécula parasitária semelhante a lectina a resíduos de ácido siálico nas moléculas de glicoforina na superfície dos eritrócitos. Estes ligam-se por uma lectina homóloga aos antígenos *duffy* nas hemácias. Os merozoítos liberam múltiplas proteases de uma organela especial chamada de roptria, permitindo assim a invasão dos eritrócitos e iniciando o ciclo eritrocitário da infecção (REY, 2001).

Dentro dos eritrócitos, os parasitas se multiplicam em um vacúolo digestivo delimitado por membrana, chamado de vacúolo parasitóforo. A hemoglobina é degradada por várias proteases, dentro do vacúolo alimentar. Os resultados da degradação são aminoácidos, os quais são utilizados para sobrevivência da parasita, e o heme, ou ferroprotoporfirina IX, a qual é potencialmente letal para o parasita, sendo necessária a sua neutralização. A ferroprotoporfirina IX é polimerizada, pela heme polimerase, em grânulos insolúveis e não-tóxicos de hemozoína ou pigmento malárico (BRAGA e FONTES, 2000; REY, 2001).

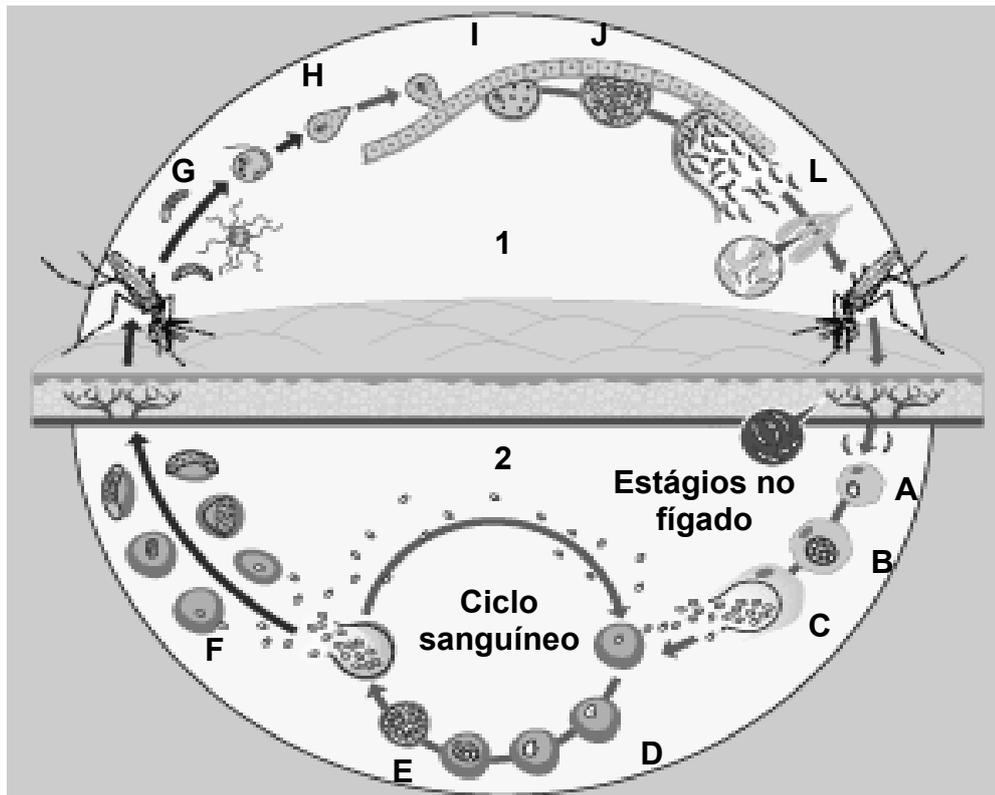


Figura 3. Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. (1) ciclo no mosquito; (2) ciclo no homem. (A) trofozoíta, (B) esquizonte, (C) merozoítos, (D) trofozoíta sanguíneo, (E) esquizonte eritrocítico, (F) gametócitos, (G) gameta, (H) zigoto, (I) oocineto, (J) oocisto, (L) esporozoítos (OMS, 2005).

As hemácias, quando parasitadas por *P. falciparum*, apresentam modificações da superfície, caracterizadas pela formação de protuberâncias ou nós, e estruturas da membrana, que aumentam a adesividade do glóbulo vermelho às células endoteliais (Figura 4). Isso favorece a retenção dessas formas parasitárias nas paredes dos vasos profundos, de pequeno calibre (REY, 2001). Essas moléculas de aderência são chamadas de seqüestrinas e ligam-se ao endotélio através de receptores celulares chamados de ICAM-1 e CD46 (SAMUELSON, 2000). A alta mortalidade e morbidade provocada pelo *P. falciparum* é resultado da adesão ao endotélio das células sanguíneas infectadas (JANDL, 1996).

Alguns merozoítos se diferenciam em formas sexuais conhecidas como gametócitos, sendo estas formas ingeridas pelo anofelino, dando continuidade ao ciclo da malária, no hospedeiro invertebrado.

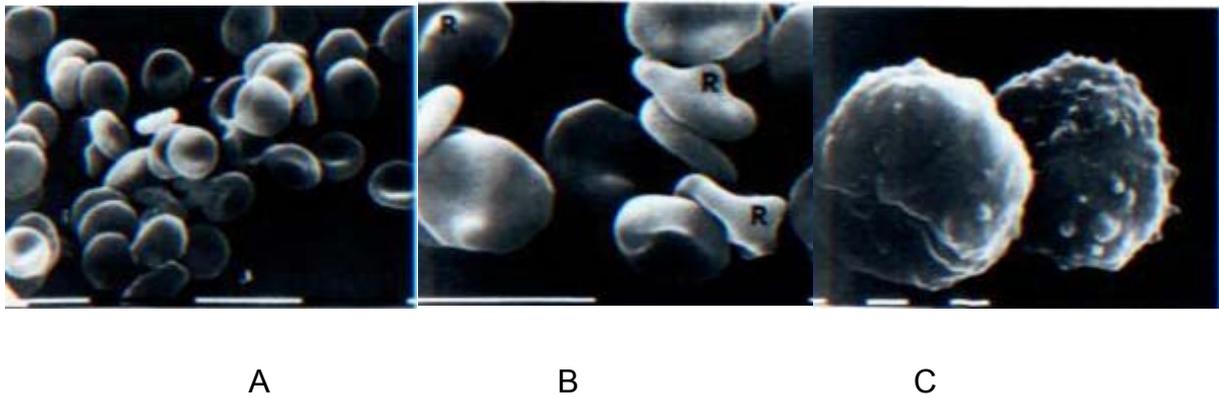


Figura 4. Morfologia dos eritrócitos. (A) células normais, (B) células infectadas com trofozoítos, (C) célula parasitada por esquizonte (JANDL, 1996).

Apenas o ciclo eritrocítico assexuado é responsável pelas manifestações clínicas e patologia da malária. A destruição dos eritrócitos e conseqüente liberação dos parasitas e de seus metabólitos na circulação provocam uma resposta do hospedeiro, determinando as alterações morfológicas e funcionais observadas no indivíduo com malária.

A maioria dos pacientes apresenta febre, calafrios, dor de cabeça e sudorese, características do acesso malárico, devido ao rompimento das hemácias ao final da esquizogonia (BRAGA e FONTES, 2000). Outros sintomas comuns são tonturas, mal-estar, mialgia, dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia e tosse seca (SAMUELSON, 2000; TRAMPUZ *et al.*, 2003).

A malária severa apresenta diferentes manifestações em crianças e adultos. Nestes, edema pulmonar, falência renal, coma, hiperlactatemia são complicações graves e freqüentes, enquanto anemia severa é incomum. Já em crianças, anemia severa, coma e hiperlactatemia são comuns, mas edema pulmonar e falência renal são raros (MILLER *et al.*, 2002; PLANCHE e KRISHNA, 2005).

Ambos, *P. falciparum* e *P. vivax*, podem causar anemia severa, mas somente o primeiro causa complicações como malária cerebral, hipoglicemia, acidose metabólica e síndrome de angústia respiratória do adulto (MILLER *et al.*, 2002).

A anemia é resultado de múltiplos fatores, que podem estar associados ao aumento da destruição de eritrócitos quanto à diminuição na produção destas

células (Tabela 1). Ela contribui para o desenvolvimento de outras complicações, uma vez que a diminuição de eritrócitos circulantes causa hipóxia tecidual.

Tabela 1. Mecanismos que contribuem para a anemia na malária (BJORKMAN, 2002; CHANG e STEVENSON, 2004; LLANOS *et al.*, 2004).

Aumento da destruição de hemácias	Diminuição da produção de hemácias
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diminuição do tempo de vida das células;</li> <li>▪ Eritrofagocitose pelos macrófagos;</li> <li>▪ Hemólise mediada pelo sistema complemento;</li> <li>▪ Diminuição da regulação das proteínas da superfície dos eritrócitos;</li> <li>▪ Deformabilidade diminuída;</li> <li>▪ Externalização de fosfatidilserina na membrana do eritrócito.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Anormalidades morfológicas nas células precursoras;</li> <li>▪ Diseritropoiese;</li> <li>▪ Produção inadequada de reticulócitos;</li> <li>▪ Efeito de toxinas liberadas pelo parasita (hemozoína);</li> <li>▪ Efeito de citocinas inflamatórias (MIF, TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math>, IFN-<math>\alpha</math>, IL-12);</li> <li>▪ Produção inadequada de eritropoietina.</li> </ul>

As alterações metabólicas freqüentes e graves são a hipoglicemia e a acidose láctica. A hipoglicemia é comum em pacientes com malária severa. Pode ser causada por hiperinsulinemia causada por QN ou quinidina, ou ainda pode acontecer em pacientes com níveis normais de insulina (TRAMPUZ *et al.*, 2003). O aumento nos níveis de lactato pode ser conseqüência da anemia, das convulsões, da produção pelos eritrócitos parasitados ou mesmo pela redução do fluxo sanguíneo hepático que ocorre durante a doença (PLANCHE e KRISHNA, 2005).

Em muitas partes do mundo, as disfunções neurológicas são manifestações comuns em malária *falciparum*, sendo a principal causa de morte em adultos com essa doença. A aderência das hemácias parasitadas a outros eritrócitos e ao endotélio microvascular e vênulas pós-capilares do cérebro é facilitada pelas protusões digitiformes e pela presença de antígenos (como o PfEMP-1) que se ligam

a receptores da membrana das células endoteliais. Juntamente com leucócitos e plaquetas, essas hemácias podem concorrer para a obstrução de pequenos vasos e, conseqüentemente, para a anóxia tecidual ou para necroses isquêmicas focais (REY, 2001). A obstrução de vênulas e capilares cerebrais com eritrócitos contendo trofozoítos maduros e esquizontes causa convulsões generalizadas e coma, sendo que a taxa de morte nesses casos varia entre 4-50 % (TRAMPUZ *et al.*, 2003).

A malária, portanto, é uma doença sistêmica que provoca alterações na maioria dos órgãos, variando desde formas benignas até muito graves e fatais. A espécie de plasmódio é um importante determinante do curso da doença, sendo que o *P. falciparum* constitui-se na forma mais ameaçadora à vida.

### **3.1.4 Terapia antimalárica e resistência**

O tratamento da malária visa à interrupção da esquizogonia sangüínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção. Entretanto, pela diversidade do seu ciclo biológico, é também objetivo da terapêutica proporcionar a erradicação das formas latentes do parasita no ciclo tecidual (os hipnozoítas), evitando assim recaídas tardias. A eficácia de um agente terapêutico no tratamento da malária depende das interações entre os parasitas, os fármacos antimaláricos e o hospedeiro humano (KANEKO e NISHIYAMA, 2004; BRAGA e FONTES, 2005).

Nas últimas décadas, o aparecimento e a disseminação de cepas de *P. falciparum* resistentes a maioria dos fármacos antimaláricos disponíveis tem se tornado um problema para o controle e tratamento da doença (Figura 5). Fármacos como a cloroquina e a associação sulfadoxina-pirimetamina, que são acessíveis, de baixo custo e eficazes, estão em desuso em muitos países endêmicos (OMS, 2006). Nenhum antimalárico isoladamente controlou com sucesso a disseminação crescente de cepas resistentes de *P. falciparum* (TRACY e WEBSTER, 2003). Em vez disso, esquemas com vários medicamentos estão sendo discutidos como a estratégia ideal para abordar esse problema (OMS, 2006).

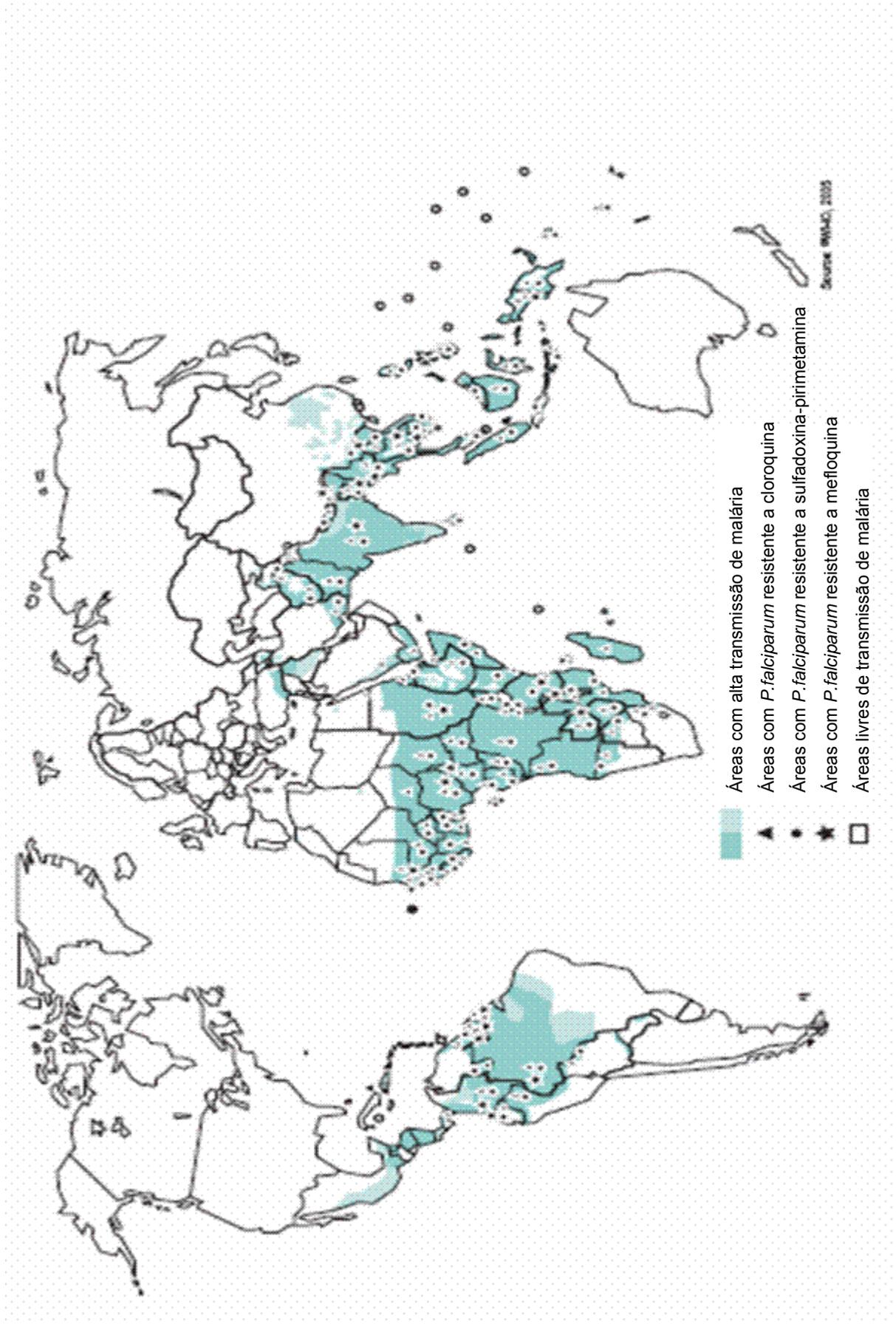


Figura 5. Áreas de transmissão de malária e distribuição da resistência a alguns antimaláricos, setembro de 2004 (OMS, 2006)

A utilização de combinações de fármacos ao invés de monoterapia tem sido preconizada pela OMS, a fim de evitar a disseminação da resistência ao *P. falciparum* e melhorar os resultados clínicos (ASHLEY e WHITE, 2005; GREENWOOD *et al.*; 2005). Combinações de fármacos com tempos de meia vida semelhantes são desejáveis, para não expor o parasita a apenas um agente por um período prolongado. Alguns exemplos de combinações de terapias estão descritas na Tabela 2.

### 3.1.5 Quinina

Dentre os fármacos utilizados na terapia antimalárica, ressalta-se a QN, que é a substância mais ativa dentre os inúmeros alcalóides extraídos da casca de Quina (*Cinchona ledgeriana*) tendo em comum com outros antimaláricos um núcleo quinoleína (REY, 2001). Embora a QN já tenha sido sintetizada, o procedimento é complexo. Desse modo, tanto a QN como os demais alcalóides são ainda obtidos inteiramente de fontes naturais.

A quinina é um fármaco que contém um grupo quinolínicó unido através de uma ligação alcoólica secundária a um anel quinuclidínico. O anel quinolínicó apresenta um grupo metoxi e o quinuclidínico, um grupo vinila (Figura 6). A QN atua como um esquizonticida sangüíneo contra todas as formas de *Plasmodium*. Também é um gametocida para *P. vivax* e *P. malarie*. Trata-se de um fármaco supressor, curando os surtos agudos, sem impedir recaídas (REY, 2001). A utilização da QN é limitada pela sua toxicidade, sendo utilizada para o tratamento de doença grave causada por cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina e outros fármacos (KOROLKOVAS e FRANÇA, 2004).

Tabela 2. Combinação de terapias com fármacos antimaláricos (OMS, 2006)

Combinação	Vantagens	Limitações /Contra-indicações	Sugestões de uso
<b>CQ + SP</b>	- ambos possuem diferentes mecanismos de ação; - nenhuma resistência cruzada documentada; - custo-efetiva.	- não pode ser utilizada em áreas onde há resistência de <i>P. falciparum</i> à CQ.	- em áreas onde é moderada a resistência de <i>falciparum</i> a CQ e onde infecções por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> são comuns.
<b>ATV + Proguanil</b>	- apresentam efeito sinérgico e são bastante eficazes contra <i>P. falciparum</i> , incluindo cepas resistentes a CQ e MQ.	- hipersensibilidade - presença de insuficiência renal - alto custo e menor disponibilidade.	- não recomendada para crianças menores de 11 kg, mulheres grávidas ou amamentando.
<b>QN + Tetraciclina ou Doxiciclina</b>	- a taxa de cura é alta em áreas de <i>falciparum</i> com sensibilidade diminuída a quinina; - a utilização da doxiciclina é preferível à tetraciclina, devido ao regime posológico de uma dose diária.	- combinação pouco utilizada como tratamento de 1ª escolha; - não recomendada para mulheres grávidas ou amamentando e crianças menores de 8 anos.	- recomendada como tratamento de 2º linha
<b>Artesunato + CQ</b>	- nenhuma reação adversa documentada; - boa eficácia.		- combinação não aconselhada para áreas onde existe risco moderado a alto de <i>falciparum</i> resistente a CQ.
<b>Artesunato + AQ</b>	- boa eficácia.		- recomendada para áreas onde a eficácia da CQ já esta comprometida.
<b>Artesunato + SP</b>	- boa eficácia; - bons resultados são alcançados com 3 dias de administração de artesunato.	- o aumento dos níveis de resistência a SP pode limitar a utilização desta associação.	- utilizada em alguns países do leste da África, onde a resistência a SP é baixa.
<b>Artesunato + MQ</b>	- diminuição dos efeitos adversos da MQ em relação à monoterapia.	- dose múltipla - reações adversas severas (efeitos neurológicos e cardíacos)	- combinação não utilizada em áreas em que há relatos de resistência a MQ
<b>Artemeter + lumefantrina</b>	- combinação efetiva e bem tolerada; - nenhuma reação adversa documentada; - aumento da adesão, pois trata-se de uma formulação de dose fixa.	- dose múltipla; - não recomendada para mulheres grávidas ou amamentando	- combinação mais viável para ser utilizada em áreas de intensa transmissão de malária e em populações não-imunes.

CQ: Cloroquina; SP: Sulfadoxina-Pirimetamina; ATV: Atovaquona; MQ: Mefloquina; AQ: Amodiaquina

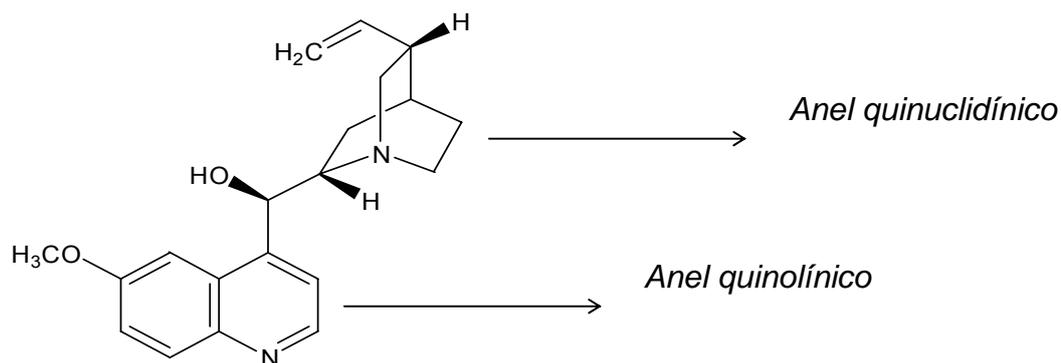


Figura 6. Estrutura química da quinina (SMITH, 2001).

Apesar de seus potenciais efeitos tóxicos, a QN ainda é o protótipo de esquizotocida sangüíneo para o tratamento supressor e de cura da malária *falciparum* resistente à cloroquina e multirresistente. Nos casos graves, o uso imediato de doses de ataque intravenosas do fármaco é essencial e pode salvar a vida de pacientes sem imunidade (TRACY e WEBSTER, 2003).

A quinina esta associada a uma tríade de efeitos tóxicos relacionados com a dose, quando administrada em dose terapêutica plena ou em doses excessivas. Tais efeitos são o cinchonismo, a hipoglicemia e a hipotensão. O cinchonismo consiste em uma síndrome caracterizada pela presença de zumbido, surdez de tons agudos, transtornos visuais, cefaléia, disforia, náuseas, vômitos e hipotensão postural (TRACY e WEBSTER, 2003; TANGE *et al.*, 1997). A hipoglicemia em adultos com malária severa ocorre geralmente após o início do tratamento e é devida à hiperinsulinemia causada pela QN (WHITE *apud* PLANCHE e KRISHNA, 2005<sup>3</sup>). Ainda, o esquema posológico de q8h por 7 dias contribui para diminuir a adesão ao tratamento deste fármaco (RIDLEY, 2002). A QN é considerada relativamente segura na gravidez (KANEKO e NISHIYAMA, 2004).

<sup>3</sup> WHITE, N.J.; WARRELL, D.A, CHANTHAVANICH, P.. Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in *falciparum*. *New England Journal of Medicine*, v. 309, p. 61–66, 1983 *apud* PLANCHE, T.; KRISHNA, S. The relevance of malaria patophysiology to strategies of clinical management. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 18, p. 369-375, 2005.

Tendo em vista estes efeitos tóxicos, muitos autores preconizam o monitoramento dos níveis sanguíneos de QN para pacientes recebendo terapia parenteral (USP, 2004; SUH *et al.*, 2004).

O mecanismo da ação antimalárica da QN ainda não está completamente esclarecido. Em parte, por ser uma base fraca, a QN concentra-se nos vacúolos ácidos alimentares do *P. falciparum*. O fármaco inibe a polimerização não-enzimática de moléculas de heme ao pigmento atóxico hemozoína. Propõe-se que isso ocorra por um processo em 2 etapas pelo qual a quinolina se liga inicialmente ao heme e o complexo heme-fármaco resultante se liga e satura as cadeias poliméricas do heme (SULLIVAN *et al.*, 2002).

A farmacocinética da QN é alterada significativamente pela infecção malárica, sendo que os principais efeitos são a redução do volume aparente de distribuição e do *clearance*. A QN é rapidamente e quase que completamente absorvida no trato gastrointestinal, apresenta ligação às proteínas plasmáticas de 70 % em humanos sadios e eleva-se a 90 % em pacientes com malária. A QN é extensivamente metabolizada pelo fígado e rapidamente excretada, principalmente na urina. A meia vida em indivíduos sadios é em torno de 11 horas, prolongando-se em pacientes com a doença (REYNOLDS, 1999). Os principais trabalhos descritos na literatura sobre a farmacocinética da QN foram sistematizados por PEDRONI (2005) e encontram-se na Tabela 2.

A resistência à QN foi relatada há aproximadamente 100 anos, mas há poucos casos documentados de alta resistência ao fármaco (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002; NEWTON *et al.*, 2006). No sudeste da Ásia e sul da América, existem relatos de declínio da eficácia da QN no tratamento de *P. falciparum* nos últimos 25 anos (ZALIS *et al.*, 1998; FERDIG *et al.*, 2004). No Brasil, entretanto, estudo de LEAL e colaboradores (2003) avaliou a resposta de pacientes com malária severa não-complicada que receberam tratamento com QN associada à doxiciclina, e o alto percentual de sensibilidade observado, de 76,2 %, sem nenhum caso de resistência tipo II ou III, reforçam a eficácia do tratamento com a QN em casos de malária *falciparum* não-complicada no País.

---

### 3.1.6 Alternativas para o tratamento de doenças infecciosas

O espectro de fármacos atualmente disponíveis para o uso na profilaxia e tratamento da malária é limitado. Muitos destes fármacos são os mesmos a 30-50 anos e ainda permanecem na primeira linha de batalha na terapia da doença, mas seus benefícios têm sido comprometidos pela emergência de resistência do parasita. Existem poucos esforços no desenvolvimento de novos agentes antimaláricos devido a dificuldades intrínsecas no desenvolvimento, como o alto custo de prospecção de um novo agente e a população-alvo da doença, localizada em países subdesenvolvidos. Logo, não há interesse em investimento da indústria farmacêutica nestas áreas em virtude da incerteza sobre os retornos financeiros. Assim, tem se buscado otimizar a terapia com os fármacos existentes, como a utilização de combinação de fármacos; o desenvolvimento de análogos dos fármacos já existentes; o uso de compostos originalmente utilizados em outras doenças e o desenvolvimento de vacinas (ROSENTHAL, 2003; GREENWOOD *et al.*, 2005).

Alguns fármacos, originalmente desenvolvidos para outras doenças, podem ser utilizados como reversores de resistência do *P. falciparum* à cloroquina, como, a clorfeniramina, a desipramina, a trifluorperazina e mais notavelmente, o verapamil (ROSENTHAL, 2003). O Verapamil foi capaz de aumentar a ação da cloroquina em cepas resistentes a ela, uma vez que o anti-hipertensivo parece agir competindo com a cloroquina pelo transportador mutante responsável pelo efluxo do antimalárico de dentro do parasita (SCHALKWYK e EGAN, 2006). No entanto, esses quimiossensibilizantes não têm sido utilizados na clínica devido a sua toxicidade.

Atualmente não existem vacinas efetivas contra a malária. Os esforços têm sido dirigidos para o desenvolvimento de uma vacina que seja ativa no estágio pré-eritrocítico, ou seja, prevenir a invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos, ou que destrua os hepatócitos infectados. A vacina denominada RTS,S/AS02A, a qual contém um híbrido de antígenos da superfície dos esporozoítos e do vírus da hepatite B, está sendo testada em humanos. Embora com bons resultados, não foi

Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos relatados na literatura para a quinina em humanos e animais de experimentação sadios e infectados (PEDRONI, 2005).

População	n	Via de administração	Dose	C <sub>máx</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	t <sub>máx</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	Cl (L.h <sup>-1</sup> .kg <sup>-1</sup> )	Vd (L.kg <sup>-1</sup> )	Referência
Voluntários Sadios	-	v.o.	-	-	1,0 - 3,0	11	-	2,0 (Vd <sub>aparente</sub> )	Tracy e Webster, 1996
Voluntários Sadios	8	v.o.	300 mg sal (sulfato)	2,60 ± 0,99	2,0	7,02 ± 1,72	0,15 ± 0,09 (Cl/f) *	1,43 ± 0,78 (Vd <sub>área</sub> )	Roy <i>et al.</i> , 2002
Voluntários Sadios	8	v.o.	600 mg sal (sulfato)	5,0 ± 0,3	2,4 ± 0,9	12,5 ± 3,1	0,096 ± 0,023 (Cl/f)	-	Viriyayudhakorn <i>et al.</i> , 2000
Voluntários Sadios Jovens	12	v.o.	600 mg sal (sulfato)	-	-	10,5 ± 1,6	0,084 (Cl/f)	-	Wanwimolruk <i>et al.</i> , 1991
Voluntários Sadios Idosos	8	v.o.	600 mg sal (sulfato)	-	-	18,4 ± 5,7	0,062 (Cl/f)	-	Wanwimolruk <i>et al.</i> , 1991
Pacientes com Malária Não-Complicada	6	v.o.	10 mg sal/kg (dicloridrato)	5,27 ± 2,45	3,6 ± 2,19	11,73 ± 3,6	0,11 ± 0,04 (Cl/f) *	1,84 ± 0,87	Babalola <i>et al.</i> , 1998
Pacientes com Malária Não-Complicada	11-13	i.v. (infusão de 4 a 8 h)	10 mg sal/kg (dicloridrato)	-	-	16 ± 7,0	0,08 ± 0,03 (Cl <sub>total</sub> ) *	1,67 ± 0,34	White <i>et al.</i> , 1982
Pacientes com Malária Cerebral	18-25	i.v. (infusão de 4 a 8 h)	10 mg sal/kg (dicloridrato)	-	-	18,2 ± 9,7	0,05 ± 0,02 (Cl <sub>total</sub> ) *	1,18 ± 0,37	White <i>et al.</i> , 1982
Pacientes com Malária Cerebral	7	i.v. bolus	4 mg sal/kg (dicloridrato) 1 h após infusão de 3 horas de 16 mg/kg	-	-	-	-	0,17 ± 0,1 (Vd <sub>comp. central</sub> ) 0,74 ± 0,3 (Vd <sub>total</sub> )	Davis <i>et al.</i> , 1988
Ratos Wistar Sadios	6	v.o.	50 mg sal/kg (dicloridrato)	-	1,0	15,9 ± 5,9	1,38 ± 0,65 (Cl/f)	28,9 ± 10,3	Mansor, Ward e Edwards, 1991
Ratos Wistar Sadios	6-7/grupo	i.v. bolus	5, 10, 15 e 20 mg sal/kg (cloridrato)	-	-	-	5 mg/kg: 10,98 ± 0,67 * 10 mg/kg: 8,94 ± 1,02 * 15 mg/kg: 9,24 ± 0,61 * 20 mg/kg: 9,12 ± 1,09 * (Cl <sub>total</sub> )	5 mg/kg: 7,22 ± 0,50 10 mg/kg: 5,11 ± 0,41 15 mg/kg: 6,03 ± 0,28 20 mg/kg: 6,11 ± 0,39 (Vd <sub>ss</sub> )	Watari, Wakamatsu e Kaneniwa, 1989
Ratos Wistar Sadios	6	i.v. bolus	25 mg/kg	-	-	0,8 ± 0,3	6,9 ± 1,6	7,7 ± 3,0	Wanwimolruk <i>et al.</i> , 1993
Camundongos Sadios	8	i.p.	80 mg base/kg (cloridrato)	8,6 (5,0-10,7)	0,25 (0,25-0,5)	1,0 ± 0,3	5,27 ± 1,08 (Cl/f) *	7,34 ± 1,83 (Vd/f) *	Pussard <i>et al.</i> , 2003
Camundongos com Malária Não-Complicada	8	i.p.	80 mg base/kg (cloridrato)	9,1 (6,0-15,0)	0,5 (0,25-0,5)	3,6 ± 1,0	2,54 ± 1,11 (Cl/f) *	7,94 ± 2,25 (Vd/f) *	Pussard <i>et al.</i> , 2003
Camundongos com Malária Grave	8	i.p.	80 mg base/kg (cloridrato)	15,0 (10,0-20,5)	0,38 (0,25-0,5)	3,2 ± 0,6	1,64 ± 0,63 (Cl/f) *	5,61 ± 1,57 (Vd/f) *	Pussard <i>et al.</i> , 2003
Coelhos Sadios	-	i.v.	10 mg/kg	-	-	1,22 ± 0,55	14,36 ± 3,58	14,57 ± 3,58	Hasan <i>et al.</i> , 1990

observada uma imunidade duradoura significativa (ANDERS e SAUL, 2000; BRAGA e FONTE, 2000; GREENWOOD *et al.*, 2005).

Sistemas nanoparticulados, como lipossomas e nanopartículas, têm sido bastante estudados contra infecções intracelulares, pois estes sistemas são capazes de se acumular em tecidos (como o fígado e baço), células (como os macrófagos e células de Kupfer) e organelas (como os lisossomos e fagolisossomos), locais preferenciais de vários parasitas (COUVREUR *et al.*, 1991; PINTO-ALPHANDARY *et al.*, 2000). Em doenças como a tuberculose, leishmaniose, salmonelose, toxoplasmose e malária, estes sistemas têm demonstrado diminuir a toxicidade do fármaco (FATTAL *et al.*, 1989; RODRIGUES *et al.*, 1995; DURAND *et al.*, 1997; MOSQUEIRA *et al.*, 2004) e aumentar a eficácia terapêutica (OWAIS *et al.*, 1995; SORDET *et al.*, 1998; CAUCHETIER *et al.*, 2000; CHIMANUKA *et al.*, 2002; MOSQUEIRA *et al.*, 2004; CAUCHETIER *et al.*, 2003).

### **3.2 Sistemas carreadores de fármacos**

Dentre os sistemas carreadores de fármacos descritos na literatura, os sistemas nanoparticulados têm despertado atenção, devido as suas inúmeras vantagens como vetores, destacando-se, entre eles, os lipossomas e as nanopartículas poliméricas.

Os lipossomas podem ser definidos como vesículas esféricas nas quais uma ou várias membranas lipídicas encapsulam parte do solvente no qual foram preparadas (LASIC, 1998). Esses sistemas apresentam muitas vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais, como proteger o fármaco da degradação, direcionar os fármacos para seus locais de ação e diminuir a toxicidade ou os efeitos adversos dos mesmos. Entretanto, inúmeras desvantagens limitam a utilização de lipossomas, como a baixa eficiência de encapsulação, a rápida difusão de fármacos hidrossolúveis através da bicamada das membranas, a instabilidade das suspensões de lipossomas em fluidos biológicos ou durante estocagem e a dificuldade de ser obtido em escala industrial (FALLOUH *et al.*, 1986; COUVREUR *et al.*, 1991; SOPPIMATH *et al.*, 2001; RAO *et al.*, 2004).

Os lipossomas são carreadores que não são reconhecidos por elementos específicos do organismo e são distribuídos passivamente de acordo com considerações anatômicas e fisiológicas (COUVREUR *et al.*, 2002).

Os sistemas nanoparticulados apresentam diâmetro entre 10 e 1000 nm e potencialmente podem ser utilizados em inúmeras áreas da ciência. Conforme o método utilizado para a preparação, pode-se obter NC, nanoesferas ou nanoemulsões. As NC são sistemas constituídos por um núcleo oleoso envolto por uma camada de polímero e as nanoesferas são sistemas matriciais, não havendo óleo na sua constituição. As nanoemulsões são emulsões submicrômicas (COUVREUR *et al.*, 1991).

Os sistemas nanoparticulados apresentam várias vantagens em relação aos lipossomas, como a maior estabilidade em fluidos biológicos e durante o armazenamento, além do controle da liberação do fármaco e a possibilidade de serem administrados por via oral (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Dentro dos sistemas nanoparticulados, destacam-se as nanocápsulas como foco deste trabalho.

### **3.2.1 Nanocápsulas**

Nanocápsulas são vesículas contendo um núcleo oleoso, envolto por uma membrana de polímero, onde o fármaco pode se encontrar dissolvido no óleo e/ou adsorvido à superfície polimérica.

#### **3.2.1.1 Métodos de preparação de nanocápsulas**

Existem alguns métodos de preparação de NC descritos na literatura. O método de polimerização interfacial consiste em verter, lentamente e sob agitação, uma fase orgânica, composta do monômero, de etanol e de um óleo, completamente solubilizada, sobre uma fase aquosa, composta de água e de um tensoativo não-

iônico (Figura 7A). A formação das NC se dá espontaneamente no meio. Este método apresenta vantagens, como ser de preparação simples, rápida e de fácil transposição industrial. As suspensões são estáveis à temperatura ambiente, podem ser esterilizadas por autoclave, e elevadas taxas de encapsulação podem ser obtidas para fármacos lipofílicos (FALLOUH *et al.*, 1986). Por outro lado, devido a reatividade dos monômeros utilizados, reações químicas entre estes e o fármaco e outros constituintes da preparação podem acontecer, antes ou durante o processo de polimerização (COUVREUR *et al.*, 2002). O método de deposição interfacial de polímero pré-formado foi proposto por FESSI e colaboradores em 1988 e é um protocolo bastante simples de preparação de suspensões de nanopartículas. A fase orgânica contém o fármaco a ser encapsulado, o óleo, o tensoativo de baixo EHL (Equilíbrio hidrófilo-lipófilo) e o polímero, solubilizado em solvente miscível em água. Esta, juntamente com o tensoativo hidrofílico, compõe a fase aquosa. A formação das NC ocorre instantaneamente no momento em que a fase apolar é vertida, através de um funil, sobre a fase aquosa (Figura 7B). Este método apresenta como vantagens o menor diâmetro das nanopartículas obtidas (aproximadamente 200 nm), a monodispersão e a ausência de monômeros residuais (FESSI *et al.*, 1988; COUVREUR *et al.*, 2002).

Em 1998, QUINTANAR-GUERREIRO e colaboradores propuseram um método, também baseado na utilização de polímeros pré-formados, chamado de emulsificação-difusão. Neste, um solvente parcialmente solúvel em água é previamente saturado com a água para garantir um equilíbrio termodinâmico inicial. O polímero, o óleo e o fármaco são solubilizados no solvente saturado em água e então a mistura é emulsificada, sob agitação vigorosa, com a fase aquosa, que contém um tensoativo não-iônico. A adição subsequente de água ao sistema causa a difusão do solvente para a fase externa, resultando na formação das NC. As vantagens deste método em relação aos anteriormente citados são a menor quantidade de solvente orgânico utilizada e a possibilidade de preparação de NC contendo núcleo aquoso (LEGRAND *et al.*, 1999; COUVREUR *et al.*, 2002).

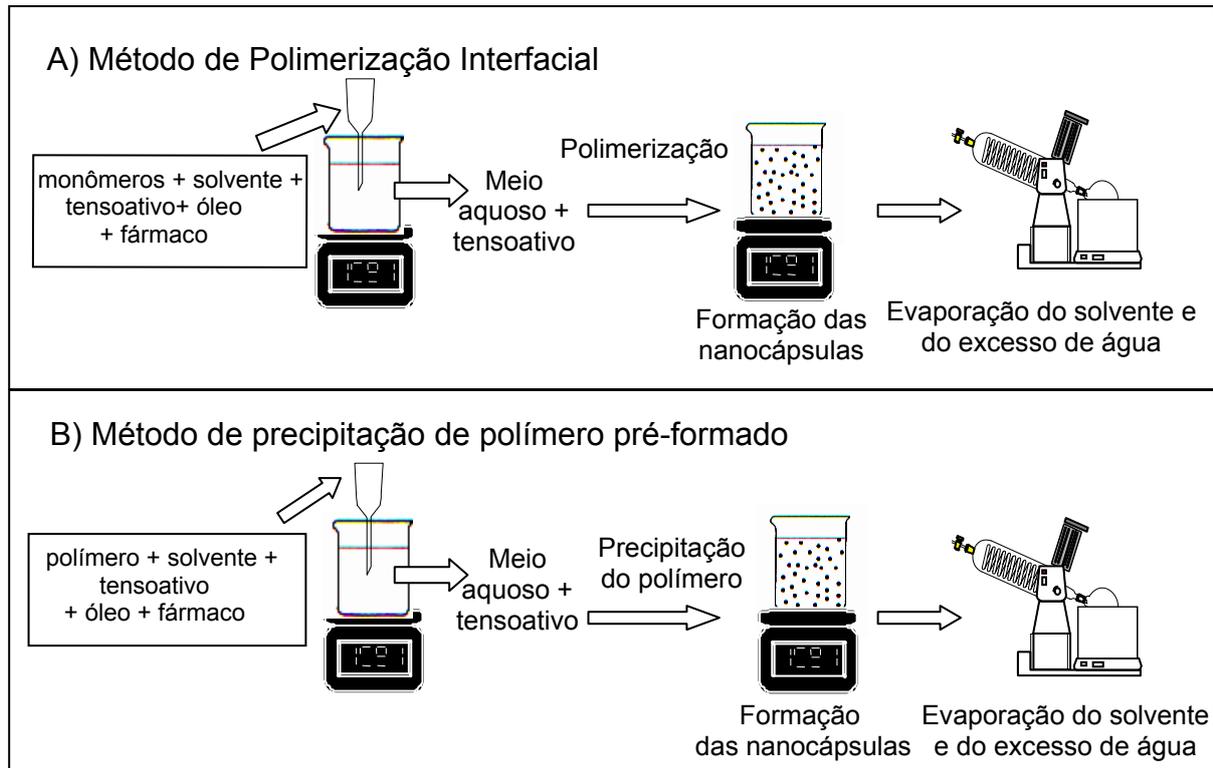


Figura 7. Métodos empregados na preparação de nanopartículas poliméricas. (A) método de polimerização interfacial; (B) método de precipitação de polímero pré-formado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

### 3.2.1.2 Matérias-primas utilizadas na produção de nanocápsulas

A seleção de matérias-primas para a preparação de nanopartículas é um passo importante na elaboração do produto farmacêutico. São inúmeros os fatores que devem ser considerados como a toxicidade das matérias-primas, a via de administração, a biocompatibilidade e a biodegradabilidade dos polímeros.

O polímero pode ser sintético, semi-sintético ou natural, tendo como exemplos: goma arábica, gelatina (natural), etilcelulose, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, ciclodextrinas semi-sintéticas e, como polímeros sintéticos, PCL, poli(alquilcianoacrilato) e poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e copolímeros (poli(ácido láctico-co-glicólico) (COUVREUR *et al.*, 2002; HANS & LOWMAN, 2002). É essencial que o polímero seja biocompatível e biodegradável.

Muitos óleos podem ser utilizados para a preparação de NC, incluindo óleos vegetais ou minerais e substâncias puras como oleato de etila e benzoato de benzila. Os critérios para a seleção do óleo são a ausência de toxicidade, a baixa solubilidade no óleo e vice-versa, a ausência do risco de promover a degradação do polímero e a alta capacidade de dissolver o fármaco desejado (COUVREUR *et al.*, 2002).

São utilizados tensoativos lipofílicos e hidrofílicos na preparação de NC. Estes não são indispensáveis para a formação das nanopartículas, mas são muito importantes para se garantir sua estabilidade durante a estocagem. Como exemplos podem-se citar os tensoativos lipofílicos derivados de lecitina, com baixo conteúdo de fosfolípidios. O tensoativo de alto EHL é geralmente sintético: aniônico (lauril sulfato de sódio), catiônico (sais de amônio quaternário) ou, mais comumente, não-iônico (poli-(oxietileno) e polipropilenoglicol (COUVREUR *et al.*, 2002; HANS & LOWMAN, 2002).

### **3.2.1.3 Caracterização físico-química**

Devido a complexidade dos sistemas coloidais, inúmeras técnicas de caracterização físico-química são necessárias para caracterizar estes sistemas, entre as quais destacam-se a análise morfológica, a distribuição do tamanho de partícula, o pH, o potencial zeta e a eficiência de encapsulação.

#### **3.2.1.3.1 Morfologia**

Existem vários tipos de microscopia eletrônica que podem ser utilizados para se observar a estrutura e a morfologia das NC. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) realizada após criofratura tem fornecido informações muito úteis sobre a estrutura das NC, realçando o envelope polimérico e a cavidade interna, e permitindo estimar a espessura da parede polimérica (COUVREUR *et al.*, 2002).

Esta caracterização permite evidenciar a topografia das nanopartículas, bem como a diferenciação entre NC, nanoesferas e gotas de emulsão (MAGENHEIM e BENITA, 1991).

### **3.2.1.3.2 Distribuição do tamanho de partícula**

A tendência à sedimentação da suspensão coloidal de nanopartículas a longo-prazo e estudos de estabilidade acelerada podem ser monitorados pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas das suspensões coloidais (MAGENHEIN e BENITA, 1991). O tamanho das NC obtidas por polímeros pré-formados é geralmente entre 100 e 500 nm e depende de vários fatores: natureza química e concentração do polímero e fármaco encapsulado, quantidade de tensoativos, concentração de óleo na fase orgânica e velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa (COUVREUR *et al.*, 2002).

As técnicas correntemente utilizadas para medir o diâmetro das partículas são através de microscopia eletrônica (de transmissão e varredura) e espalhamento de luz dinâmico, ou espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Este mede o movimento browniano das partículas em suspensão e o correlaciona com o seu tamanho (MAGENHEIM e BENITA, 1991; BOOTZ *et al.*, 2004).

### **3.2.1.3.3. pH das suspensões**

O pH é um critério importante para avaliação físico-química das suspensões, visto que alterações em seus valores podem estar associados a degradação do polímero ou de outros componentes da formulação, sendo, portanto uma avaliação útil no monitoramento da estabilidade dos produtos obtidos (GUTERRES *et al.*, 1995).

#### **3.2.1.3.4. Determinação do potencial zeta**

O potencial zeta reflete o potencial elétrico das superfícies das partículas, que é influenciado pela carga dos diferentes componentes das NC, como os tensoativos e polímeros (COUVREUR et al., 2002). Lecitinas, poloxamer e polímeros são os componentes que mais afetam este parâmetro. Apesar de muitos polímeros, especialmente os  $\alpha$ -hidróxi-ácidos como o PLA e lecitinas gerarem carga negativa na superfície da partícula, tensoativos não-iônicos como poloxamer tendem a reduzir o valor absoluto do potencial zeta. Valores de potencial zeta acima de 30 mV (positivos ou negativos) indicam suspensões de NC mais estáveis porque a repulsão entre as partículas previne a agregação (COUVREUR et al., 2002; HANS & LOWMAN, 2002). Ainda, o potencial zeta é muito útil para investigar se a substância biologicamente ativa está encapsulada no núcleo da nanoestrutura ou simplesmente adsorvida na superfície (COUVREUR et al., 2002).

CALVO e colaboradores (1997a) prepararam emulsões submicrométricas e NC de PCL, em que a QTS foi incorporada à interface óleo/água para fornecer carga positiva às nanopartículas (+ 37 mV a + 61 mV), objetivando facilitar a interação destas com as membranas biológicas, aumentando a capacidade de transportar fármacos e prevenindo a desestabilização das nanoestruturas devido a adsorção de cátions e proteínas catiônicas presentes nos fluidos biológicos.

#### **3.2.1.3.5 Determinação da quantidade total de fármaco associado**

A taxa de encapsulação descreve a quantidade de fármaco presente no interior/superfície da nanoestrutura em relação ao total de fármaco adicionado para a preparação das mesmas. A avaliação deste parâmetro é fundamental, porém complicada, devido a dificuldade em separar o fármaco livre do associado, em função da natureza coloidal destes sistemas. A técnica de separação mais comumente utilizada é a ultracentrifugação. O fármaco livre é determinado no sobrenadante, enquanto o fármaco total é medido após a dissolução das NP em

solvente apropriado (MAGENHEIM e BENITA, 1991). Além desta técnica, a ultrafiltração-centrifugação ou a ultrafiltração a baixa pressão também têm sido utilizadas para separar o fármaco encapsulado do não encapsulado, permitindo, então calcular a percentagem de encapsulação (LEGRAND *et al.*, 1999).

### 3.2.2 Nanopartículas com superfície modificada

A administração intravenosa de sistemas coloidais possui uma importante limitação: a distribuição limitada em função do reconhecimento que as nanopartículas sofrem pelas células do SRE, que retiram as nanoestruturas da circulação. Entre as células do SRE, as células de Kupffer hepáticas são as mais eficientes na captura de nanopartículas. Recentemente, modificações na superfície das nanopartículas, de natureza hidrofílica, têm buscado resolver essa restrição, tornando as nanopartículas invisíveis (furtivas) frente às células do SRE (MOSQUEIRA *et al.*, 2001; SOPPIMATH *et al.*, 2001; RAO *et al.*, 2004).

A eficiência da modificação da superfície pode ser estimada através da carga de superfície, densidade dos grupos funcionais ou pelo aumento da hidrofília da superfície. Outra técnica que pode ser utilizada é potencial zeta. O  $\zeta$  pode ser positivo ou negativo, dependendo da natureza do polímero ou do material utilizado para o revestimento (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Poli(etileno-glicol) (PEG) é o polímero mais comumente utilizado com a finalidade de modificação da superfície. É um polímero hidrofílico, não-iônico e biocompatível. As moléculas de PEG podem ser associadas às nanopartículas por diferentes métodos, como ligação covalente, mistura durante a preparação das nanopartículas e adsorção à superfície das partículas previamente preparadas (HANS & LOWMAN, 2002). Além de evitar o reconhecimento pelos anticorpos do organismo, a presença de PEG na superfície das nanopartículas aumenta o tempo de residência destas na circulação sistêmica (MOSQUEIRA *et al.*, 2001; HANS & LOWMAN, 2002). O mecanismo pelo qual o PEG obtém esses resultados é através da proteção estérica que confere aos sistemas coloidais. As cadeias de PEG na superfície das nanopartículas são flexíveis, organizando-se em conformação de

nuvem, que evita a interação de outros polímeros com a superfície das partículas. Isso evita a opsonização, diminuindo a adsorção de proteínas à superfície da nanopartículas e o conseqüente processo de fagocitose das mesmas (SOPPIMATH et al., 2001).

MOSQUEIRA e colaboradores (2001) avaliaram a relação entre as características físico-químicas de NC de PLA revestidas com PEG e ativação do sistema complemento avaliado em função da clivagem do componente do sistema complemento C3, além da captação dos sistemas coloidais por macrófagos (células da linhagem J774A1). Os resultados revelaram que a presença de PEG diminui a ativação do sistema complemento e o conseqüente *clearance* plasmático por parte das células do Sistema Retículo Endotelial. Esses resultados são proporcionais ao tamanho da cadeia de PEG e a sua densidade na formulação.

Poloxamer e poloxamines também têm demonstrado reduzir a captação das nanopartículas pelos macrófagos e aumentar o tempo de residência no organismo (HANS & LOWMAN, 2002). Outro polímero utilizado para a modificação de superfície é a QTS (HANS & LOWMAN, 2002). A QTS (Figura 8) é um polissacarídeo em que as unidades de açúcar estão unidas por ligações  $\beta$ -1,4, com alto grau de N-acetilação. Este polímero exibe propriedades biológicas favoráveis como atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioadesividade, sendo bastante útil nas áreas farmacêutica e biomédica (FELT *et al.*, 1998). Em especial, a bioadesividade é uma característica atraente buscando a vetorização celular. A interação eletrostática entre os grupos amino do polissacarídeo e as cargas negativas dos sistemas biológicos favorecem a aderência dos sistemas coloidais às membranas celulares. Além disso, o caráter catiônico evita a adsorção de proteínas catiônicas e íons cálcio presentes nos fluidos biológicos (CALVO *et al.*, 1997a).

Em virtude de suas características, a QTS tem sido estudada como alternativa para a obtenção de um revestimento catiônico para sistemas coloidais. Em 1997(b), CALVO e colaboradores avaliaram a influência de NC de PCL revestidas com o polissacarídeo catiônico QTS ou com o poliaminoácido catiônico poli-L – lisina na penetração de indometacina através da córnea. Somente as NC revestidas com QTS aumentaram a penetração corneal de indometacina em relação aquelas sem

revestimento catiônico ou preparadas com a poli – L – lisina, demonstrando que não foi o caráter catiônico das substâncias, mas a natureza específica da QTS responsável pelo sucesso obtido com o revestimento. Assim, os autores sugerem a combinação de vários efeitos para explicar os resultados observados: a mucoadesão da QTS ao epitélio da córnea; a promoção da abertura das *tight junctions* das células epiteliais e a penetração de partículas nas células corneais, como demonstrado para outros carreadores.

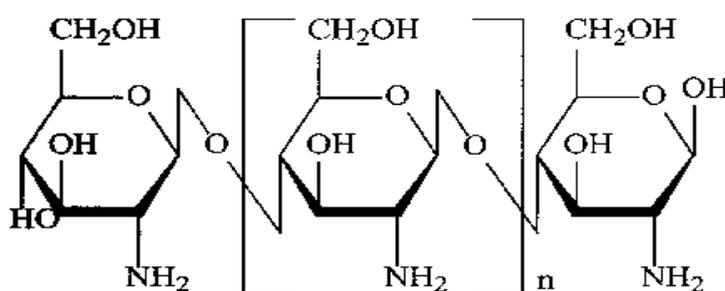


Figura 8. Estrutura da Quitosana (FELT *et al.*, 1998).

A avaliação do revestimento com QTS em diferentes sistemas nanométricos foi realizada por PREGO e colaboradores (2005), utilizando a calcitonina como fármaco modelo. Nanopartículas lipídicas sólidas e NC foram avaliadas em modelo de células CaCo-2 e *in vivo*, em ratos, com o objetivo de estudar a influência das formulações sobre os níveis sanguíneos de cálcio. A presença de QTS modificou a resistência transepitelial e aumentou a captação dos nanossistemas pelas células CaCo-2. *In vivo*, em ratos, as NC revestidas com QTS diminuíram significativamente os níveis plasmáticos de cálcio em relação às outras formulações testadas (solução aquosa de calcitonina e nanoemulsão), com percentual de 27 %, que foi alcançado em 1 hora e sustentado por 24 horas.

Tanto o revestimento de QTS como o de PEG aumentam significativamente a interação dos nanossistemas com a mucosa ocular (CAMPOS *et al.*, 2003). As nanopartículas revestidas com QTS apresentam alta capacidade de associação a

macromoléculas, peptídeos como insulina, toxina tetânica e calcitonina, devido a alta afinidade destas moléculas carregadas negativamente com a estrutura catiônica da QTS.

### 3.2.3 Sistemas nanoparticulados contendo fármacos antimaláricos

Os sistemas nanoparticulados são carreadores estudados em inúmeras infecções intracelulares. As células do SRE são freqüentemente infectadas por parasitas intracelulares. Assim, nanopartículas contendo fármacos antiparasitários são promissoras em atingir estas células infectadas, uma vez que podem penetrar na célula por endocitose (COUVREUR *apud* COUVREUR *et al.*, 1991<sup>4</sup>; RAO *et al.*, 2004). Em geral, a encapsulação mostra uma melhora no índice terapêutico comparado com a formulação contendo o fármaco livre (PINTO-ALPHANDARY *et al.*, 2000). Na Tabela 4, encontram-se mostrados os sistemas coloidais contendo fármacos antimaláricos descritos na literatura, os quais serão comentados a seguir.

---

<sup>4</sup>COUVREUR, P.; TULKENS, P.; ROLAND, M.; TROUET, A.; SPEISER, P. Nanocapsules, a new lysosomotropic carrier. *FEBS Letters*, v. 84, p. 323-326, 1977 *apud* COUVREUR, P.; FATTAL, E.; ANDREMONT, A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. *Pharmaceutical Research*, v. 8, n. 9, p. 1079-1086, 1991.

Tabela 4. Fármacos antimaláricos nanoestruturados utilizados no tratamento da malária e de outras doenças causadas por protozoários.

Fármaco	Protozoário	Sistema	IT*	Referência
Atovaquona	<i>Leishmania infantum</i>	Lipossomas	5	Cauchetier <i>et al.</i> , 2000
	<i>Leishmania infantum</i>	Nanocápsulas	1,6 4,5 <sup>1</sup>	Cauchetier <i>et al.</i> , 2003a
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Nanocápsulas		Dalençon <i>et al.</i> , 1997
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Nanocápsulas		Sordet <i>et al.</i> , 1998
Cloroquina	<i>Plasmodium berghei</i>	Lipossomas		Owais <i>et al.</i> , 1995
Halofantrina	<i>Plasmodium berghei</i>	Nanocápsulas		Mosqueira <i>et al.</i> , 2004
Pentamidina	<i>Leishmania infantum</i>	Nanoesferas	6,25	Durand <i>et al.</i> , 1997
	<i>Leishmania donovani</i>	Nanocápsulas		Heurtault <i>et al.</i> , 2001
Primaquina	<i>Leishmania donovani</i>	Nanoesferas	3,3 <sup>1</sup>	Rodrigues <i>et al.</i> , 1994.
	<i>Leishmania donovani</i>	Nanoesferas		Rodrigues <i>et al.</i> , 1995.
	<i>Leishmania donovani</i>	Nanoesferas		Gaspar <i>et al.</i> , 1992.
Quinina	-	Lipossomas	-	Eytan <i>et al.</i> , 1996. Castaing <i>et al.</i> , 2000. Peri <i>et al.</i> , 2000. Nakamura <i>et al.</i> , 1994.
	<i>Plasmodium chabaudi</i>	Lipossomas		Chimanuka <i>et al.</i> , 2002.

\* IT (Índice terapêutico): dose de fármaco (livre/sistema coloidal) com as quais se obteve os melhores resultados no modelo animal utilizado.

<sup>1</sup> Calculado a partir dos valores de ED<sub>50</sub> do fármaco em solução e em NC.

### 3.2.3.1 Lipossomas

Sistemas coloidais contendo anticorpos anti-eritrócitos na sua superfície e encapsulando fármacos antimaláricos podem ser uma estratégia útil na terapêutica. OWAIS e colaboradores (1995) desenvolveram lipossomas de cloroquina, fármaco

ao qual o *Plasmodium* rapidamente desenvolve resistência, com a superfície ligada covalentemente a anticorpos de membranas de eritrócitos infectados com *P. berghei*, chamados de MAB F<sub>10</sub>, o qual é capaz de reconhecer antígenos específicos da membrana de eritrócitos infectados com *P. berghei*. Os lipossomas MAB F<sub>10</sub> com cloroquina mostraram-se capazes de controlar a infecção não apenas nos camundongos tratados com o parasita sensível à cloroquina, mas também nos infectados com cepa resistente ao fármaco, demonstrando que a eficácia terapêutica da cloroquina pode ser aumentada significativamente pela liberação do fármaco no seu local de ação específico.

CAUCHETIER e colaboradores (2000) avaliaram a eficácia da atovaquona encapsulada em lipossomas. Esta formulação demonstrou, através da relação entre a ED<sub>25</sub>, ser 23 vezes mais efetiva do que uma solução do fármaco livre, quando estas foram testadas em camundongos com leishmaniose visceral (*Leishmania infantum*). A dose de 0,32 mg/kg levou a supressão de 61,6 % das formas parasitárias no fígado, enquanto obteve-se apenas 34,9 % de redução com a maior dose de atovaquona livre utilizada (1,6 mg/kg). Segundo o modelo de Hill, a dose efetiva em que se obteria a supressão total do crescimento das formas amastigotas presentes no fígado e baço dos animais seria de  $1,77 \pm 0,350$  mg/kg de peso corporal, sendo que não foi possível encontrar este resultado com o fármaco não encapsulado.

Lipossomas multilamelares contendo artemeter foram testados em camundongos infectados com *Plasmodium chabaudi* (CHIMANUKA *et al.*, 2002). A parasitemia do grupo tratado com artemeter solubilizado em Mygliol<sup>®</sup> diminuiu rapidamente em relação aos demais grupos, todavia, estes animais morreram devido a recorrência da infecção malárica. No grupo tratado com os lipossomas contendo o fármaco, no entanto, os lipossomas foram mais efetivos no decorrer do tratamento, evitando as recaídas comuns da doença e levando a cura a 100 % dos camundongos tratados com os colóides (Figura 9).

Não existem na literatura trabalhos utilizando lipossomas de QN para avaliar sua atividade anti-malárica. A QN, no entanto, além de suas aplicações na terapêutica da malária, também é utilizada em estudos na área de biofísica. Devido

ao seu caráter fluorescente, é utilizada como marcador, sendo lipossomada com o objetivo de simular o sistema de bicamada lipídica, permitindo estudar interações que possam ocorrer com esse sistema (EYTAN *et al.*, 1996; CASTAING *et al.*, 2000). Ainda, sendo amarga, a QN é utilizada para testar a sensibilidade ao amargo, e, em lipossomas, auxilia em estudos dos sistemas de transdução de sinal que envolve os sabores doce e amargo (NAKAMURA *et al.*, 1994; PERI *et al.*, 2000).

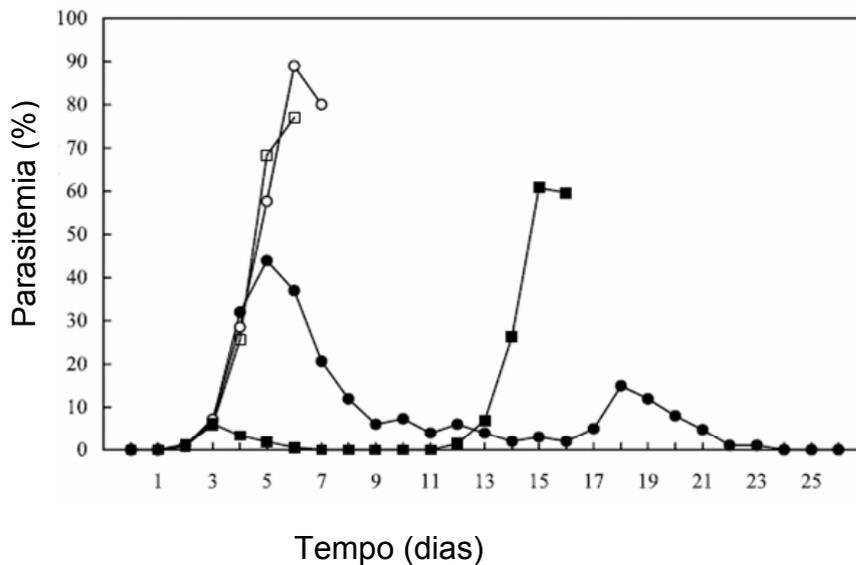


Figura 9. Avaliação da parasitemia após o tratamento de camundongos infectados com *P. chabaudi* tratados com: (●) lipossomas contendo artemeter, (○) lipossomas sem o fármaco, (■) artemeter solubilizado em Mygliol<sup>®</sup>, (□) Mygliol<sup>®</sup>. A administração do fármaco (4,8 mg/kg) ocorreu no 3º dia após a indução da infecção (dia 0) (CHIMANUKA *et al.*, 2002).

### 3.2.3.2 Nanopartículas

Nanopartículas de poli (cianoacrilato de iso-hexila) foram avaliadas usando a linhagem de macrófagos J774G8 infectados com *L. donovani* (GASPAR *et al.*, 1992). O fármaco utilizado neste estudo foi a primaquina. A atividade antileishmaniose das nanopartículas com o fármaco aumentou em 21 vezes a ED<sub>50</sub> em relação primaquina livre. Embora as nanopartículas sem fármaco tenham exibido atividade leishmanicida, as nanopartículas carregadas com o fármaco mostraram efeito sinérgico quando comparadas com a mistura das nanopartículas sem o fármaco e o fármaco livre.

A primaquina tem sido alvo de vários estudos buscando melhorar a sua utilização no tratamento de malária e leishmaniose. Utilizando o modelo de camundongos infectados com *L. donovani*, RODRIGUES e colaboradores (1994) observaram que NC contendo primaquina, preparadas com PLA e administradas através da via i.v., inibiram em 92,5 % o crescimento parasitário no fígado, contra 67,8 % do fármaco livre, na mesma dose (30 mg/kg). Com o auxílio de uma curva dose-resposta, os autores descreveram a ED<sub>50</sub> como de 6,6 e 21,8 mg/kg, para a primaquina livre e nanoencapsulada, respectivamente, sendo, portanto, o fármaco vetorizado, 3,3 vezes mais eficaz do que o fármaco em solução na supressão das formas amastigotas no fígado dos camundongos tratados. Em outro estudo, os autores demonstraram que a dose letal (DL<sub>50</sub>) de primaquina associada a nanopartículas e administrada a camundongos saudáveis e infectados com *L. donovani* foi reduzida pela metade, quando comparada com a solução do fármaco, o que foi atribuída a rápida captação das NC do plasma, pelas células do SRE (RODRIGUES *et al.*, 1995).

Atovaquona e rifanbutina, dois fármacos ativos contra *Toxoplasma gondii*, uma doença oportunista cuja atividade antiparasitária é limitada pela baixa biodisponibilidade dos fármacos, insolúveis em meio aquoso, foram nanoencapsulados por DALENÇON e colaboradores (1997). A suspensão contendo atovaquona mostrou-se mais estável do que a contendo rifanbutina, sendo selecionada para os estudos *in vivo*. Os camundongos infectados com *T. gondii* foram tratados com 15 mg/kg/dia, durante 10 dias com suspensão do fármaco ou com as NC. Cerca de 80 % dos camundongos tratados com as NC se curaram, enquanto nenhum animal sobreviveu ao tratamento com a suspensão de atovaquona. Além disso, não foram observados bradizoítos cerebrais nos camundongos tratados com a suspensão coloidal após 1 mês, enquanto que sinais de infecção cerebral foram notados nos animais tratados somente com o fármaco em suspensão.

SORDET e colaboradores (1998) avaliaram, *in vitro/ in vivo*, a utilização de NC preparadas com atovaquona preparadas com o polímero PLA. A suspensão de atovaquona demonstrou ser ativa, tanto quanto a solução do fármaco, contra taquizoítos de *T. gondii* cultivados em cultura de tecido de fibroblastos MRC. *In vivo*,

na dose 15 mg/kg, o encapsulamento do fármaco mostrou-se bastante eficaz, resultando em 75 % de sobrevivência dos camundongos no modelo experimental de toxoplasmose aguda após 30 dias da infecção, enquanto que os animais que receberam a solução de atovaquona não sobreviveram mais do que 12 dias. Além de negatização da carga parasitária sanguínea e cerebral, o fármaco encapsulado apresentou redução da infecção pulmonar. No modelo de toxoplasmose crônica observou-se diferenças em relação a cepa infectante. As NC contendo atovaquona foram mais efetivas contra a cepa ME49, induzindo uma redução 4 ordens de magnitude na parasitemia cerebral, comparada com uma redução de 1,5 vezes na carga cerebral de camundongos infectados com a cepa COUL. Portanto, as formas nanoparticuladas do fármaco aumentaram a atividade da atovaquona, possivelmente devido ao aumento da biodisponibilidade do fármaco, bastante lipofílico, proporcionado pela solubilização no núcleo oleoso de benzoato de benzila. Posteriormente, GUTERRES e colaboradores (2000) demonstraram que benzoato de benzila é um solvente para os polímeros PCL e PLA. Logo, os sistemas formados utilizando-se PCL ou PLA e benzoato de benzila não seriam NC, mas estruturas micelares.

NC de PLA e PLA-PEG contendo primaquina foram avaliadas frente as formas amastigotas de *Leishmania donovani* presentes em macrófagos isolados de camundongos por HEURTAULT e colaboradores (2001). Durante as primeiras 48 horas após a incubação com macrófagos infectados, as NC de PLA contendo primaquina demonstraram atividade anti-leishmania significativamente superior ao fármaco livre. Após 48 horas, o comportamento do fármaco livre e destas NC foi equivalente. Ressalta-se que no 5º dia de experimento, a formulação NC contendo primaquina preparadas com PLA-PEG evidenciaram atividade significativamente maior do que as demais formulações testadas. Esse efeito retardado demonstrado pelas NC preparadas com PEG é consequência da diminuição da fagocitose destas pelos macrófagos, gerando um aumento da duração do fármaco na corrente circulatória.

A influência de diferentes polímeros na preparação e estabilidade de suspensões de NC contendo atovaquona foi avaliada por CAUCHETIER e colaboradores (2003a). Os polímeros avaliados foram: PCL, PLA e poli(ácido láctico-

co-glicólico). Dentre esses, as NC preparadas com PCL mostraram-se mais estáveis, visto que as suspensões formadas com esse polímero não tiveram perda do fármaco durante os 4 meses do estudo, enquanto que as partículas formadas com PLA tiveram diminuição de 26 % do teor do fármaco e as com poli(ácido láctico-co-glicólico) apresentaram perda de 19 % de atovaquona. As NC preparadas com PLA deste estudo foram submetidas a avaliação biológica em camundongos infectados com  $2.10^7$  formas promastigotas de *L. infantum* (CAUCHETIER *et al.*, 2003b). As NC e o fármaco livre foram 40 % mais efetivos do que o grupo controle negativo na supressão dos parasitas no fígado e baço. A partir de curvas dose-resposta, o maior nível de supressão com as NC seria de  $71,3 \pm 6,4$  % com a dose de 1 mg/kg contra  $34,4 \pm 7,9$  % na dose de 1,6 mg/kg para o fármaco livre. Sobre a dose efetiva média para a supressão dos parasitas no fígado, as nanopartículas contendo atovaquona ( $ED_{50} = 2,5$  mg/kg) mostram-se 4,5 vezes mais efetiva do que a solução do fármaco ( $ED_{50} = 0,56$  mg/kg).

Nanocápsulas preparadas com PLA ou com o copolímero PLA e PEG, contendo halofantrina, foram avaliadas quanto a sua eficácia e farmacocinética em camundongos infectados com *P. berghei* (MOSQUEIRA *et al.*, 2004). Ambas as formulações de NC modificaram o *clearance* plasmático da halofantrina quando comparado com a solução do fármaco, e esta diferença foi mantida por um longo período (superior a 70 horas após a administração do fármaco), sendo que é esperado que as NC permaneçam por mais tempo na circulação (Tabela 5). As NC aumentaram a  $ASC_{\text{halofantrina}}$  em mais de 6 vezes, em comparação com a solução do fármaco. Em relação ao efeito farmacológico destas formulações, as NC preparadas somente com PLA foram capazes de reduzir a parasitemia mais rapidamente do que as formulações preparadas com o copolímero PLA e PEG, mas estas sustentaram a diminuição da parasitemia por mais tempo (Figura 10). Esses resultados podem ser atribuídos, segundo os autores, a liberação retardada do fármaco em formulações contendo PEG.

Tabela 5. Parâmetros farmacocinéticos da halofantrina calculados após a administração i.v. do fármaco.

Formulação	ASC <sub>0,5-70</sub> (µg.h/ml)	Clearance (ml/h)	MRT <sub>0,5-70</sub> (h)
Solução	1,91	13,09	24,4
NC-PLA *	12,00	2,08	16,8
NC-PLA-PEG **	11,80	2,11	22,4

\* nanocápsulas preparadas com PLA

\*\* nanocápsulas preparadas com o copolímero de PLA e PEG

Nanopartículas de metacrilato contendo pentamidina, um antimônio pentavalente, foram avaliadas em um modelo de leishmaniose visceral, induzida por *L. infantum* em camundongos. A dose de 0,24 mg/kg de nanopartículas de pentamidina resultou em  $63,7 \pm 2,18$  % de supressão parasitária, similar ao valor obtido pelo fármaco livre ( $57,7 \pm 2,06$  %), na dose de 2,28 mg/kg). A ED<sub>50</sub>, calculada através do modelo de Michaelis-Menten, foi de 0,17 e 1,06 mg/kg para a pentamidina nanoparticulada e na forma de isotionato. Logo, estes sistemas coloidais contendo pentamidina foram 6,25 vezes mais efetivos do que a sua solução, além de diminuir a toxicidade do fármaco no tratamento da leishmaniose (DURAND *et al.*, 1997).

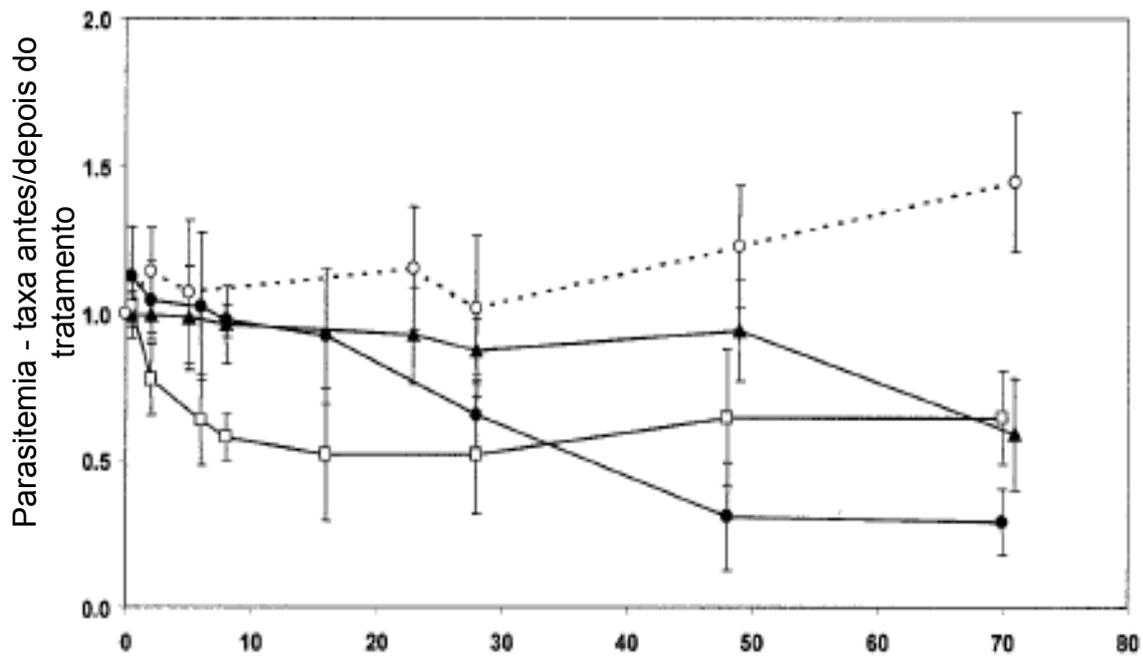


Figura 10. Avaliação da parasitemia de camundongos infectados com *P. berghei* após a administração de halofantrina (1 mg/kg). (-▲-) solução de halofantrina; (-□-) NC preparadas com PLA; (-●-) NC preparadas com PLA e PEG; (-○-) controle (MOSQUEIRA *et al.*; 2004).

Conforme o exposto, vários fármacos antimaláricos têm sido alvos de estudos com sistemas nanoparticulados devido às potencialidades terapêuticas destes sistemas. Embora a QN tenha sido incorporada em lipossomas, não existe nenhum relato na literatura a respeito de NC poliméricas contendo este fármaco antimalárico.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---



#### 4.1 Solventes e reagentes

- Acetonitrila (grau CLAE) (Tedia Brazil);
- Metanol (grau analítico, p.a.) (Quimex);
- Acetona (grau analítico, p.a.) (Quimex);
- Ácido fosfórico (Merck®);
- Ácido tricloroacético (Merck®);
- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli-Q®);
- Água tamponada (NEVES, 2000):
  - A) Fosfato de sódio bibásico (QM®, ACS).....11,866 g
  - B) Fosfato de potássio monobásico (Nuclear®).....9,073 g

Proporção: 72,5 mL da solução A e 27,5 mL da solução B

- Epikuron 170<sup>®</sup> (Lucas Meyer<sup>®</sup>)
- Éter etílico (Nuclear<sup>®</sup>);
- Giemsa (Merck<sup>®</sup>);
- Heparina sódica 5.000 UI/mL (Liquemine<sup>®</sup>, Roche<sup>®</sup>);
- Miglyol 810<sup>®</sup> (Brasquin);
- Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)  $M_w = 65000$  (Aldrich<sup>®</sup>);
- Polissorbato 80<sup>®</sup> (Delaware);
- Quinina (base) 90 % (Aldrich<sup>®</sup>);
- Quitosana (Polymar<sup>®</sup>)

- Tetrahidrofurano p.a. (Merck®);
- Trietilamina p.a. (Merck®).

#### 4.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos Mod. 251 Fanem®;
- Agitador magnético Fisatom®;
- Balança analítica Mettler® Toledo AB 204;
- Banho de ultrassom (Transsonic 460, Elma®);
- Bomba de vácuo Primar, tipo 2VC, modelo 141V-500 (Büchi Vac®);
- Centrífuga refrigerada 5417 R Eppendorf®;
- Centrífuga refrigerada Sigma® 4K15;
- Estufa termostatizada WTB® blinder;
- Evaporador rotatório R-124 (Büchi®);
- Potenciômetro DM-20 (Digimed®);
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Shimadzu® composto de: bomba LC-10ADVP, controlador de Sistema SCL-10AVP, autoinjeter SIL-10ADVP, degaseificador DGU-14<sup>a</sup>, software Shimadzu CLASS-VP (Versão 6.12), detector de fluorescência RF-10AXL.
- Zetasizer® nano- ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA;
- Coluna cromatográfica  $\mu$ Bondapak™ C18 (125 Å; 10 $\mu$ m; 3,9 x 300 mm (Waters®);

- Pré-coluna com material de enchimento  $\mu$ Bondapak<sup>™</sup> C18/Corasil (37-50  $\mu$ m, Waters<sup>®</sup>);
- Câmara de Neubauer (Herka<sup>®</sup>);
- Filtros ultrafree<sup>®</sup> - GPMC 10,000NMWL Filter Unit, Millipore;
- Membranas de filtração hidrofílica HV em PVDF de 0,45  $\mu$ m de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>);
- Programa Excel<sup>®</sup> v. 7.0 2003 (Microsoft<sup>®</sup> – USA);
- Programa Scientist v. 2.01 (MicroMath<sup>®</sup>, Salt Lake City, Utah, USA)
- Programa SigmaStat<sup>®</sup> v. 3.5 (Microsoft<sup>®</sup> – USA).

### 4.3 Metodologia

#### 4.3.1 Purificação da quitosana

Dois gramas de QTS foram solubilizadas, durante 24 horas, em uma solução aquosa de ácido acético 2 %. Após, a solução foi filtrada sob vácuo, em papel filtro comum, e o filtrado foi precipitado, através da adição de NaOH 10 %, até a obtenção de pH 14. A QTS precipitada foi filtrada em vidro sinterizado (G3), lavada com água Milli-Q<sup>®</sup> e soluções crescentes de etanol em água. Os aglomerados foram secos em dessecador com silicagel (Merck<sup>®</sup>) (SEBBEN *et al.*, 2004, adaptado).

### 4.3.2 Preparação das suspensões de nanocápsulas contendo quinina

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas conforme o método descrito por Fessi e colaboradores (1988), denominado de deposição interfacial de polímero pré-formado. A fase orgânica composta pelo polímero, fármaco na sua forma básica, tensoativo de baixo EHL, óleo e acetona foi solubilizada em banho-maria e sob aquecimento moderado (37 a 40°C), até completa dissolução dos constituintes. Após, esta fase foi vertida, através de um funil, sob uma solução de tensoativo de alto EHL em água. Após 10 minutos de agitação, a suspensão foi colocada, dentro de um balão evaporador âmbar e concentrada em evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e ajuste final da concentração do fármaco. Foram preparadas formulações com diferentes concentrações de fármaco: 2 (NC2-QN), 3 (NC3-QN) e 4 mg/mL (NC4-QN) (Tabela 6). Suspensões sem o fármaco (NC-Br), também foram preparadas da mesma maneira. Todas as formulações preparadas foram caracterizadas segundo o item 4.3.5 nos dias 1, 4, 7, 14, 21 e 30 após a preparação das NC. As formulações, em triplicata, foram mantidas acondicionadas em tubos plásticos, protegidos da luz, na temperatura de  $20 \pm 5$  °C. As alíquotas para avaliação foram retiradas cuidadosamente, sem agitação prévia da formulação.

Tabela 6. Composição quali-quantitativa das formulações de NC avaliadas.

<b>Constituintes *</b>	<b>NC2-QN</b>	<b>NC3-QN</b>	<b>NC4-QN</b>	<b>NC-Br</b>
<b>Fase orgânica</b>				
Quinina (mg)	20,0	30,0	40,0	-
PCL (mg)	100,0	100,0	100,0	100,0
Miglyol 810 <sup>®</sup> (µl)	330,0	330,0	330,0	330,0
Epikuron170 <sup>®</sup> (mg)	76,6	76,6	76,6	76,6
Acetona (mL)	23,8	23,8	23,8	23,8
<b>Fase aquosa</b>				
Tween 80 <sup>®</sup> (mg)	76,6	76,6	76,6	76,6
Água destilada (mL)	56,6	56,6	56,6	56,6

\* Volume final de 10 mL.

NC2-QN: nanocápsulas contendo 2 mg/mL de QN.

NC3-QN: nanocápsulas contendo 3 mg/mL de QN.

NC4-QN: nanocápsulas contendo 4 mg/mL de QN.

NC-Br: nanocápsulas sem fármaco.

#### 4.3.3 Preparação das suspensões de nanocápsulas de quinina revestidas com quitosana

As nanocápsulas contendo 4 mg/mL de QN foram preparadas conforme o método descrito no item 4.3.2. Para o revestimento com QTS, uma alíquota da solução aquosa do polímero purificado contendo 0,2 % de ácido acético foi adicionada na suspensão já preparada, a fim de se obter uma concentração final de 0,15 % de QTS. A suspensão foi, então, incubada, durante uma hora, sob agitação. Essa formulação foi caracterizada 1 e 4 dias após a sua preparação segundo os parâmetros descritos no item 4.3.5. Paralelamente, uma formulação sem fármaco, as NC-QTS-Br foi preparada.

#### **4.3.4 Preparação das suspensões de nanocápsulas mistas**

A formulação de NC mista foi preparada pela adição de QN a uma solução de NC previamente preparada. A uma suspensão de NC de 2 mg/mL de QN foi adicionado o cloridrato do fármaco a fim de se obter uma concentração final de 4 mg/mL. A adição foi seguida de agitação por 15 minutos.

#### **4.3.5 Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo quinina**

As suspensões coloidais foram caracterizadas de acordo com pH, diâmetro de partícula, polidispersão, potencial zeta, taxa de associação e doseamento de QN.

##### **4.3.5.1 Determinação do pH**

A determinação do pH das suspensões de NC foi realizada logo após a preparação das mesmas com o auxílio de um potenciômetro previamente calibrado, com padrões pH 4,0 e 7,0. Os resultados representam a média de 3 determinações.

##### **4.3.5.2 Determinação do diâmetro de partícula**

O diâmetro das nanopartículas em suspensão foi determinada através de espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons) (Zetasizer<sup>®</sup>), sendo as amostras observadas em dispositivos de poliestireno (DTS0012). As amostras foram diluídas em água ultrapura e filtradas com auxílio de um dispositivo de filtração de 0,22  $\mu\text{m}$ . O diâmetro das partículas foi expresso em nanômetros.

#### 4.3.5.3 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das suspensões de NC foi determinado através de Zetasizer<sup>®</sup>. As amostras foram diluídas em água Milli-Q<sup>®</sup> contendo 1 mM de cloreto de sódio, filtradas (0,22  $\mu\text{m}$ ) e as leituras, em triplicata, foram realizadas em células capilares fechadas (DTS1060). O potencial zeta foi expresso em mV (milivolts).

#### 4.3.5.4 Determinação do teor e da taxa de encapsulação da quinina nas nanocápsulas

Para a determinação do teor, ou taxa de recuperação do fármaco, as suspensões foram tratadas com acetonitrila, o que gerou a dissolução dos componentes das NC. A medida da quantidade total de QN foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em metodologia adaptada e validada a partir de PEDRONI (2005), segundo o item 4.3.6. O teor foi expresso em percentagem. As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 7. Os experimentos foram realizados em triplicata. A retenção de QN á membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  foi de  $8,23 \pm 0,53 \%$ .

Tabela 7. Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da QN em NC.

<b>Característica</b>	<b>Descrição</b>
Coluna	Waters $\mu$ Bondapak C18 (125 A 10 $\mu\text{m}$ ) 3,9 x 300 mm
Pré-coluna	Waters $\mu$ Bondapak C18 (37-50 $\mu\text{m}$ )
Fluxo	1 mL/min
Volume de injeção	50 $\mu\text{L}$
Detecção	Fluorescência, $\lambda_{\text{excitação}}$ (350 nm), $\lambda_{\text{emissão}}$ (450 nm). Sensibilidade baixa, ganho 4 vezes, resposta 3.
Fase móvel	Acetonitrila /ácido fosfórico 1M /tetrahidrofurano /trietilamina (46:3: 2:1: 0,8) (v/v), $\text{pH}_{\text{aparente}} = 2,7$ , ajustado com ácido fosfórico concentrado.

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

#### **4.3.6 Validação de método analítico para o doseamento de quinina nas nanocápsulas**

A validação obedeceu aos critérios estabelecidos pela International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH, 1996) e da Resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que disponibiliza o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (BRASIL, 2003). Linearidade, exatidão e precisão foram determinadas.

Para a avaliação da linearidade, as seguintes concentrações, a partir de uma mesma solução-mãe, foram preparadas: 1, 2,5, 5, 7,5, 10 e 12,5 µg/mL. Foram preparadas 3 curvas-padrão com esses níveis de concentrações. A partir de cada curva, foram determinados, com auxílio do programa Excel, o coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, o coeficiente angular, a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e pelo coeficiente de variação percentual (CV %).

A precisão foi avaliada ao nível de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas). Para essas determinações, 6

soluções-amostra diferentes de 5 µg/mL foram preparadas e injetadas, em triplicata, durante 3 dias. Foram determinados os DP e os coeficientes de variação (CV %) intra-dia e inter-dia.

A uma solução de 5 µg/mL obtida a partir de uma suspensão de NC, foi adicionada uma quantidade conhecida de QN, sendo de 20, 40 ou 60 % do valor teórico da solução-amostra. A partir da recuperação do fármaco, foi calculada a exatidão do método, expresso em termos de percentagem de recuperação. Os resultados encontram-se expressos no Anexo 1.

#### **4.3.7 Avaliação biológica das nanocápsulas de quinina**

##### **4.3.7.1 Animais**

Os ratos Wistar machos, com peso entre 90-110 g, foram obtidos da FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde) e do Biotério central da UFRGS. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com livre acesso à água potável e ração padronizada e com ciclo de luminosidade de 12 horas (7:00 – 19:00), temperatura média de 22 ± 2°C e umidade aproximada de 60 %. Após a inoculação com *P. berghei*, os animais foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal, anexo do Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia (UFRGS). Camundongos fêmeas (20-25 g), nas quais a cepa de *P. berghei* foi mantida antes do repasse para os ratos, foram mantidas nas mesmas condições que os demais animais.

Após a experimentação, todos os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. Os mesmos foram acondicionados em sacos plásticos brancos apropriados e depositados em freezer especial da Faculdade até serem recolhidos pelo Serviço de Coleta Especial da Prefeitura Municipal de Porto Alegre.

As normas do Conselho Canadense de Proteção aos Animais foram seguidas, de acordo com as condições laboratoriais (CCAC, 1993). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (Anexo 2).

#### **4.3.7.2 Infecção experimental**

##### **4.3.7.2.1 Manutenção da cepa**

Neste trabalho, foi utilizada a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* originalmente fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro – RJ). A cepa foi mantida *in vivo*, por meio da inoculação em camundongos fêmeas com sangue infectado através de passagens semanais. Estes animais infectados foram os doadores de eritrócitos parasitados para a infecção dos ratos.

##### **4.3.7.2.2 Preparação do inóculo**

O inóculo consistiu de 10<sup>8</sup> hemácias parasitadas com *P. berghei* obtidos dos camundongos doadores. Uma amostra de 5 µL de sangue destes animais, retirada da porção terminal da cauda, foi diluída 1000 vezes em água tamponada e, então, o número total de glóbulos vermelhos foi quantificado em Câmara de Neubauer (WAYNFORTH e FLECKNELL, 1992). A partir do número total de hemácias infectadas/mL de sangue do camundongo (THP), o qual foi determinado pela Equação 1, foi calculado o volume de sangue que seria necessário coletar para se obter o inóculo inicial em 0,4 mL de suspensão. O sangue foi retirado através de punção cardíaca, com o animal previamente anestesiado com éter etílico.

$$\text{THP} = \frac{\text{número de hemácias} \times \text{parasitemia}}{100}$$

1

#### 4.3.7.2.3 Indução e monitoramento da infecção

Ratos de 5 semanas (90-110 g) foram infectados com 400  $\mu\text{L}$  de suspensão do sangue infectado dos camundongos fêmeas através da via intravenosa, com um inóculo de  $10^8$  hemácias parasitadas no dia 0 da infecção (PEDRONI *et al.*, 2006).

O processo infeccioso induzido nos ratos foi acompanhado pela determinação da parasitemia por hemoscopia, através de esfregaço em camada delgada de sangue coletado da porção terminal da cauda dos animais, fixado com metanol e corado com Giemsa (WILCOX, 1960). A parasitemia foi determinada pelo quociente entre o número de hemácias infectadas e totais, expresso em percentagem de hemácias parasitadas, após contagem de 500 a 1000 eritrócitos. A visualização das formas parasitadas foi realizada em microscópio ótico, com objetiva de 100 vezes, com auxílio de óleo de imersão.

#### 4.3.7.3 Avaliação da eficácia das nanocápsulas contendo quinina

Este estudo visou selecionar uma dose efetiva de suspensão de NC contendo QN para, então, realizar-se os experimentos farmacocinéticos. Foram testadas diferentes doses de QN livre e nanoencapsulada após a administração i.v. bolus, infusão contínua (IC) ou intraperitoneal (i.p.). O protocolo de infecção utilizado foi o descrito no item 4.3.7.2. Após a infecção, os animais foram tratados com as diferentes posologias das formulações investigadas, sempre nos dias 7 a 9 pós-infecção, conforme protocolo estabelecido previamente (PEDRONI *et al.*, 2006). As formulações sem fármaco foram administradas na dose de 0,6 g de PCL/kg/dia. Para a administração, sempre foi utilizada uma suspensão de NC contendo fármaco

recém preparada. A solução de QN livre foi preparada com o fármaco na forma de cloridrato, tendo sua massa corrigida em relação à base.

Paralelo a cada bateria de experimentos, um controle negativo, ou seja, um animal sem tratamento, foi acompanhado.

#### 4.3.7.3.1 Nanocápsulas revestidas com quitosana contendo 4 mg/mL de quinina

As NC revestidas com QTS foram testadas na dose de 50 mg/kg/dia, q12h, sendo a administração realizada através de infusão contínua (IC) (Figura 11), com um fluxo de 0,4 mg/min. A infusão foi realizada na veia caudal lateral. Foram avaliados 7 animais.

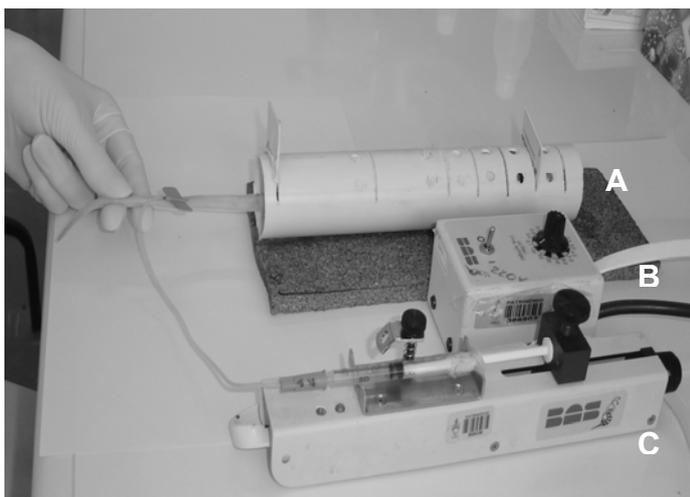


Figura 11. Esquema da administração do fármaco através de infusão contínua. (A) caixa de contenção para o rato. (B) sistema de regulação do fluxo. (C) bomba de infusão.

#### 4.3.7.3.2 Nanocápsulas contendo 4 mg/mL de quinina

As nanocápsulas com concentração final de 4 mg/mL foram avaliadas através da via intravenosa, na forma de infusão contínua ou i.v. bolus (Tabela 8). As doses foram administradas na veia caudal lateral.

Tabela 8. Doses, intervalos entre-doses, forma de administração intravenosa e tamanho amostral dos grupos tratados com NC4-QN e QN livre.

	<b>Dose (mg/kg/dia)</b>	<b>Intervalo entre-doses</b>	<b>Via de administração</b>	<b>Tamanho amostral *</b>
<b>QN livre</b>	50	12/12	IC	6
	70	12/12	IC	5
	100	12/12	IC	5
<b>NC4-QN</b>	30	8/8	<i>I.v. bolus</i>	4
	50	12/12	IC	5
<b>Controle negativo</b>	salina	12/12	<i>I.v. bolus</i>	2

i.v. = intravenoso; IC = infusão contínua;

\* O tamanho amostral relatado refere-se ao número de animais que terminaram o tratamento. O tamanho amostral inicial foi maior em todos os grupos, exceto o controle.

#### 4.3.7.3.3 Nanocápsulas mistas contendo 4 mg/mL de quinina

As nanocápsulas mistas foram administradas através da via i.v nas doses de 30 e 60 mg/kg/dia, a cada 8 horas. Foram utilizados 6 animais por grupo.

#### 4.3.7.3.4 Nanocápsulas contendo 3 mg/mL de quinina

As suspensões contendo 3 mg/mL de QN foram administradas segundo os grupos descritos na Tabela 9, com intervalos de 12 horas.

Tabela 9. Doses, via de administração e tamanho amostral dos grupos tratados com de NC3-QN e QN livre.

	<b>Dose (mg/kg/dia)</b>	<b>Via de administração</b>	<b>Tamanho amostral *</b>
<b>QN livre</b>	100	i.p.	3
	150	i.p.	4
<b>NC3-QN</b>	30	IC	2
	40	IC	2
	70	i.p.	7
	100	i.p.	9
<b>Controle negativo</b>	salina	IC	1
		i.p.	1
	NC-Br	i.p.	4

IC = infusão contínua; i.p. = intraperitoneal

\* O tamanho amostral relatado refere-se ao número de animais que terminaram o tratamento. O tamanho amostral inicial foi maior em todos os grupos, exceto o controle.

#### 4.3.7.3.5 Nanocápsulas contendo 2 mg/mL de quinina

As nanocápsulas com menor concentração de fármaco que foram testadas neste estudo foram de 2 mg/mL de QN. Seguindo o protocolo descrito anteriormente, o fármaco, como base livre ou em NC foi avaliado nas doses descritas na Tabela 10, através da administração intravenosa *i.v. bolus*, com intervalo entre doses de 8 horas.

Tabela 10. Grupos avaliados no estabelecimento da dose efetiva de QN livre e nanoencapsulada (2 mg/mL) (n = 7/ grupo).

QN livre (mg/kg/dia)	NC2-QN (mg/kg/dia)	Controles-negativos
30	30	Salina
75	60	NC-Br
105	75	

#### 4.3.7.4 Experimentos farmacocinéticos

Os experimentos farmacocinéticos foram conduzidos com a dose que apresentou melhor efeito no estudo das diferentes formulações de NC investigadas, utilizando animais sadios e infectados com baixa parasitemia. Em torno de 7-9 dias após a infecção, as suspensões e a QN livre foram administradas pela via intravenosa i.v. *bolus*, através da veia caudal do animal, na dose de 25 mg/kg. As coletas de sangue após a administração foram realizadas nos tempos 0,17, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 e 8 horas através da veia caudal lateral, com o auxílio de um *butterfly*. O sangue foi acondicionado em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, previamente heparinizados, seguindo de centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente (25 °C) a fim de separar o plasma. Posteriormente, as amostras de plasma foram congeladas a -20 °C até o doseamento por CLAE. Foram utilizados 5 a 10 animais por grupo. A significância entre os grupos foi avaliada através do teste ANOVA de duas vias, teste Tukey,  $\alpha = 0,05$ , para os parâmetros  $t_{1/2}$ ,  $CL_{total}$ ,  $Vd_{ss}$ ,  $ASC_{0-\infty}$  e MRT.

Os perfis farmacocinéticos plasmáticos da QN livre e nanoencapsulada foram analisados por abordagem não-compartimental (GIBALDI E PERRIER, 1982), utilizando-se os programas Excel<sup>®</sup> 2002 (Microsoft<sup>®</sup>).

A constante de eliminação ( $\lambda$ ) foi calculada pela inclinação da fase terminal da curva log-linear da concentração plasmática *versus* tempo. O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foi estimado em dependência da  $\lambda$ . A área sob a curva ( $ASC_{0-t}$ ) e a área sob a curva no primeiro momento ( $ASMC_{0-t}$ ) foram calculadas pelo método trapezoidal, esta última relacionando a [concentração x tempo] *versus* tempo. A extrapolação da

( $ASC_{\text{extrap}}$ ) foi calculada pela relação entre a última concentração plasmática determinada e a constante de eliminação. A extrapolação da  $ASMC_{\text{extrap}}$  foi calculada multiplicando-se a última concentração determinada pelo tempo correspondente, dividindo-se pela constante de eliminação, à qual foi somada a relação entre a última concentração plasmática determinada e a constante de eliminação elevada ao quadrado. Desse modo tem-se que  $ASC_{0-\infty} = ASC_{\text{extrap}} + ASC_{0-t}$  e  $ASMC_{0-\infty} = ASMC_{\text{extrap}} + ASMC_{0-t}$ . O tempo de residência médio no plasma (MRT) foi estimado pela relação entre  $ASMC_{0-\infty}$  e  $ASC_{0-\infty}$ . O *clearance* foi calculado considerando a dose administrada e a  $ASC_{0-\infty}$ . O volume de distribuição no *steady-state* ( $Vd_{ss}$ ) foi determinado considerando-se o MRT e o  $CL_{\text{total}}$ .

As equações utilizadas para os cálculos dos parâmetros farmacocinéticos por abordagem não-compartimental estão mostradas a seguir (GIBALDI & PERRIER, 1982):

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda} \quad 2$$

$$CL_{\text{total}} = \frac{D}{ASC_{0-\infty}} \quad 3$$

$$MRT = \frac{ASMC_{0-\infty}}{ASC_{0-\infty}} \quad 4$$

$$Vd_{\text{ssl}} = MRT \times CL_{\text{total}} \quad 5$$

#### 4.3.7.4.1 Metodologia analítica para a quantificação de quinina em amostras de plasma

As concentrações plasmáticas de QN foram determinadas por CLAE a partir de metodologia adaptada com base nos métodos descritos por CHMUZYNSKI (1997) e PEDRONI (2005). As condições cromatográficas são as mesmas descritas na Tabela 4. Entretanto, as condições de detecção e a fase móvel foram alteradas a fim de melhorar a sensibilidade do método. Selecionou-se as seguintes condições do detector: sensibilidade baixa, ganho de 16 vezes e resposta 4. A fase móvel foi composta de água Milli-Q<sup>®</sup>/Acetonitrila/trietilamina, 87:11:2, v/v, com pH<sub>aparente</sub> ajustado a 2,7 com ácido fosfórico concentrado.

Para a curva padrão, foi preparada uma solução mãe de 500 µg/mL (em base) de cloridrato de QN em metanol/água (1:1). As concentrações finais das diluições preparadas foram de: 0,25, 1, 2,5, 5, 10 e 20 µg/mL no mesmo solvente. Alíquotas de 10 µL de cada diluição final foram adicionadas a tubos eppendorfs contendo 90 µL de plasma, a fim de se obter concentrações finais em plasma na faixa de 25-2000 ng/mL. Os controles de qualidade foram preparados a partir de uma solução mãe diferente, sendo as concentrações finais em plasma de 50, 750 e 1500 ng/mL.

Todas as amostras contendo plasma foram submetidas a um processo de precipitação de proteínas utilizando ácido tricloroacético 5 %, na proporção de 1:1, v/v. Para a preparação da amostra sem fármaco (branco), 100 µL de plasma foram precipitados com 100 µL do agente de precipitação. Posteriormente, as amostras foram agitadas e centrifugadas, a 12000 rpm por 10 minutos, a 25 °C. O sobrenadante foi transferido para *vials* de vidro âmbar e, então, quantificado por CLAE.

#### **4.3.7.4.2 Validação de metodologia analítica para o doseamento da quinina em amostras de plasma**

A metodologia foi validada através da determinação da linearidade, precisão, exatidão e limite de quantificação (BRASIL, 2003; FDA, 2001).

A curva padrão, o branco e os controles de qualidade foram preparados conforme descritos anteriormente, sendo preparadas 3 curvas (e controles) por dia, durante 3 dias. A partir deste procedimento, a linearidade foi calculada analisando-se as curvas obtidas, o coeficiente de correlação linear, o coeficiente angular e o intercepto da reta, além do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A precisão intra-dia e inter-dia foi avaliada através do CV % determinados e a exatidão através da relação percentual entre a concentração calculada e a teórica. Os resultados da validação encontram-se no Anexo 3.

#### **4.3.7.5 Avaliação da Ligação da quinina aos eritrócitos**

Para a avaliação da ligação da QN livre ou nanoencapsulada aos eritrócitos, adaptou-se o protocolo desenvolvido por YER e colaboradores (1999). Utilizou-se o sangue de ratos infectados com parasitemia média de  $(8,3 \pm 2,4 \%)$  e também de animais sadios, com a mesma idade. O sangue coletado após a decapitação dos animais foi centrifugado durante 10 min a 12000 rpm, e a camada formada por plaquetas e leucócitos, que se localiza na interface entre o plasma e sedimento de hemácias, foi descartada. O sedimento de hemácias foi lavado 3 vezes com solução tamponada de glicose pH 7,4. As células foram ressuspensas no mesmo tampão, e o hematócrito foi ajustado a 0,48. A solução de fármaco livre ou as NC2-QN foram adicionadas em quantidade suficiente para obter concentração final na suspensão de hemácias de 5000 ng/mL. As amostras foram preparadas em triplicata. Após 30 minutos, a 37 °C, sob baixa agitação, as amostras foram centrifugadas 5000 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi quantificado por CLAE. O sedimento foi hemolisado com água destilada (1:3 v/v) e centrifugado a 12000 rpm/10min. O

sobrenadante foi precipitado com TCA 5% e, após nova centrifugação, foi quantificado. O coeficiente de ligação da QN aos eritrócitos (D), descrito por DERENDORF & GARRET (1987), foi determinado pela equação (6):

$$D = \frac{As - (C_{sob} \cdot Vs \cdot (1 - H))}{H \cdot Vs \cdot C_{sob}} \quad 6$$

onde  $As$  é a quantidade de fármaco adicionado ao sistema,  $C_{sob}$  é a concentração de fármaco no sobrenadante,  $Vs$  é o volume final da suspensão de eritrócitos e  $H$  é o hematócrito.

#### 4.3.8 Descarte de resíduos

O descarte dos resíduos químicos seguiu procedimento padrão usual da Faculdade de Farmácia – UFRGS. Os resíduos gerados foram devidamente rotulados e entregues à Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT) da Faculdade de Farmácia que, é responsável por enviar para o Instituto de Química da UFRGS para os devidos procedimentos de reciclagem e/ou descarte de material químico.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---



O surgimento de resistência aos fármacos antimaláricos tem sido um problema crescente para a terapia desta doença. A disseminação de resistência à cloroquina tem aumentado a utilização de fármacos de segunda escolha, como a QN. Sua utilização é limitada por fatores como a estreita janela terapêutica e a toxicidade (KANEKO e NISHIYAMA, 2004; KOROLKOVAS e FRANÇA, 2004). A superação desses problemas e o aumento da eficácia terapêutica através de manipulação tecnológica podem ser uma alternativa para o tratamento da malária. Com este intuito, o desenvolvimento de NC poliméricas contendo este fármaco busca melhorar a aplicabilidade terapêutica da QN.

Após a preparação e caracterização das NC contendo QN, tornava-se necessário avaliar a eficácia destas formulações frente ao fármaco não-encapsulado, em um modelo experimental *in vivo*. PEDRONI e colaboradores (2006) desenvolveram um modelo de malária em ratos Wistar machos infectados com *P. berghei*, no qual os animais de 5 semanas são infectados com hemácias parasitadas provenientes de camundongos e o tratamento ocorre do 7-9º dia de infecção. Esse protocolo permite testar diferentes posologias e diferentes fármacos através do monitoramento da infecção pela determinação da parasitemia e da mortalidade dos animais. O objetivo do tratamento é a erradicação da parasitemia, com sobrevivência de todos os animais infectados. Este protocolo de infecção permite também a avaliação farmacocinética do fármaco em animais infectados. Tendo em vista essas vantagens, esse protocolo foi escolhido para avaliar a eficácia das formulações preparadas neste trabalho.

Como para os experimentos *in vivo* as doses de QN seriam altas, buscou-se reduzir o volume de administração das suspensões a volumes adequados para a administração i.v. em ratos (CCAC, 1993), formulando-se inicialmente NC com alta concentração de QN. Além disso, considerando-se que o protocolo de tratamento dos animais infectados com *P. berghei* é de 3 dias consecutivos, era necessário que as suspensões de NC preparadas fossem estáveis no decorrer do experimento. A avaliação da estabilidade das suspensões coloidais é importante uma vez que são sistemas termodinamicamente instáveis e, por serem formulações líquidas, são suscetíveis a instabilidade físico-química e microbiológica (FLOYD e JAIN, 1998).

Após a determinação da formulação e posologia da QN nanoencapsulada efetiva no tratamento da malária segundo o protocolo estabelecido, havia necessidade de avaliar-se o perfil farmacocinético do fármaco em animais sadios e infectados, uma vez que a farmacocinética da QN livre é alterada pelo processo infeccioso, conforme demonstrado por PEDRONI em 2005.

A seguir são apresentados e discutidos os resultados obtidos para as diferentes formulações de NC de QN investigadas.

### **5.1 Nanocápsulas revestidas com quitosana contendo 4 mg/mL de quinina (NC-QTS)**

Através do método de nanoprecipitação, foram obtidas, com êxito, as NC-QN, com alta concentração (4 mg/mL) de fármaco. Ao ser vertida a fase orgânica sob a aquosa, esta imediatamente tornou-se leitosa com opalescência azulada, como resultado da formação das NC (MAGENHEIM e BENITA, 1991). Segundo Fessi e colaboradores (1988), a formação das NC ocorre durante a difusão da acetona na água o que gera uma turbulência interfacial, na qual se formam nanogotas de óleo envoltas pelo polímero insolúvel que se deposita na interface O/A. Paralelamente, foram desenvolvidas formulações brancas, sem fármaco que foram utilizadas como controle nos experimentos de avaliação biológica.

A partir das características de superfície conferidas pelo revestimento com QTS, administradas através da via intravenosa, formulou-se a hipótese de nanopartículas revestidas, por interação eletrostática com a membrana negativa do eritrócito, aumentassem a concentração intracelular do fármaco disponível para matar o Plasmodium, sendo mais eficaz do que a formulação sem revestimento catiônico.

Os resultados da caracterização físico-química das formulações revestidas com QTS estão mostrados na Tabela 11. A utilização de 0,15 % de QTS na formulação conferiu um potencial zeta positivo para as formulações em torno de 25 mV, corroborando com os valores positivos obtidos por outros autores para

nanopartículas com o mesmo revestimento (CALVO et al., 1997b; CAMPOS et al., 2003; PREGO et al., 2005). O potencial positivo é devido a presença dos grupamentos amino do polissacarídeo (CALVO et al., 1997a; FELT et al., 1998). O diâmetro de partícula ( $217,7 \pm 67,2$  nm) e população unimodal ( $0,219 \pm 0,09$ ) mostraram-se compatíveis com as nanopartículas obtidas pelo método de nanoprecipitação (FESSI et al., 1988; COUVREUR et al., 2002). A recuperação do fármaco foi próxima de 100 % ( $98,5 \pm 2,8$  %) e o pH apresentou-se levemente ácido ( $4,98 \pm 0,01$ ) e não diferente do pH da formulação branca ( $5,0 \pm 0,09$ ).

Visando avaliar a estabilidade da NC-QTS, realizou-se a caracterização físico-química nos dias 1 e 4 após a sua preparação (Tabela 11). Pode-se observar que as formulações mantiveram-se estáveis durante os quatro dias de análise.

Tabela 11. Caracterização físico-química e estabilidade das NC4-QTS e brancas (NC-QTS-Br).

Parâmetro	NC4-QTS		NC-QTS-Br
	dia 1	dia 4	
Teor (%)	$98,5 \pm 2,8$	$97,7 \pm 2,7$	-
TE (%)	$92,8 \pm 0,2$	$92,7 \pm 0,1$	-
Diâmetro (nm)	$217,7 \pm 67,2$	$182,4 \pm 8,4$	$230,2 \pm 47,2$
PDI	$0,219 \pm 0,09$	$0,198 \pm 0,01$	$0,158 \pm 0,1$
Potencial Zeta (mV)	$25,9 \pm 2,4$	$24,5 \pm 3,1$	$28,4 \pm 5,2$
pH	$4,98 \pm 0,01$	$4,98 \pm 0,03$	$5,0 \pm 0,09$

TE = taxa de encapsulação; PDI = índice de polidispersão  
Expressão dos resultados: média  $\pm$  desvio padrão. (n = 3)

Após preparadas, as formulações foram avaliadas no modelo de infecção experimental, sendo a dose total diária de 50 mg/kg, administrada a cada 12 horas, através de infusão contínua. No entanto, estas NC induziram lesões no local de administração, propagando-se ao longo de toda a cauda, impossibilitando a conclusão do protocolo de tratamento. Portanto, as NC contendo QN e revestidas com QTS, quando testadas *in vivo*, apresentaram grave toxicidade, a qual limitou a sua utilização neste trabalho. Devido aos problemas apresentados pelas NC revestidas contendo QN, a formulação NC-QTS-Br não foi avaliada.

## 5.2 Nanocápsulas contendo 4 mg/mL de quinina (NC4-QN)

As nanocápsulas de QN contendo 4 mg/mL, sem revestimento, foram caracterizadas nos dias 1, 4, 7, 14, 21 e 30 após sua preparação (Tabela 12).

A taxa de recuperação do fármaco foi próxima de 100 % ( $106,6 \pm 0,9$  %) no primeiro dia após a preparação (Tabela 12). No quarto dia após a preparação, entretanto, o teor de fármaco na formulação diminuiu cerca de 20 % ( $83,4 \pm 10,4$ ) e 40 % ( $63,7 \pm 24,6$ ) após 30 dias, em relação ao primeiro dia de análise. Estes resultados indicam a instabilidade do sistema frente ao armazenamento.

Tabela 12. Caracterização físico-química e estabilidade das NC de QN (4 mg/mL) sem revestimento (NC4-QN).

	NC4-QN						NC-Br
	1	4	7	14	21	30	
<b>Teor (%)</b>	106,6 ± 0,9	83,4 ± 10,4 *	79,7 ± 2,3 *	85,6 ± 8,3 *	86,2 ± 3,0 *	63,7 ± 24,6 *	
<b>Diâmetro (nm)</b>	164,9 ± 3,7	173,7 ± 26,9	190,8 ± 50,4	179,8 ± 14,4	258,0 ± 164,7	548,4 ± 200 *	160,9 ± 2,2
<b>PDI</b>	0,151 ± 0,04	0,181 ± 0,11	0,17 ± 0,08	0,236 ± 0,1	0,316 ± 0,36	0,627 ± 0,27 *	0,166 ± 0,02
<b>Potencial Zeta (mV)</b>	-18,1 ± 1,2	-15,4 ± 0,4	-16,3 ± 1,9	-19,7 ± 1,1	-19,6 ± 2,0	-22,6 ± 2,2*	-13,4 ± 0,8 <sup>a</sup>
<b>pH</b>	8,62 ± 0,09	8,45 ± 0,13	8,36 ± 0,2	8,04 ± 0,37	7,25 ± 0,93 *	6,56 ± 0,77 *	4,77 ± 0,1 <sup>a</sup>

PDI = índice de polidispersão

Expressão dos resultados: média ± desvio padrão. (n = 3 formulações)

\* diferença significativa para  $\alpha = 0,05$  em relação ao primeiro dia.

<sup>a</sup> diferença significativa para  $\alpha = 0,05$  em relação ao primeiro dia da NC4-QN.

O tamanho de partícula é uma característica muito importante quando se pretende desenvolver uma formulação para uso intravenoso. Segundo a USP XXIII, a formulação não deve conter mais de 12 partículas/mL com mais de 10  $\mu\text{m}$  ou não mais do que 2 partículas/mL com mais de 25  $\mu\text{m}$ , a fim de evitar embolia. Após a preparação, as NC contendo QN 4 mg/mL apresentaram tamanho submicrométrico adequado para a administração pela via intravenosa ( $164,9 \pm 3,7$  nm) (Tabela 12). Diâmetros entre 100 e 500 nm e população monodispersa são características dos colóides obtidos pelo método de nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1988; COUVREUR *et al.*, 2002). Embora a formulação preparada contivesse grande quantidade de fármaco, seu diâmetro não foi demasiadamente grande, ficando entre 140 e 230 nm. GASPAR *apud* MAGENHEIM e BENITA (1991)<sup>5</sup>, observaram que altas concentrações de primaquina elevam dramaticamente o diâmetro das partículas, o que foi atribuído à instabilidade resultante da associação do fármaco às nanopartículas em altas concentrações. Esse fenômeno, no entanto, não foi observado para a QN.

Durante o armazenamento, a formulação mostrou-se estável em relação ao seu diâmetro (entre 164,9 e 258,0 nm) e índice de polidispersão (entre 0,151 e 0,236) até 21 dias. A partir do vigésimo primeiro dia, observou-se uma tendência ao aumento do diâmetro das partículas, possivelmente devido à agregação, conforme previamente relatado por MAGEINHEM e BENITA (1991) para os sistemas coloidais (Tabela 12). Na avaliação do trigésimo dia, o diâmetro ( $548,4 \pm 200$  nm) e a polidispersão ( $0,628 \pm 0,272$ ) foram significativamente maiores em relação ao primeiro dia.

A taxa de encapsulação foi alta ( $94,9 \pm 0,5$  %), superior a 90 %. Este resultado era esperado, uma vez que a TE está relacionada com a solubilidade do fármaco no óleo (FRETA *et al.*, 1996), ou seja, com a lipofilia da substância, e a QN apresenta um alto valor de log P (log P = 3,44) (SMITH, 2001).

---

<sup>5</sup> GASPAR, R.; PREAT, V.; ROLAND, M. Nanoparticles of polyisohexilcyanoacrylate (PIHCA) as carrier of primaquine: formulation, physico-chemical characterization and acute toxicity, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 68, p. 111-119, 1991, *apud* MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *S. T. P. Pharma Sciences*, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.

O potencial zeta reflete o potencial elétrico da superfície das nanopartículas, sendo influenciado pela carga dos diferentes componentes da formulação. O valor deste parâmetro medido para as NC4-QN, recém preparadas foi fortemente negativo ( $-18,1 \pm 1,2$  mV), o que pode ser atribuído ao tensoativo de baixo EHL, o Epikuron 170<sup>®</sup>, o qual é composto de aproximadamente 70 % de fosfatidilcolina de soja (Tabela 12). MOSQUEIRA e colaboradores (2001) observaram que o valor de potencial zeta das NC de PLA preparadas com 0,75 % p/v de Epikuron 170<sup>®</sup> foi de  $-51,8 \pm 0,1$  mV, enquanto nas preparadas com apenas 0,3 % do tensoativo, houve redução para  $-47,7 \pm 0,5$ . Em pH alcalino, portanto, os grupos fosfato da fosfatidilcolina encontram-se ionizados sendo responsáveis pelo caráter negativo observado nas formulações preparadas neste trabalho. O potencial zeta da suspensão de NC de QN manteve-se estável durante 21 dias (entre  $-15,4$  e  $-19,6$  mV) Após este período, um aumento significativo do caráter negativo das partículas foi observado ( $-22,6 \pm 2,2$  mV).

Apesar do diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta das NC sem fármaco ser semelhante aos apresentados pela formulação NC4-QN e não ter havido alteração durante o tempo de armazenamento, o pH apresentou-se diferenciado (Tabela 12). O pH da NC4-QN foi estatisticamente diferente ( $\alpha = 0,05$ ) do observado na suspensão branca ( $8,62 \pm 0,04$  versus  $4,77 \pm 0,1$ ) após a preparação. A suspensão contendo fármaco permaneceu estável em relação ao pH até 21 dias após a preparação, sendo que depois desta data, o pH situou-se abaixo de 7 ( $6,56 \pm 0,77$ ). O declínio significativo de pH observado para a suspensão pode estar relacionado com a hidrólise do polímero, a PCL, gerando ácido  $\epsilon$ -hidroxicapróico livre (CALVO *et al.*, 1996) ou devido a relaxação das cadeias poliméricas da PCL, que então levaria a maior exposição dos grupos carboxílicos terminais (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002).

A comparação dos parâmetros obtidos 1 e 4 dias após a preparação das NC4-QN mostram alteração estatisticamente significativa no teor, o que pode ser atribuído a precipitação de nanocristais de fármaco logo após a preparação das suspensões (GUTERRES *et al.*, 1995). Logo, a formulação preparada com a concentração de 4 mg/ml de QN não é estável por 4 dias, sendo necessário, então, utilizar a formulação até no máximo 24 horas após a sua evaporação. Sendo assim,

estipulou-se que para o experimento de avaliação da eficácia destas formulações, a suspensão seria preparada no mesmo dia ou no máximo no dia anterior a sua utilização, sendo necessário fazer seu doseamento antes da administração nos animais.

A primeira posologia avaliada com as NC4-QN foi de 30 mg/kg/dia, q8h. Embora o volume de administração fosse pequeno (entre 0,3-0,4 mL), a cauda dos animais apresentou-se inchada e/ou enrubescida, o que dificultou o término do tratamento. Optou-se pela alteração da posologia, aumentando-se a dose para 50 mg/kg/dia com intervalos de 12 horas. No entanto, a administração *i.v. bolus* de altas doses de QN pode levar a cardiotoxicidade.

A QN pode produzir toxicidade cardiovascular similar à quinidina, incluindo distúrbios de condução, arritmias, angina e hipotensão, podendo levar a depressão cardíaca e falência circulatória (USP, 2004). A cardiotoxicidade é um dos efeitos mais sérios da administração *i.v.* da QN (BONINGTON *et al.*, 1990; TRACY e WEBSTER, 2003; FLANAGAN *et al.*, 2006), podendo ocorrer eventos fatais com a rápida administração *i.v.* do fármaco (DAVIS *et al.*, 1988; USP, 2004). Em função destas complicações, a utilização parenteral da QN recomendada é através de infusão contínua com dose de ataque.

DAVIS e colaboradores (1988) avaliaram a administração da QN a pacientes com malária cerebral, na dose de 4 mg/kg de dicloridrato de QN durante 1 hora seguida de 3 horas com infusão de 16 mg/kg do fármaco. A partir dos parâmetros farmacocinéticos calculados, os autores simularam a administração de diferentes esquemas posológicos e verificaram que a injeção *i.v. bolus* de 10 mg/kg de peso corporal, dose recomendada, conduz a concentrações tóxicas de QN, acima de 20 mg/L. Portanto, segundo os pesquisadores, o melhor esquema posológico recomendado seria o de 7 mg/kg de fármaco infundidos durante 30 minutos e, posteriormente, 10 mg/kg por 4 horas, pois este regime alcançaria ao final da dose de ataque, concentrações ao redor de 10 mg/L. Acima destas concentrações, sintomas de intoxicação podem ocorrer, como visão borrada, cegueira, prolongamento do intervalo QTc, falência cardíaca e até morte (DYSON *et al.*, 1985; JAEGER, 2003).

Diante do exposto, optou-se pela administração da QN nos grupos tratados com NC e controle positivo (QN livre) por infusão contínua a cada 12 horas. A QN não-encapsulada foi avaliada nas seguintes doses: 50 mg/kg/dia (n = 5), 70 mg/kg/dia (n = 3) e 100 mg/kg/dia (n = 2). As NC4-QN foram avaliadas na dose de 50 mg/kg/dia (n = 5).

A maior dose de QN testada (100 mg/kg/dia) causou queimadura grave no local de administração em cerca de 70 % dos animais que iniciaram o tratamento. Nos dois que sobreviveram, obteve-se cura parasitológica no dia 17 após a infecção. A diminuição da dose em cerca de 30 % (70 mg/kg/dia) não causou alterações visuais na cauda dos animais, além de curar 1/3 dos animais tratados (Figura 12), o que aconteceu no 25° dia do experimento. Na dose de 50 mg/kg/dia não foram observadas alterações na cauda dos animais. Esses resultados mostram que a ação irritante da QN no local de administração é dose-dependente.

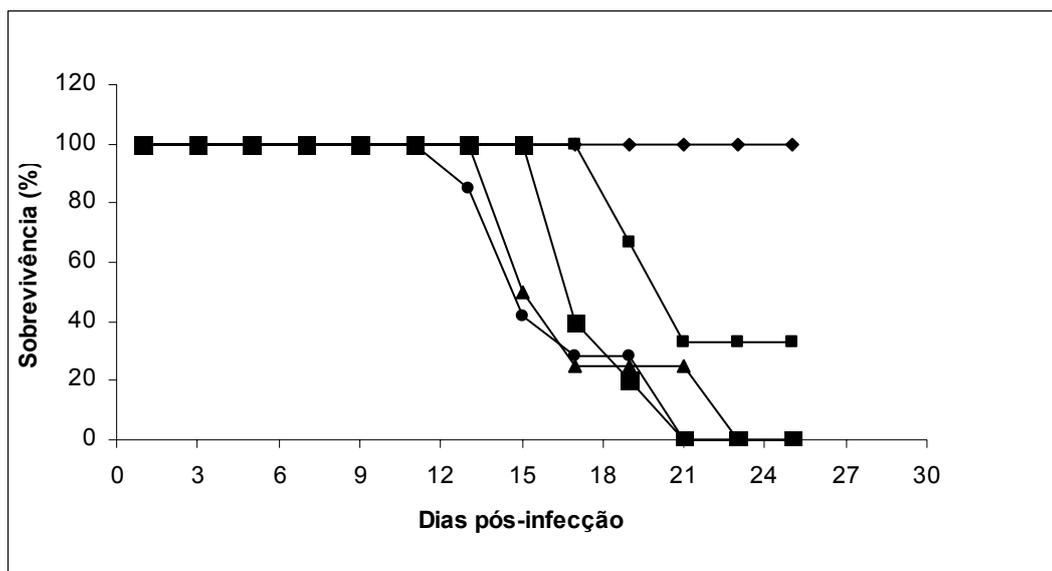


Figura 12. Perfil de sobrevivência de ratos Wistar infectados após tratamento com NC de QN ou QN livre em diferentes doses, através de IC, q12h. (-■-) QN livre 70 mg/kg/dia; (-▲-) QN livre 50 mg/kg/dia; (-◆-) QN livre 100 mg/kg/dia; (-●-) salina; (-■-) NC4-QN (50 mg/kg/dia)

Nenhum animal sobreviveu quando tratado com a dose total diária de 50 mg/kg, independente da forma em que o fármaco foi administrado (NC ou livre), sendo que ambos apresentaram perfil de parasitemia e tempo de morte (entre 15-23 dias) semelhante aos controles negativos do experimento (Figura 12). Ainda, a

administração das NC4-QN resultou nos efeitos colaterais anteriormente relatados: rubor, inchaço e dificuldade de visualização da veia caudal.

Quando a concentração de fármaco excede a sua solubilidade no núcleo oleoso das NC, pode haver precipitação simultânea de nanocristais do fármaco estabilizada pelos tensoativos (GUTERRES *et al.*, 1995). Estes nanocristais são reservatórios ultrapuros do fármaco e poderiam justificar o agravamento das lesões cutâneas observadas quando a QN foi administrada na forma de NC na dose de 50 mg/kg/dia em relação ao fármaco livre administrado na mesma dose. Os nanocristais apresentam a mesma distribuição de tamanho de partículas das NC e, em função do tempo de armazenamento, agregam-se e precipitam (GUTERRES *et al.*, 1995). Normalmente esses nanocristais não são ressuspendíveis, ocasionando uma redução aparente da quantidade de fármaco recuperada pelo doseamento. Conforme comentado anteriormente, houve uma redução significativa no teor de QN nas NC4-QN após 4 dias de preparação (Tabela 12), que poderia corroborar a hipótese da presença de nanocristais de QN nessa formulação.

### **5.3 Nanocápsulas contendo 3 mg/mL de quinina (NC3-QN)**

A possível formação de nanocristais em função da alta concentração de QN e a toxicidade associada às NC4-QN levou à necessidade de redução da concentração de fármaco na suspensão. Assim, foi preparada uma suspensão contendo QN na concentração de 3 mg/mL (NC3-QN)

Na Tabela 13 estão mostrados os resultados da caracterização e estabilidade das NC3-QN até 30 dias. O teor de fármaco quantificado na formulação de 3 mg/mL manteve-se constante até 14 dias após a preparação. Além desse período, a recuperação diminuiu aproximadamente 10 % e 20 % após 21 e 30 dias de armazenamento, respectivamente.

Alterações significativas no diâmetro das partículas da NC3-QN foram observadas após 21 dias de estocagem (Tabela 13). A grande variabilidade no

índice de polidispersão das nanopartículas após este período acompanha a diminuição de estabilidade observada para esta formulação.

Tabela 13. Caracterização físico-química e estabilidade das NC de QN (3 mg/mL) sem revestimento (NC3-QN).

Parâmetro	NC3-QN					
	1	4	7	14	21	30
	102,2 ±	105,1 ±	95,46 ±	106,3 ±	93,0 ±	84,6 ±
<b>Teor (%)</b>	5,8	1,0	1,7	9,4	1,0*	8,1*
	161,5 ±	210,5 ±	166,8 ±	158,2 ±	201,0 ±	255,5 ±
<b>Diâmetro (nm)</b>	3,7	38,1	5,6	9,1	7,8	34,6*
	0,138 ±	0,288 ±	0,170 ±	0,244 ±	0,172 ±	0,265 ±
<b>PDI</b>	0,01	0,034	0,031	0,030	0,055	0,208
<b>Potencial Zeta (mV)</b>	-18,8 ±	-19,5 ±	-19,6 ±	-19,3 ±	-18,3 ±	-17,9 ±
	1,3	0,5	11,4	1,6	2,1	1,0
	8,44 ±	8,20 ±	7,67 ±	5,97 ±	6,29 ±	5,78 ±
<b>pH</b>	0,02	0,03*	0,09*	0,08*	0,09*	0,07*

PDI = índice de polidispersão

Expressão dos resultados: média ± desvio padrão. (n = 3)

\* diferença significativa para  $\alpha = 0,05$  em relação ao primeiro dia.

O potencial zeta manteve-se entre os valores de – 18,8 a – 17,9 mV durante todo o período do experimento, sem apresentar variação significativa no tempo avaliado (Tabela 13). O pH, entretanto, apresentou alterações significativas a partir de 4 dias após a preparação das NC, diminuindo de 8,20 para 5,78, após 30 dias, em média.

Com a diminuição da concentração de QN na suspensão para 3 mg/mL, foram testadas 2 doses no protocolo de infecção experimental: 30 e 40 mg/kg/dia, q12h, através de infusão contínua, além dos animais-controle. Os animais tratados apenas com salina morreram em  $13,5 \pm 0,7$  dias, enquanto que nos animais tratados, a morte ocorreu em  $20,0 \pm 1,4$  e  $19,5 \pm 0,7$  dias para a menor e a maior

dose, respectivamente, de NC contendo QN avaliada neste experimento. Embora os animais tratados tenham morrido, estes tiveram um aumento significativo na sobrevivência ( $\alpha = 0,05$ ), em torno de 6-7 dias, em relação aos animais controles, esses resultados sugerem que a concentração de fármaco na suspensão pode alterar a eficácia da QN influenciando a ação da QN vetorizada através das nanopartículas.

Os animais tratados mostraram redução significativa da parasitemia a partir do 9 dia (Figura 13) em relação aos animais sem tratamento, nos quais a evolução da parasitemia foi rápida e fatal. A QN nanoencapsulada pareceu demonstrar uma ação rápida, controlando o crescimento sanguíneo do parasita, logo após o início do tratamento, mas possivelmente a dose não foi suficiente para erradicar completamente o *Plasmodium* no decorrer do tratamento.

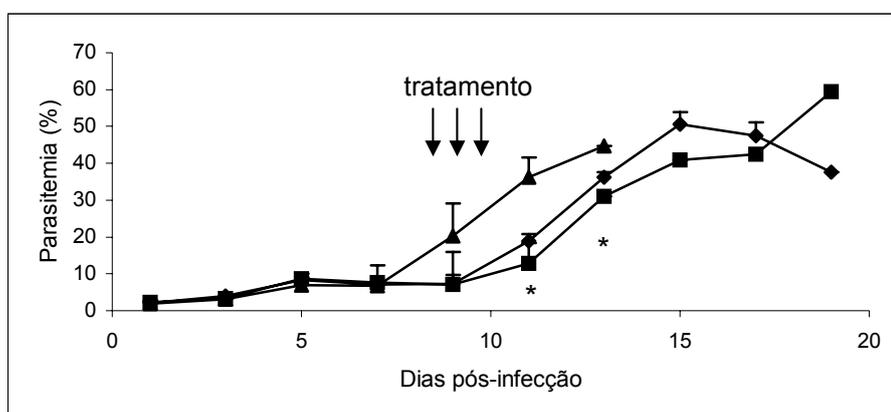


Figura 13. Perfil de parasitemia de animais tratados com NC3-QN através de infusão contínua, q12h (n = 2). (-◇-) 30 mg/kg; (-■-) 40 mg/kg; (-▲-) controle negativo. \* diferença significativa em relação ao grupo controle ( $\alpha = 0,05$ ).

A diminuição da concentração de QN na suspensão, de 4 para 3 mg/mL, levou a uma redução da dose total possível de administração pela via intravenosa. Visando possibilitar a administração de doses maiores de QN optou-se pela avaliação da via intraperitoneal. A administração oral não foi cogitada devido aos problemas de biodisponibilidade mais significativos que geralmente estão associados a essa via.

Tabela 14. Percentual de cura para as diferentes doses de QN livre e NC3-QN após a administração intraperitoneal a cada 12 horas.

<b>Formulação</b>	<b>Dose (mg/kg/dia)</b>	<b>Cura (%)</b>	<b>Tempo de morte (dias)</b>	<b>Tamanho amostral</b>
NC3-QN	70	42,85	23-25	7
	100	28,57	9-13	9
QN livre	100	33,3	19-21	3
	150	100	-	4
NC-Br	-	Zero	13-19	4

O tratamento dos animais com QN livre na dose total diária de 150 mg/kg levou a 100 % de cura os animais entre 15-19 dias após a infecção, sendo que o declínio da parasitemia iniciou-se após o término do tratamento, ou seja, no 9º dia de infecção (Figura 14). Os animais que receberam a formulação sem o fármaco, assim como os animais sem tratamento, morreram entre 13-19 dias após a infecção. Em relação à formulação contendo a QN, a administração de uma dose total diária de 70 mg/kg curou apenas cerca de 40 % dos animais tratados (entre 19-21 dias), enquanto que os animais deste grupo que não obtiveram êxito morreram entre 23-25 dias após a infecção (Tabela 14). O aumento da dose de NC3-QN para 100 mg/kg/dia, no entanto, mostrou-se tóxica para os animais, tendo em vista que 4/9 ratos morreram entre o 9-13º dia. Durante o tratamento esses animais tornaram-se bastante debilitados. As mortes dos animais desse grupo não foram devido ao volume de suspensão administrada por esta via (entre 2-2,5 mL), uma vez que a via i.p. permite a administração de grandes volumes de líquidos, até 10 mL, conforme descrito por WAYNFORTH e FLECKNELL (1994). Não houve diferença significativa na parasitemia dos animais do grupo NC-Br, salina e em relação aos animais que morreram do grupo 100 mg/kg/dia de NC3-QN.

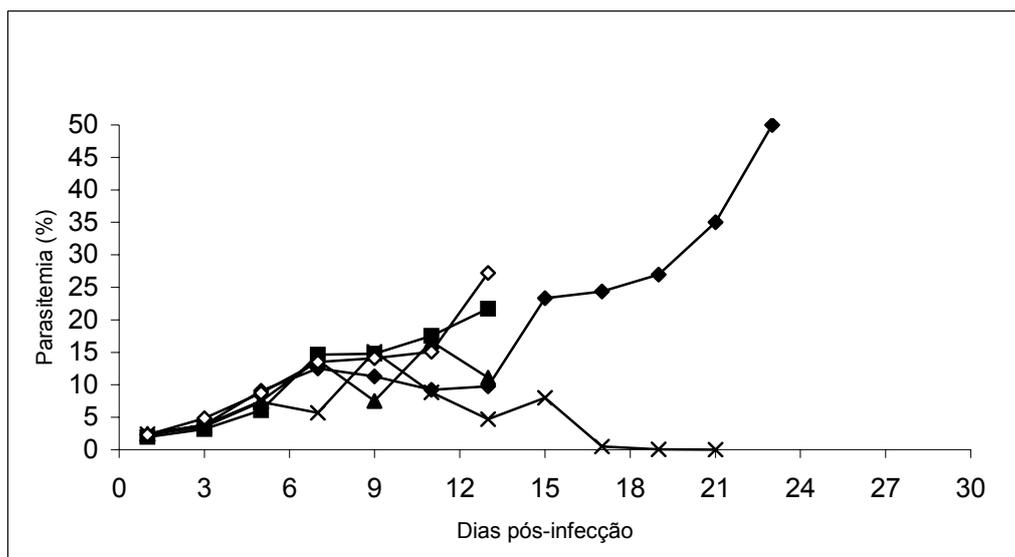


Figura 14. Perfil de parasitemia de animais tratados com NC3-QN, através da via intraperitoneal, q12h. (-x-) QN livre 150 mg/kg/dia; (-▲-) QN livre 100 mg/kg/dia; (-◆-) NC3-QN 70 mg/kg/dia; (-■-) NC3-QN 100 mg/kg/dia; (-◇-) NC-Br.

#### 5.4 Nanocápsulas mistas contendo 2 mg/mL de quinina

Considerando as limitações encontradas até o momento, de via e volume de administração para as formulações descritas, optou-se por avaliar a eficácia das NC contendo QN através de uma suspensão "mista", preparada pela suspensão de NC de QN de 2 mg/ml adicionada de cloridrato de QN a fim de se obter uma formulação final com 4 mg/ml de fármaco.

A dose de 60 mg/kg/dia desta suspensão, administrada através da via i.v. a cada 8 horas, no entanto, aumentou a sobrevida em apenas 33,3 % dos animais (2/6), sendo que na dose de 75 mg/kg/dia de fármaco não-encapsulado com a mesma posologia apresentou índice de cura de 42 % dos animais tratados (Tabela 16). Logo, a suspensão "mista" não foi mais efetiva para o tratamento dos animais do que o fármaco sendo administrado isoladamente, sendo, portanto, descartada.

### 5.5 Nanocápsulas contendo 2 mg/mL de quinina (NC2-QN)

A toxicidade apresentada pelas NC de 3 mg/mL e 4 mg/mL de QN, quando administradas conforme descrito, levou à necessidade de se desenvolver uma nova formulação com menor teor de fármaco, que evitasse o desenvolvimento de efeitos adversos graves.

Nesse sentido, uma nova suspensão de NC de QN na concentração de 2 mg/mL foi preparada e teve sua estabilidade avaliada pelo período de 30 dias (Tabela 15).

Tabela 15. Caracterização físico-química e estabilidade das NC2-QN durante 30 dias.

Parâmetro	NC2-QN					
	1	4	7	14	21	30
Teor (%)	98,6 ±	105,3 ±	96,5 ±	105,6 ±	85,1 ±	81,0 ±
	2,8	4,7	4,9	10,5	7,1 *	16,4 *
Diâmetro (nm)	175,5 ±	201,3 ±	164,2 ±	231,0 ±	168,6 ±	168,2 ±
	7,9	7,0	7,1	75,1	27,7	16,3
PDI	0,189 ±	0,122 ±	0,259 ±	0,343 ±	0,311 ±	0,312 ±
	0,04	0,026	0,04	0,12	0,11	0,04
Potencial Zeta (mV)	- 18,0 ±	- 16,9 ±	- 16,5 ±	- 16,8 ±	- 19,7 ±	- 17,2 ±
	2,2	2,3	1,2	2,6	0,8	1,0
pH	8,42 ±	8,29 ±	7,35 ±	5,69 ±	6,30 ±	5,28 ±
	0,02	0,06 *	0,05 *	0,14 *	0,01 *	0,17 *

PDI = índice de polidispersão

Expressão dos resultados: média ± desvio padrão. (n = 3)

\* diferença significativa para  $\alpha = 0,05$  em relação ao primeiro dia.

A recuperação do fármaco (Tabela 15) manteve-se entre 98,6 a 105,6 %, sem variação significativa durante 14 dias. Após este período, o teor de QN diminuiu

cerca de 15 %. Esta redução pode ser resultado de precipitação ou degradação do fármaco, embora nenhum pico diferente tenha sido observado no cromatograma durante o tempo de corrida. A TE da NC2-QN foi de  $95,3 \pm 0,4$  %, semelhante aos valores obtidos para a NC3-QN ( $94,2 \pm 0,6$  %) e NC4-QN ( $94,9 \pm 0,5$  %).

Os valores de potencial zeta, diâmetro de partícula e índice de polidispersão não apresentaram diferenças significativas durante o período do estudo, indicando que esta formulação apresenta características constantes por mais tempo de estocagem, em relação às formulações com concentração de 3 e 4 mg/mL de QN. O potencial zeta ficou entre  $-18,0 \pm 2,2$  e  $-17,2 \pm 1,0$  mV, o diâmetro das partículas entre 164,2 e 231 nm e a polidispersão entre 0,122 e 0,343.

Assim como observado com as NC3-QN, os valores de pH tornaram-se estatisticamente diferentes no decorrer do tempo, tendendo ao caráter ácido, podendo estar relacionado com alterações na estrutura do poliéster utilizado na preparação das NC.

Os experimentos realizados nos ratos infectados descritos até o momento permitem verificar que a concentração de fármaco nas NC foi um fator importante no resultado do tratamento, bem como as lesões tóxicas observadas na cauda. De forma a conseguir avaliar o efeito da encapsulação da QN, avaliou-se a concentração de fármaco de 2 mg/mL, seguindo a administração i.v., q8h. Como o volume de suspensão administrada foi alta (aproximadamente 1,5-1,8 mL), a administração foi realizada lentamente, durante 3-5 minutos, conforme descrito por WAYNFORTH e FLECKNELL (1994).

Inicialmente testou-se a dose de 150 mg/kg/dia de quinina livre, via i.v. *bolus* a cada 8h. Essa dose foi tóxica levando à morte a maioria dos animais após a administração i.v. *bolus* do fármaco ou lesões cutâneas na cauda, inviabilizando a continuidade do tratamento. Em relação às lesões observadas na cauda dos animais tratados com 150 mg/kg de QN i.v. *bolus*, existem relatos de problemas associados a administração intramuscular da QN, como irritação, dor, necrose local, formação de abscesso (USP, 2004). A ausência destes efeitos em humanos após a administração i.v. pode ser em função do maior calibre da veia utilizada, da menor dose recomendada e da baixa concentração de fármaco na solução injetável.

Tendo em vista estes efeitos adversos, a dose total de QN foi diminuída para 105 mg/kg/dia de QN. As doses de QN livre testadas foram, então, 30, 75 e 105 mg/kg/dia (Tabela 16).

Os ratos dos grupos controles, assim como o grupo de QN livre na dose de 30 mg/kg/dia morreram entre 15-17 dias, com picos de parasitemia superiores a 40 %. Somente na dose de 105 mg/kg de base livre foi obtido 100 % de sobrevivência dos animais, sendo possível observar a diminuição da parasitemia a partir do término do tratamento, e a cura entre 15-17 dias. O pico de parasitemia, o perfil de morte e cura de todos os grupos testados encontra-se resumido na Tabela 16.

Tabela 16. Efetividade do tratamento com QN livre ou nanoencapsulada, quando administrada através da via i.v, 8/8h.

<b>Tratamento</b>	<b>Dose (mg/kg/dia)</b>	<b>Pico de parasitemia (%)</b>	<b>Mortalidade (dias)</b>	<b>Cura (%)</b>
<b>QN livre</b>	30	43,72 ± 3,78	15-19	zero
	75	38,84 ± 38,39	17-19	42
	105	10,88 ± 4,26	-	100
<b>NC2-QN</b>	30	51,80 ± 19,76	13-19	28,6
	60	14,57 ± 16,23	17-21	85,7
	75	11,33 ± 4,82	-	100
<b>Grupos controle</b>	salina	61,46 ± 20,79	13-17	zero
	NC-Br	46,19 ± 7,20	13-17	zero

A dose de 30 mg/kg/dia de QN NC2-QN possibilitou um aumento no percentual de sobrevivência de 28,6 % em relação a mesma dose de fármaco livre. O dobro desta dose elevou a sobrevivência para 85,7 %, sendo que 100 % de cura foi alcançado com a 75 mg/kg/dia de fármaco encapsulado. Nessa dose de fármaco livre, apenas 42 % dos animais se curaram. Não houve diferença significativa no perfil de morte e parasitemia dos animais tratados com as NC-Br ou com a salina, mostrando que o nanoencapsulamento melhorou a eficácia da QN, mas as nanopartículas vazias não contribuem para o efeito antimalárico.

A nanoencapsulação da QN permitiu a redução da dose efetiva em 30 %, de 105 para 75 mg/kg/dia, gerando um aumento de 60 % na sobrevivência dos animais. A nanoencapsulação da QN, ainda, permitiu a queda da parasitemia a partir do 1º dia de tratamento, o que não se observou com a administração da base livre (Figura 15).

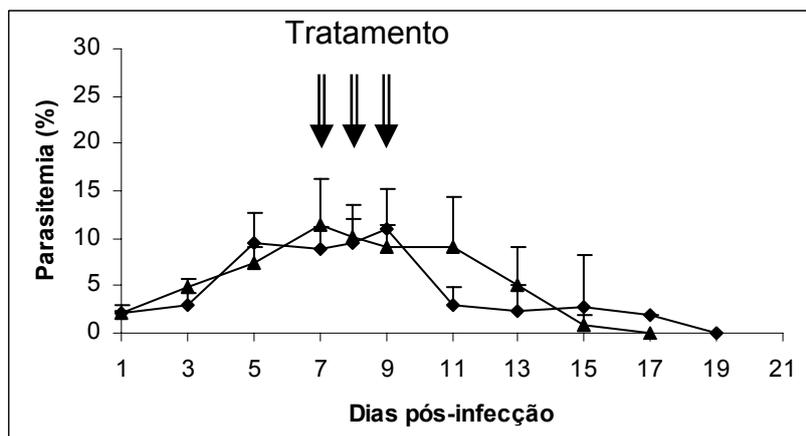


Figura 15. Parasitemia média obtida após o tratamento de ratos Wistar machos infectados com *P. berghei* pela via i.v., nas doses efetivas de QN encapsulada e não-encapsulada a cada 8 horas. (Média  $\pm$  D.P.) (n = 7/grupo). (-▲-) NC2-QN 25 mg/kg. (-◆-) QN livre 35 mg/kg.

A diminuição da parasitemia visualizada a partir do 1º dia de tratamento com as NC também ocorreu para o tratamento com a cloroquina livre, na dose de oral de 30 mg/kg/dia q12h nos dias 7-9 pós-inoculação (PEDRONI, 2005). A alta eficácia da cloroquina é explicada pelo seu mecanismo de ação, a inibição diretamente do processo de polimerização da ferroprotoporfirina IX. A alta concentração intracelular de cloroquina requerida para inibir a polimerização do heme é alcançada pelo caráter de base fraca do fármaco, que permite que ele seja acumulado em um fator de 1000 a 5000 vezes dentro do vacúolo alimentar do parasita (FOLEY e TILLEY, 1997). O acúmulo de ferroprotoporfirina IX mata, então, o parasita por meio de lesões oxidativas nas membranas, nas proteases digestivas e possivelmente em outras biomoléculas fundamentais (FOLEY e TILLEY, 1998). Então, os esquizotocidas sanguíneos quinolínicos, como a cloroquina, que se comportam como bases fracas, se concentram nos vacúolos alimentares dos plasmódios sensíveis, onde aumentam o pH, inibem a atividade peroxidativa do heme e interrompem a sua polimerização não-enzimática em hemozoína (FOLEY e TILLEY, 1998).

Os fármacos quinolinometanois como a QN são bases fracas que e encontram monoprotionadas em pH fisiológico, fator este que diminui o transporte intra-eritrocitário destes fármacos. Duas hipóteses podem explicar a ação das NC2-QN observado: as NC agem aumentando as concentrações plasmáticas do fármaco, aumentando, através do maior gradiente de concentração, a quantidade de fármaco dentro da hemácia; ou as NC ligam-se às hemácias, aumentando o nível intracelular de QN. Tais hipóteses podem ser testadas através da avaliação da farmacocinética plasmática da QN nanoencapsulada ou através da avaliação do nível eritrocitário de QN atingidos com a administração das NC.

Os sistemas nanoparticulados, em geral, têm demonstrado reduzir a dose efetiva e aumentar a sobrevida de diferentes fármacos utilizados em doenças infecciosas. Para a atovaquona, a nanoencapsulação melhorou a resposta do fármaco contra *L. infantum* (CAUCHETIER *et al.*, 2003a) e *T. gondii* (DALENÇON *et al.*, 1997; SORDET *et al.*, 1998). No estudo de DALENÇON e colaboradores (1997), as NC foram capazes de aumentar a sobrevivência dos animais em 80 %, na mesma dose. As PLA-NC preparadas por SORDET e colaboradores (1998) aumentaram em 75 % a sobrevida dos camundongos tratados. Para a atovaquona, a incorporação nestes sistemas carreadores foi capaz de aumentar a biodisponibilidade oral do fármaco, aumentando sua disponibilidade sobre as formas parasitárias intracelulares.

A atividade antileishmaniose da primaquina foi aumentada quando esta foi incorporada a nanocápsulas preparadas com PLA, em um fator de 3,3 vezes (RODRIGUES *et al.*, 1994), possivelmente devido a rápida captação das NC do plasma pelas células do sistema reticulo endotelial, como visto pelos mesmos autores em 1995, através de MET, onde, cerca de 120 minutos após a administração i.v. do fármaco, as nanopartículas já se encontravam dentro do vacúolo parasitóforo das formas amastigotas alojadas dentro das células de Kupffer do fígado.

Imediatamente após a administração i.v., as nanopartículas sofrem o processo de opsonização, quando são cobertas por diferentes proteínas plasmáticas, facilitando o reconhecimento destes complexos por algumas células do organismo, como os macrófagos, sendo, então, os nanocarreadores fagocitados e

armazenados no fígado e baço, onde são posteriormente degradados (PHINTO-ALPHANDARY *et al.*, 2000; OWEIS e PEPPAS, 2006). Logo, a habilidade das nanopartículas de serem captadas pelas células fagocitárias torna estes carreadores capazes de vetorizar fármacos que são utilizados em infecções cujas células hospedeiras são as que possuem capacidade fagocítica, destacando-se as infecções bacterianas e por protozoários.

O aumento da sobrevivência dos animais tratados com NC contendo QN na dose de 75 mg/kg/dia e a diminuição da dose efetiva em relação à QN base livre demonstram que a nanoencapsulação da QN pode trazer benefícios terapêuticos para o tratamento da malária. Os estudos conduzidos a seguir visam esclarecer o mecanismo pelo qual ocorre o aumento da efetividade da QN após a encapsulação.

### **5.6 Avaliação farmacocinética das nanocápsulas de quinina (NC2-QN)**

O estudo farmacocinético foi conduzido com a QN na forma livre e nanoencapsulada (NC2-QN), na dose de 25 mg/kg administrada pela via i.v. a ratos sadios e infectados com *P. berghei* a fim de comparar os perfis plasmáticos. Esta dose única foi escolhida por ser a dose com a qual obteve-se a cura de 100 % dos animais no protocolo de avaliação da eficácia, ou seja, 3 doses diárias de 25 mg/kg (75 mg/kg).

Em humanos, a farmacocinética da QN sofre influência de diferentes fatores como idade, gravidez, imunidade, raça, sensibilidade da cepa de *Plasmodium* e severidade da doença (WHITE *et al.*, 1982; WANWIMOLRUK *et al.*, 1991; PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1997). Recentemente, PEDRONI (2005) avaliou os parâmetros farmacocinéticos plasmáticos da QN após a administração a ratos jovens sadios e infectados com *P. berghei* com baixa e alta parasitemia. Observou-se uma tendência de redução do CL e aumento do Vd proporcionais ao nível parasitêmico. Diante desses resultados, a disposição plasmática da QN livre e nanoencapsulada foi avaliada em animais sadios e infectados com baixa parasitemia (entre 5,1 e 13,6 %), visando avaliar se a infecção também altera os parâmetros

farmacocinéticos da QN nanoencapsulada. Adicionalmente, foi objetivo avaliar se nanoencapsulação alteraria a distribuição da QN, justificando a sua maior efetividade em comparação com o fármaco livre.

As coletas de sangue após a administração intravenosa foram realizadas nos tempos 10 a 480 minutos. No entanto, a quantificação através de CLAE somente foi possível até 240 minutos. Para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, optou-se pela utilização da metade do valor do limite inferior de quantificação (25 ng/mL) quando observou-se pico de concentração inferior a esse valor. Os perfis de concentração plasmática para os diferentes grupos investigados estão mostrados na Figura 16. A visualização dos perfis plasmáticos de QN livre e NC2-QN mostra uma tendência de uma distribuição seguindo o modelo de 2 compartimentos para o fármaco livre, conforme relatado por Pedroni (2005) e um compartimento para o fármaco encapsulado. No entanto, como as concentrações plasmáticas foram passíveis de quantificação apenas até 240 min, uma modelagem compartimental não pode ser efetuada.

Os parâmetros farmacocinéticos médios, calculados a partir dos determinados individualmente através da abordagem não-compartimental, estão descritos na Tabela 17.

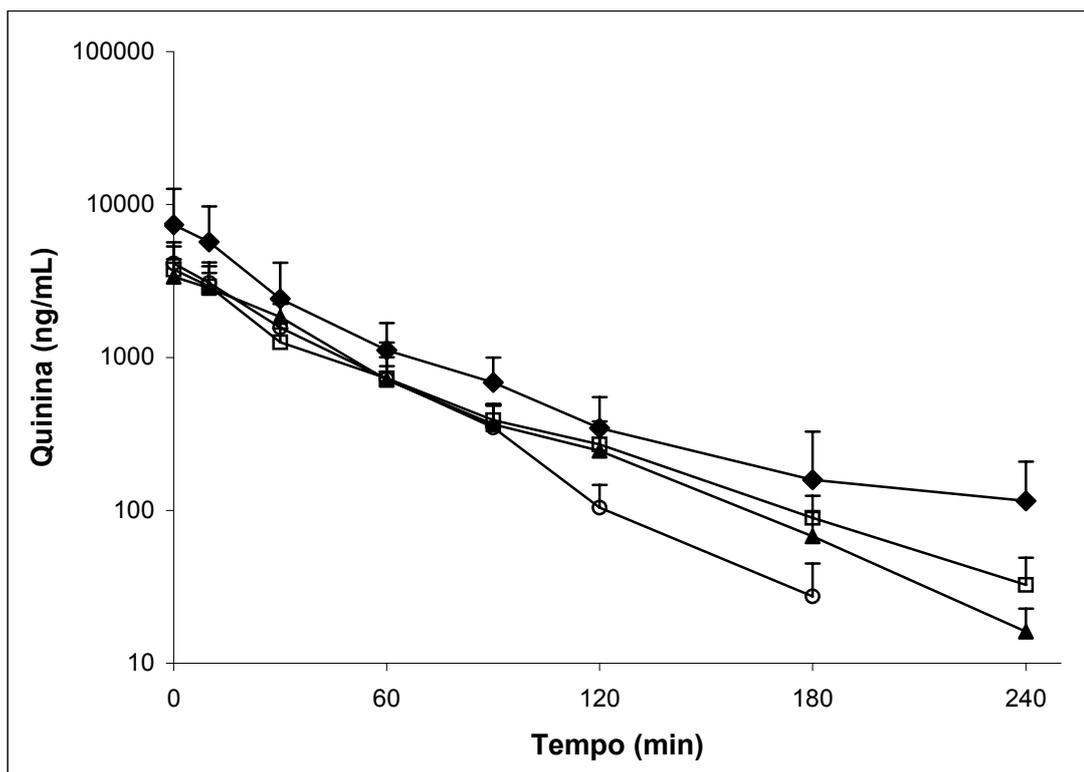


Figura 16. Perfis de concentração plasmática médios de QN livre e NC2-QN em animais sadios e infectados após uma dose de 25 mg/kg de fármaco através da via intravenosa (-♦-) QN livre-infetados (n = 5); (-○-) QN livre-sadios (n = 7); (-▲-) NC2-QN-infetados (n = 8); (-□-) NC2-QN-sadios (n = 10). (média + desvio padrão).

O percentual de extrapolação da  $ASC_{0-\infty}$  reflete se o tempo de coleta utilizado no desenho experimental foi adequado para permitir uma correta descrição da fase de eliminação do fármaco. Valores inferiores a 20 %, como os verificados em todos os grupos avaliados (Tabela 17), garantem que o período de coleta de até 240 minutos foi adequado para a caracterização da eliminação da QN e, conseqüentemente, para o cálculo da constante de velocidade de eliminação do fármaco.

Tabela 17. Parasitemia e parâmetros farmacocinéticos determinados após a administração de QN livre ou NC2-QN na dose de 25 mg/kg, i.v., a ratos Wistar sadios ou infectados com *P. berghei*.

Parâmetro	Animais sadios		Animais infectados com <i>P. berghei</i>	
	QN livre	NC2-QN	QN livre	NC2-QN
	(n = 7)	(n = 10)	(n = 5)	(n = 8)
$\lambda$ (min <sup>-1</sup> )	0,029 ± 0,007	0,017 ± 0,005	0,014 ± 0,008	0,022 ± 0,004
t <sub>1/2</sub> (min)	24,6 ± 5,4 *	42,4 ± 11,1	69,8 ± 44,6	32,9 ± 8,9 *
ASC <sub>0-∞</sub> (µg.min/mL)	138 ± 36 *	149 ± 33	278 ± 174	157 ± 30 *
ASMC <sub>0-∞</sub> (µg.mim <sup>2</sup> /mL)	4.50 ± 1.89	5.89 ± 1.38	10.93 ± 5.48	5.77 ± 1.43
% extrapolação da ASC	1,1 ± 3,7	1,5 ± 4,3	4,7 ± 6,3	0,5 ± 1,9
MRT (min)	34,9 ± 8,4 *	45,4 ± 10,5	56,9 ± 20	38,6 ± 6,3 *
CL <sub>total</sub> (L/h/kg)	11,5 ± 3,3 *	10,5 ± 2,6	7,1 ± 3,3	9,9 ± 2,1
Vd <sub>ss</sub> (L/kg)	6,6 ± 2,1	8,1 ± 3,1	6,6 ± 3,2	6,4 ± 2,0
Parasitemia (%)	-	-	6,8 ± 1,7	8,8 ± 4,8

\* diferença significativa em relação à QN livre- infectados ( $\alpha = 0,05$ )

Em relação ao fármaco livre, a presença do processo infeccioso alterou significativamente o t<sub>1/2</sub>, o MRT, a ASC e o CL da QN (Tabela 17). Os valores de t<sub>1/2</sub> (0,4 ± 0,1 h), ASC<sub>0-∞</sub> (138 ± 36 µg.min/mL), CL<sub>total</sub> (11,5 ± 3,3 L/h/kg) e Vd<sub>ss</sub> (6,6 ± 2,1 L/kg), para o grupo QN livre-sadios foram ligeiramente inferiores aos relatados na literatura, para a mesma dose, por WANWILMOLRUK e colaboradores (1993), que foram t<sub>1/2</sub> (0,8 ± 0,3 h), ASC<sub>0-∞</sub> (228 ± 66 µg.min/mL), CL<sub>total</sub> (6,9 ± 1,6 L/h/kg) e Vd<sub>ss</sub> (7,7 ± 3,0 L/kg), respectivamente. Naquele estudo, entretanto, foram utilizados ratos Wistar com peso médio de 314 ± 20 g, bastante acima dos utilizados no presente trabalho (147 ± 9 g). A idade é um fator que influencia a farmacocinética da QN em humanos, uma vez que em indivíduos idosos, em relação a adultos e crianças, a QN apresenta uma tendência a prolongamento do t<sub>1/2</sub>, em virtude da diminuição do CL hepático (WANWIMOLRUK *et al.*, 1991). Esses dados não estão disponíveis na literatura para roedores, mas os resultados apresentados indicam essa tendência.

PEDRONI (2005) avaliou a dose de 50 mg/kg de QN administrada a ratos sadios com a mesma idade dos animais utilizados no presente estudo, e obtiveram valores de  $t_{1/2}$  ( $4,1 \pm 3,1$  h),  $ASC_{0-\infty}$  ( $693 \pm 429$   $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ ),  $CL_{\text{total}}$  ( $5,4 \pm 2,1$  L/h/kg),  $Vd_{\text{ss}}$  ( $15,1 \pm 4,5$  L/kg), diferentes dos observados para a dose de 25 mg/kg. Como a ligação às proteínas plasmáticas é concentração-dependente (JOUAN *et al.*, 2005; PEDRONI, 2005), pode-se atribuir a esse fator a não-linearidade farmacocinética observada para as doses de 25 e 50 mg/kg. PEDRONI (2005) observou que a fração livre de QN em plasma de ratos jovens sadios variou de  $29,2 \pm 0,4$  % a  $43,3 \pm 0,2$  % para as concentrações de 1 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Logo, em baixas concentrações, como as obtidas neste estudo com a dose de 25 mg/kg, espera-se um aumento da ligação do fármaco às proteínas, com conseqüente diminuição da fração livre, o que leva a diminuição de  $Vd_{\text{ss}}$ . O aumento do  $CL_{\text{total}}$  da dose de 50 para 25 mg/kg ( $5,4 \pm 2,1$  para  $11,5 \pm 3,3$  L/h/kg) pode ser atribuído a saturação do processo de eliminação da QN com a maior dose, uma vez que a QN, que é um fármaco de baixa extração hepática, tem seu metabolismo dependente da atividade enzimática intrínseca do citocromo P450 (SHARGEL *et al.*, 2005).

A infecção malárica influenciou a disposição da QN livre. Os animais com parasitemia de  $6,8 \pm 1,7$  % apresentaram um aumento significativo em relação aos sadios do  $t_{1/2}$  do ( $24,6 \pm 5,4$  min para  $69,8 \pm 44,6$  min), em decorrência da diminuição significativa do  $CL_{\text{total}}$  (de  $7,1 \pm 3,3$  para  $11,5 \pm 3,3$  L/h/kg) ( $\alpha = 0,05$ ). Não existem experimentos descritos na literatura utilizando a QN, na mesma dose e via, administrada a ratos infectados que permitam a comparação com os resultados obtidos neste trabalho.

A quinina administrada na forma livre apresentou alta variabilidade nos perfis plasmáticos, o que pode ter contribuído para a falta de diferença significativa de alguns parâmetros determinados para animais sadios e infectados. Esta alta variabilidade foi relatada previamente (NEWTON *et al.*, 1999; KRISHNA *et al.*, 2001; PEDRONI, 2005). Como a QN é metabolizada predominantemente pelo sistema CYP4503A4, e a expressão deste sistema exibe considerável variação interindividual em humanos (entre 10 e 60 % da atividade hepática total do citocromo P450), fatores genéticos podem ser os responsáveis pela alta variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos da QN, de acordo como observado por GONZALES

*apud* KRISHNA e colaboradores (2001)<sup>6</sup>. Como os ratos Wistar não são isogênicos (WAYNFORTH e FLECKNELL, 1994), grande variabilidade na metabolização da QN também pode ser esperada.

Os parâmetros farmacocinéticos da QN nanoencapsulada não foram estatisticamente diferentes dos obtidos para o fármaco livre, em animais sadios (Tabela 17). Em ratos com malária, no entanto, as NC2-QN alteraram a eliminação plasmática da QN, pois observou-se uma diminuição estatisticamente significativa no  $t_{1/2}$  para os animais que receberam as NC2-QN em relação ao grupo que recebeu o fármaco livre em solução.

A alteração dos parâmetros farmacocinéticos de alguns fármacos após a nanoencapsulação é variável. NC lipídicas contendo ibuprofeno aumentaram a ASC e o  $t_{1/2}$  do fármaco em 16 e 19 %, respectivamente, após a administração intravenosa a ratos (LAMPRECHT *et al.*, 2004). A halofantrina, fármaco antimalárico, quando incorporado em NC de PLA obteve um aumento 6 vezes na  $ASC_{0,5-70h}$  em relação ao fármaco livre. Esse aumento deveu-se a uma diminuição significativa do CL do fármaco quando nanoencapsulado, uma vez que o fármaco livre é rapidamente removido da circulação e, quando em NC, sua liberação para o sangue ocorre de forma lenta (MOSQUEIRA *et al.*, 2004).

A diminuição estatisticamente significativa do  $t_{1/2}$  da QN nanoencapsulada em relação ao fármaco livre ( $69,8 \pm 44,6$  *versus*  $32,9 \pm 8,9$  min) reflete a tendência de aumento do  $CL_{total}$  observado com a utilização dos sistemas nanoparticulados (de  $7,1 \pm 3,3$  para  $9,9 \pm 2,1$  L/h/kg) que, no entanto, não se mostrou significativa ( $\alpha = 0,05$ ). Após a administração intravenosa de nanopartículas poliméricas, estas sofrem o processo de opsonização que permite que esses sistemas estranhos ao organismo sejam reconhecidos pelas células do SRE e rapidamente removidos da

---

<sup>6</sup> Gonzáles, F.J.; IDLE, J.R. Pharmacogenetic phenotyping and genotyping. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 26, p. 59-70, 1994 *apud* KRISHNA, S.; NAGARAJA, N.V.; PLANCHE, T.; AGBENYEGA, T.; BEDO-ADDO, G.; ANSONG, D.; OWUSU-OFORI, A.; SHROADS, A.; HENDERSON, G.; HUTSON, A.; DERENDORF, H.; STACPOOLE, P.W. Population pharmacokinetics of intramuscular Quinine in children with severe malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 1803-1809, 2001.

circulação sangüínea em direção ao baço e fígado (GREF *et al.*, 1995; OWEIS e PEPPAS, 2006). Esse rápido *clearance* das NC2-QN do plasma para o principal órgão de metabolização da QN, o fígado, pode ser o processo responsável pelo aumento do  $CL_{total}$  do fármaco em relação a sua forma livre. Embora o fármaco nanoencapsulado tenha sido eliminado mais rapidamente do que a sua forma livre, as NC2-QN levaram a um aumento da eficácia da QN conforme previamente demonstrado, diminuindo em 30 % a efetiva em relação ao fármaco livre.

A nanoencapsulação da QN diminuiu a variabilidade farmacocinética em relação a administração da forma livre, no mesmo grupo de animais infectados com baixa parasitemia. O coeficiente de variação percentual (CV %) dos parâmetros farmacocinéticos determinados foi diminuído em cerca de 2 a 3 vezes com a administração das NC2-QN em relação ao fármaco livre. Para a  $ASC_{0-\infty}$ , por exemplo, o CV % alcançou valores de 62,4 % para a QN livre contra 19,2 % quando o fármaco foi administrado nas NC2-QN.

A diminuição na meia-vida de eliminação da quinina observado após a administração do fármaco nanoencapsulado em relação a sua administração na forma livre se opõe à melhora da eficácia da quinina observada com as NC2-QN, uma vez que redução da meia-vida implica em eliminação do fármaco mais rapidamente da corrente circulatória. Ao mesmo tempo, não se observou alteração no volume de distribuição do fármaco, levando a conclusão que a alteração na farmacocinética plasmática observada não é a responsável pelo fenômeno observado.

### 5.7 Avaliação da ligação da quinina aos eritrócitos

Como a hipótese de que as nanopartículas (NC2-QN) aumentariam os níveis plasmáticos de QN e, com isso sua eficácia não se confirmou, investigou-se a possibilidade das nanocápsulas aumentarem a ligação do fármaco aos eritrócitos. Como a QN possui ação intra-eritrocitária a nanoencapsulação poderia estar alterando sua interação com os eritrócitos.

A distribuição da QN entre os eritrócitos e o meio tamponado foi medida após alcançar a situação de equilíbrio entre os dois meios. Foram avaliadas 3 tempos de incubação: 15, 30 e 45 min, sendo que as concentrações quantificadas em ambos os meios mantiveram-se constantes após 30 min, logo, escolheu-se incubar a suspensão de eritrócitos com o fármaco durante 30 min.

O coeficiente de ligação da QN livre em eritrócitos sadios foi de  $4,1 \pm 0,6$  e de  $4,01 \pm 0,15$  para as NC2-QN (Tabela 18). Nas células sadias, o comportamento da QN não foi alterado pela forma de administração do fármaco. Em eritrócitos infectados, no entanto, coeficiente de ligação da QN foi de  $3,03 \pm 0,07$  e  $6,3 \pm 0,25$  para o fármaco livre e nanoencapsulado, respectivamente. Logo, a nanoencapsulação dobrou o D comparado com o fármaco livre em eritrócitos infectados, o que pode explicar a melhora na eficácia nas NC2-QN em relação ao fármaco livre.

O aumento de 30% na eficácia da QN quando utilizada como NC2-QN observado em ratos infectados com *P. berguei* pode ser atribuído ao aumento da concentração intracelular da QN nos eritrócitos. Entretanto, não foi possível demonstrar se o aumento de ligação é devido a bioadesão das NC à membrana do eritrócito, facilitando a penetração intracelular do fármaco, se as nanoestruturas atravessam a membrana celular ou se ambos mecanismos ocorrem em paralelo.

Tabela 18. Coeficiente de ligação da QN e da NC2-QN aos eritrócitos

Coeficiente de ligação (D)	QN livre	NC2-QN
Eritrócitos sadios	$4,1 \pm 0,60$	$3,03 \pm 0,07$
Eritrócitos infectados com <i>P. berguei</i>	$3,03 \pm 0,07$	$6,3 \pm 0,25^*$

\* diferença significativa em relação ao fármaco livre ( $\alpha = 0,05$ ).

Neste trabalho, objetivou-se desenvolver uma formulação de NC de QN que apresentasse em modelo de infecção experimental por *P. berghei*, um aumento da eficácia do fármaco. A partir das diferentes formulações desenvolvidas e testadas *in vivo*, pode-se observar que as NC com alto teor de fármaco (3 e 4 mg/mL) mostraram-se limitadas para a administração i.v., além de apresentarem estabilidade reduzida. A formulação contendo QN na concentração de 2 mg/mL (NC2-QN) foi

adequada para administração i.v. e reduziu a dose efetiva de QN em 30 %. O mecanismo pelo qual a nanoencapsulação aumenta a eficácia do fármaco no modelo de infecção utilizado foi devido ao aumento da penetração eritrocitária da QN.

Os resultados deste trabalho permitiram demonstrar que a nanoencapsulação pode ser uma alternativa para melhorar a eficácia da QN no tratamento da malária, uma vez que a utilização deste fármaco tem sido retomada devido ao aumento da resistência do *P. falciparum* à cloroquina. Ao mesmo tempo, os resultados deixaram novos questionamentos que necessitam de investigação, como a comprovação da diminuição da toxicidade da QN após a nanoencapsulação e a eficácia da administração oral das NC2-QN. O aprofundamento da avaliação biológica faz parte das perspectivas de continuação desse trabalho.



## **6. CONCLUSÕES**

---



- Foi possível obter nanocápsulas contendo quinina com concentrações de 2 a 4 mg/mL através do método de nanoprecipitação. As formulações contendo 3 e 4 mg/mL de quinina, no entanto, não se apresentaram adequadas para uso *in vivo*, devido a baixa estabilidade, ao aumento da toxicidade quando administrado através da via intravenosa (NC4-QN) ou intravenosa e intraperitoneal (NC3-QN);
- A formulação NC2-QN apresentou características adequadas para a administração intravenosa da quinina, sendo estável à temperatura ambiente por até 21 dias após a preparação;
- A nanoencapsulação da quinina (NC2-QN) diminuiu a dose efetiva necessária para curar 100 % dos animais infectados experimentalmente com *Plasmodium berghei* em cerca de 30 %, de 105 mg/kg/dia de quinina livre para 75 mg/kg/dia de fármaco nanoencapsulado;
- A formulação NC2-QN aumentou em quase 60 % a sobrevivência dos animais infectados com *Plasmodium berghei*, quando comparada com o fármaco livre na mesma dose (75 mg/kg/dia);
- A nanoencapsulação da quinina (NC2-QN), em animais infectados com *Plasmodium berghei*, diminuiu o tempo de meia-vida do fármaco em relação a sua forma livre, devido a uma tendência de aumento do *clearance* total do fármaco livre em relação ao fármaco nas NC2-QN.
- A nanoencapsulação da QN dobrou o coeficiente de ligação da QN aos eritrócitos infectados por *P. berghei* em relação ao fármaco livre, sendo que provavelmente o mecanismo responsável pelo aumento da eficácia do fármaco quando administrado como NC2-QN observado no modelo animal.



## 7. REFERÊNCIAS

---



- ANDERS, R.F.; SAUL, A. Malaria vaccines. *Parasitology Today*, v. 16, p. 444-447, 2000.
- ASHLEY, E.A.; WHITE, N.J. Artemisinin-based combinations. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 18, p. 531–536, 2005.
- BJORKMAN, A. Malaria associated anaemia, drug resistance and antimalarial combination therapy. *International Journal for Parasitology*, v. 32, p. 1637–1643, 2002.
- BONINGTON, A., DAVIDSON, R.N., WINSTANLEY, P.A., PASVOL, G. Fatal quinine cardiotoxicity in the treatment of falciparum malaria. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, p. 305–07, 1990.
- BOOTZ, A.; VOGEL, V.; SCHUBERT, D.; KREUTER, J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *European Journal Pharmaceutical and Biopharmaceutical*. v. 57, n. 2, 369-75, 2004.
- BRAGA, E.M.; FONTES, C.J.F. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 10ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- BRASIL, Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02/06/2003.
- BROCKS, D.R.; MEHVAR, R. Stereoselectivity in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the chiral antimalarial drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 42, n. 15, p. 1359-1382, 2003.
- CALVO, P.; ALONSO, M.J.; VILA-JATO, J.L.; ROBINSON, J.R. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology*, v. 48, p. 1147-52, 1996.
- CALVO, P.; REMUÑAN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. *Colloid & Polymer Science*, v. 275, n. 1, p. 46-53, 1997a.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 153, p. 41-50, 1997b.
- CAMPOS, A. M.; SÁNCHEZ, A.; GREF, R. CALVO, P.; ALONSO, M. J. The effect of PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 20, p. 73-81, 2003.
- CASTAING, M.; BROUANT, P.; LOISEAU, A.; SANTELLI-ROUVIER, C.; SANTELLI, M.; ALIBERT-FRANCO,; MAHAMOUD, A.; BARBE, V. Membrane permeation by multidrug-resistance-modulators and non-modulators: effects of hydrophobicity and electric charge. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 52, n. 3, p. 189-196, 2000.
- CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro

- characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 250, p. 273-281, 2003b.
- CAUCHETIER, E.; PAUL, M.; RIVOLLET, D.; FESSI, H.; ASTIER, A.; DENIAU, M. Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated atovaquone in the treatment of murine leishmaniasis. *International Journal of Parasitology*, v. 30, p. 777-783, 2000.
- CAUCHETIER, E.; PAUL, M.; RIVOLLET, D.; FESSI, H.; ASTIER, A.; DENIAU, M. Therapeutic evaluation of free and nanocapsule-encapsulated atovaquone in the treatment of murine visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 97, n. 3, p. 259-268, 2003a.
- CCAC - Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Olfert, E.D.; Cross, B.M.; McWilliam A.A. (Eds.), v. 1, 1993. Acessado em abril de 2005. Disponível em <http://www.cca.ca>.
- CHANG, K-H.; STEVENSON, M. M. Malarial anemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *International Journal of Parasitology*, v. 34, p. 1501-1516, 2004.
- CHIMANUKA, B.; GABRIËLS, M.; DETAEVERNIER, M. R.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. A. Preparation of  $\beta$ -artemether liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing recrudescence parasitaemia in *Plasmodium chabaudi* malaria-infected mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 13-22, 2002.
- CHMURZYNSKI, L. High-performance liquid chromatographic determination of quinine in rat biological fluids. *Journal of Chromatography B Biomedical Science Applications*, v. 693, p. 423-429, 1997.
- COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.
- COUVREUR, P.; FATTAL, E.; ANDREMONT, A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. *Pharmaceutical Research*, v. 8, n. 9, p. 1079-1086, 1991.
- DALENÇON, F.; AMJAUD, Y.; LAFFORGUE, C.; DEROUIN, F.; FESSI, H. Atovaquone and rifanbutine-loaded nanocapsules: formulation studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 153, p. 127-130, 1997.
- DAVIS, T.M.E.; WHITE, N.J.; LOOREESUWAN, S.; SILAMUT, K.; WARRELL, D.A. Quinine pharmacokinetics in cerebral malaria: predicted plasma concentrations after rapid intravenous loading using a two-compartment model. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 542-547, 1988.
- GIBALDI, M., PERRIER, D. Pharmacokinetics. 2° ed. V. 15, New York: Marcel Dekker, 1982.

- DERENDORF, H.; GARRET, E. Pharmako-kinetik einfuhrung in die Theorie und Relevanz fur die Arzneimitteltherapie. Stuttgart:Wiss. Verl-Ges., 1987.
- DURAND, R.; PAUL, M.; RIVOLLET, D.; HOUIN, R.; ASTIER, A. ; DENIAU, M. Activity of pentamidine-loaded methacrylate nanoparticles against *Leishmania infantum* in a mouse model. *International Journal of Parasitology*, v. 27, p. 1361-1361, 1997.
- LASIC, D.D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 307-321, 1998.
- DYSON, E.H.; PROUDFOOT, A.T.; PRESCOTT, L.F.; HEYWORTH, R. Death and blindness due to overdose of quinine. *British Medical Journal*, v. 291, p. 31-33, 1985.
- EYTAN, G. D.; REGEV, R.; OREN, G.; ASSARAF, Y. G. The role of passive transbilayer drug movement in multidrug. resistance and its modulation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 22, p. 12897–12902, 1996.
- FALLOUH, A. AL K.; ROBLOT-TREUPEL, L.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. PH.; PUISIEUX, F. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 28, p. 125-132, 1986.
- FATTAL, E.; YOUSSEF, M.; COUVREUR, P.; ANDREMONT, A. Treatment of Experimental Salmonellosis in Mice with Ampicillin-Bound Nanoparticles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 33, n. 9, p. 1540-1543, 1989.
- FDA – Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation, may 2001. Acessado em setembro de 2006. Disponível em <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
- FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Delivery and Industrial Pharmacy*, v. 24, n. 11, p. 979-993, 1998.
- FERDING, M.T.; COOPER, R.A.; MU, J.; DENG, B.; JOY, D.A.; SU, X.; WELLEMS, T. Dissecting the loci of low-level quinine resistance in Malaria parasites. *Molecular Microbiology*, v. 52, n. 4, p. 985–997, 2004.
- FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; PUISIEUX, F.; Procédé de préparation dès systèmes colloïdaux dispersibles d’une substance sous forme de nanocapsules. *European Patent*, 0274961 A1, 1988.
- FLANAGAN, K.L.; BUCKLEY-SHARP, M.; DOHERTY, T.; WHITTY, C.J.M. Quinine levels revisited: the value of routine drug level monitoring for those on parenteral therapy. *Acta Tropica*, v. 97, p. 233–237, 2006.
- FLOYD, A.G.; JAIN, S. Injectable emulsions and suspensions. *In*: LIEBERMAN, H.A.; RIEGER, M. BANKER, G.S. Pharmaceutical dosage forms: disperse systems. V.3, 2<sup>o</sup> edição, Marcel Dekker, 1998.
- FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. *International Journal for Parasitology*, v. 27, n. 2, p. 231-246, 1997.
- FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance

and prospects for new agents. *Pharmacological Therapeutics*, v. 79, n. 1, p. 55-87, 1998.

FRESTA, M.; CAVALLARO, G.; GIAMMONA, G.; WEHRLI, E.; PUGLISI, G. Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. *Biomaterials*, v. 17, p. 751-758, 1996.

GASPAR, R.; OPPERDOES, F. R.; PRÉAT, V.; ROLAND, M. Drug targeting with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: *in vitro* activity of primaquine-loaded nanoparticles against intracellular *Leishmania donovani*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 86, n. 1, p. 41-19, 1992.

GIBALDI, M., PERRIER, D. Pharmacokinetics. 2° ed. V. 15, New York: Marcel Dekker, 1982.

GREENWOOD, B. M.; BOJANG, K.; WHITTY, J.M.; TARGETT, G.A.T. Malaria. *Lancet*, v. 365, p. 1487-98, 2005.

GRAF, R.; DOMB, A.; QUELLEC, P.; BLUNK, T. ; MULLER, R.H. ; VERBAVATZ, J. ; LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 16, p. 215-233, 1995.

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

GUTERRES, S.S.; WEISS, V.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. *Drug Delivery*, v.7, p. 195-199, 2000.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Sciences*, v. 6, p. 319-327, 2002.

HEURTAULT, B.; LEGRAND, P.; MOSQUEIRA, M.; DEVISSAGUET, J. P.; BARRATT, G. The antileishmanial properties of surface-modified, primaquine-loaded nanocapsules tested against intramacrophagic *Leishmania donovani* amastigotas *in vitro*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 95, n. 5, p. 529-533, 2001.

ICH Harmonized tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. United States of America, 1996.

JAEGER, A. Quinine and Chloroquine: poisonous substances. *Medicine*, p. 71-72, 2003.

JANDL, J. H. Blood textbook of hematology, 2ª edição, Boston Little, Brown and company, 1996.

JOUAN 2005, Quinine pharmacokinetics and pharmacodynamics in children with malaria caused by *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 3658-3662, 2005.

- KANEKO, A.; NISHIYAMA, T. As drogas e os parasitas. In: PAGE, C.; CURTIS M.; SUTTER, M.; WALKER, M.; HOFFMAN, B. Farmacologia Integrada. 2ª ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2004.
- KOROLKOVAS, A FRANÇA, F. F. A. C. Dicionário terapêutico Guanabara, ed. 2004/2005, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.
- KRISHNA, S.; NAGARAJA, N.V.; PLANCHE, T.; AGBENYEGA, T.; BEDO-ADDO, G.; ANSONG, D.; OWUSU-OFORI, A.; SHROADS, A.; HENDERSON, G.; HUTSON, A.; DERENDORF, H.; STACPOOLE, P.W. Population pharmacokinetics of intramuscular Quinine in children with severe malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 1803-1809, 2001.
- LAMPRECHT, A. ; SAUMET, J.L. ; ROUX, J. ; BENOIT, J.P. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 407-414, 2004.
- LEAL, O.; LEAL, E.A.S.; JUNIOR, F.R.P.B.; PAEZ, M.L.T.; TEODOSIO, T.; TAVARES-NETO, J. Clinical-parasitological response to treatment with quinine associated to doxycycline in uncomplicated falciparum malaria. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 6, p. 751-754, 2003.
- LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. *S. T. P. Pharma Sciences*, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.
- LLANOS, C.; FLÓREZ, M.H.; HERRERA, M.A.; HERRERA, S. Mecanismos de generación de anemia em malaria. *Colombia Médica*, v. 35, n. 4, p. 205-214, 2004.
- LOIOLA, C.C.P.; SILVA, C.J.M. da; TAUILL, P.L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Pan American journal of public health*, v. 11, n. 4, p. 235-244, 2002.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *S. T. P. Pharma Sciences*, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.
- MILLER, L.H.; BARUCH, D.I.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. V. 415, p. 673-679, 2002.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*, v. 22, p. 2967-2979, 2001.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; LEGRAND, P.; DEVISSAGUET, J. P.; BARRATT, G. Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in *Plasmodium berguei*-infected mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 4, p. 1222-1228, 2004.
- NAKAMURA, M.; TSUJII, K.; KATSURAGI, Y.; KURIHARA, K.; SUNAMOTO, J. Taste receptor proteins directly extracted by liposome from intact epithelium of bullfrog tongue. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v.201, p. 415-422, 1994.

- NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- NEWTON, P.; KEERATITHAKUL, D.; TEJA-ISAVADHARM, P.; PUKRITTAYAKAMEE, S. ; KYLE, D. ; WHITE, N. Pharmacokinetics of quinine and 3-hydroxyquinine in severe falciparum malaria with acute renal failure. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, p. 69-72, 1999.
- NEWTON, P.N.; WARD, S.; ANGUS, B.J.; CHIERAKUL, W.; DONDORP, A.; RUANGVEERAYUTH, R.; SILAMUT, K.; TEERAPONG, P.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J. Early treatment failure in severe malaria resulting from abnormally low plasma quinine concentrations. *The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 100, p. 184-186, 2006.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. Malaria. Fact Sheet N° 94 (online) Washington: WHO; 2005. Acessado em setembro de 2005. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
- OMS – Organização Mundial da Saúde. Malaria. Guidelines for the treatment of malaria, 2006. World Health Organization, disponível em [www.WHO/HTM/MAL/2006.1108](http://www.WHO/HTM/MAL/2006.1108).
- OWAIS, M.; VARSHNEY, G.; CHOUDHURY, A.; CHANDRA, S.; GUPTA, C. Chloroquine encapsulated in malaria-infected erythrocyte-specific antibody-bearing liposomes effectively controls chloroquine-resistant *Plasmodium berguei* infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, n. 1, p. 180-184, 1995.
- OWENS, D.E.; PEPPAS, N.A.; Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 307, p. 93-102, 2006.
- Organização Panamericana de Saúde (OPAS - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION), 26th PAN AMERICAN SANITARY CONFERENCE, Washington, USA, CSP26/INF/3 (Eng.), STATUS REPORT ON MALARIA PROGRAMS IN THE AMERICAS, 2002.
- PEDRONI, H. C. Desenvolvimento de modelo de malária experimental em ratos Wistar e avaliação da influência da infecção no perfil farmacocinético e na distribuição tecidual da quinina. 2005. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- PEDRONI, H. C.; BETTONI, C. C.; SPALDING, S. M.; DALLA COSTA, T. *Plasmodium berghei*: development of as irreversible experimental malaria model in Wistar rats. *Experimental Parasitology*, v. 113, n. 3, p. 193-196, 2006.
- PERI, I.; MAMRUD-BRAINS, H.; RODIN, S.; KRIZHANOVSKY, V.; SHAI, Y.; NIR, NIR, S.; NAIM, M. Rapid entry of bitter and sweet tastants into liposomes and taste cells: implications for signal transduction. *American Journal of Physiological cellular*, v. 278, p. C17-C25, 2000.
- PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 13, p. 155-168, 2000.

- PLANCHE, T.; KRISHNA, S. The relevance of malaria pathophysiology to strategies of clinical management. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 18, p. 369-375, 2005.
- PREGO, C.; GARCÍA, M.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Transmucosal macromolecular drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 101, p. 151-162, 2005.
- PUKRITTAYAKAMEE, S.; LOOAREESUWAN, S.; KEERATITHAKUL, D.; DAVIS, T.M.; TEJA-ISAVADHARM, P.; NAGACHINTA, B.; WEBER, A.; SMITH, A.L.; KYLE, D.; WHITE, N.J. A study of the factors affecting the metabolic clearance of quinine in malaria. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 52, 487-493, 1997.
- QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion Technique. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 7, p. 1056-1062, 1998.
- RAO, G. C. S.; KUMAR, M. S.; MATHIVANAN, N.; RAO, M. B. E. Nanosuspensions as the most promising approach in nanoparticles drug delivery systems. *Pharmazie*, v. 59, p. 5-9, 2004.
- REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3<sup>o</sup> ed, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001.
- REYNOLDS, J. E. F. Martindale the Extra Pharmacopoeia. Londres: Pharmaceutical Press, 30 ed, 1999.
- RIDLEY, R. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, v. 415, p. 686-693, 2002.
- RODRIGUES, J. M. JR.; CROFT, S. L.; FESSI, H.; BORIES, C.; DEVISSAGUET, J. P. The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly (d,l-lactide) nanoparticles in *Leishmania donovani* infected. *Tropical Medicine and Parasitology*, v. 45, n. 3, p. 223-228, 1994.
- RODRIGUES, J. M. JR.; FESSI, H.; BORIES, C.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Primaquine-loaded poly(lactide) nanoparticles: physicochemical study and acute tolerance in mice. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 126, p. 253-260, 1995.
- ROSENTHAL, P.J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches, *Journal of Experimental Biology*, v.206, p. 3735-3744, 2003.
- RUXIN, J.; PALUZZI, J.E.; WILSON, P.A.; TOZAN, Y.; KRUK, M. TEKLEHAIMANOT, A. Emerging consensus in HIV/AIDS, malaria, tuberculosis, and access to essential medicines. *Lancet*, v. 365, p. 618-21, 2005.
- SAMUELSON, J. Doenças infecciosas. In: ROBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR V. *Fundamentos de Robbins – Patologia Estrutural e Funcional*. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.
- SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.

- Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; FREITAS, L.L.; GUTERRES, G.G. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 21, p. 99-106, 2002.
- SCHALKWYK, D.A.V.; EGAN, T.J. Quinoline-resistance reversing agents for the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Drug Resistance Updat*, v.9, p. 211-26, 2006.
- SEBBEN, M.; MERTINS, O.; POHLMANN, A.; SILVEIRA, N.P. Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compostas de lecitina de soja e quitosana. *Espaço Química*, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2004.
- SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*, 5ª ed. United States of America, The McGraw-Hill, 2005.
- SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R., TREHAN, A; Poly-E-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 1-23, 2004.
- SMITH, A. (Ed) – THE MERCK INDEX. 13ª ed., New Jersey, 2001.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.
- SORDET, F.; AUMJAUD, Y.; FESSI, H.; DEROUIN, F. Assessment of the activity of atovaquone-loaded nanocapsules in the treatment of acute and chronic murine toxoplasmosis. *Parasite*, v.5, p. 223-229, 1998.
- SUH, K. N.; KAIN, K. C.; KEYSTONE, J.S. Malaria. *Journal of the Canadian Medical Association*, v. 170, n. 11, p. 1693-702, 2004.
- SULLIVAN, D. J. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *International Journal for Parasitology*, v. 32, p. 1645-1653, 2002.
- SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil 2005, Brasília-DF, 2005.
- SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico da Malária nº 2 – dezembro de 2003, Brasília-DF, 2003.
- TANGE, R.A.; DRESCHLER, W.A.; CLAESSEN, F.A.P.; PERENBOOM, R.M. Ototoxic reactions of quinine in healthy persons and patients with *Plasmodium falciparum* infection. *Auris Nasus Larynx*, v. 24, p. 131-136, 1997.

TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários: Malária. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E. (Ed.) Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003.

TRAMPUZ, A.; JEREB, M.; MUZLOVIC, I.; PRABHU, R.M.; Clinical review: severe malaria. *Critical Care*, v. 7, n. 4, p. 315-323, 2003.

USP 2004. The United State Pharmacopeia. 27 ed. Rockville: United State Pharmacopeia Convention, 2004.

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

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

WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P.A. Experimental and surgical technique in the rat. 2<sup>o</sup> edition, London, Academic Press, 1994.

WHITE, N.J.; LOOAREESUWAN, S.; WARRELL, D.A.; WARRELL, M.J.; BUNNAG, D.; HARINASUTA, T. Quinine pharmacokinetics and toxicity in cerebral and uncomplicated *Falciparum* malaria. *American Journal of Medicine*, v. 73, p. 564-572, 1982.

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

WOHLGEMUTH, M.; MACHTLE, W.; MAYER, C. Improved preparation and physical studies of polybutylcyanoacrylate nanocapsules. *Journal of Microencapsulation*, v. 17, p. 437, 2000.

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A.L.; WESNSDORFER, W.H.; MESHNICK, S.R. Epidemiology of drug-resistant malaria. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 209-218, 2002.

ZALIS, M.G.; MARIANA, L.P.; SILVEIRA, S.; MILHOUS, W.K.; WIRTH, D.F. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 58, n. 5, p. 630-637, 1998.







### Validação de método analítico para o doseamento das NC-QN

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em uma determinada matriz (BRASIL, 2003; USP, 2004).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). Na faixa de 1-12,5  $\mu\text{g/mL}$ , a quantificação da QN foi linear, o que pode ser visualizado pelo Figura 1.1, sendo o coeficiente de correlação superior a 0,99, de acordo com os guias de validação vigentes (ICH, 1996; BRASIL, 2003). Segundo a análise de variância, verificou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ( $p < 0,05$ ).

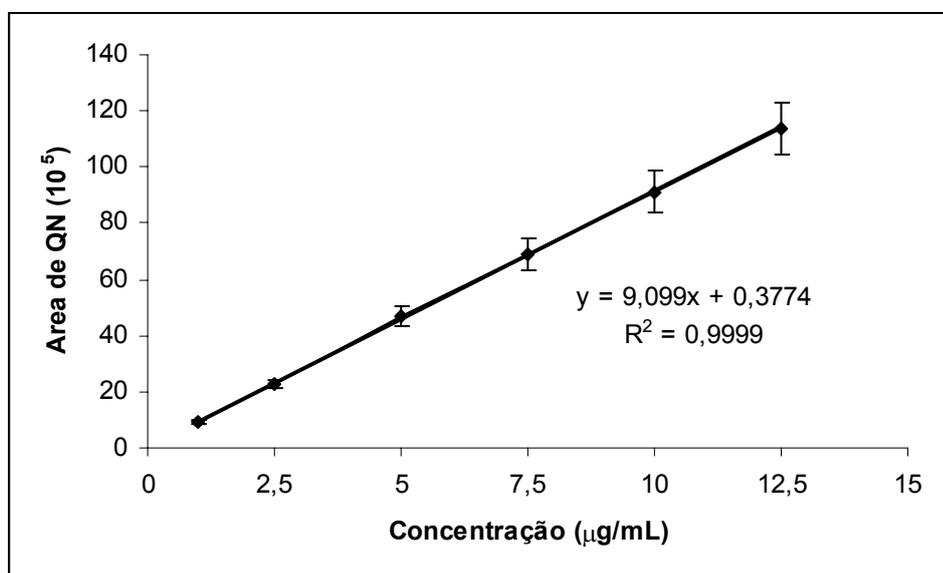


Figura 1.1. Representação gráfica da curva média de QN, quantificada através de CLAE (n = 9 determinações por ponto).

Para um método analítico, a exatidão significa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

Foram preparadas amostras de NC batizadas, resultando em concentrações finais de 6, 7 e 8 µg/mL. Como observado na Tabela 1.1, os valores percentuais QN recuperados a partir das soluções-amostra encontram-se dentro dos intervalos permitidos (ICH, 1996).

Tabela 1.1. Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento da QN em nanocápsulas (n = 6).

<b>Concentração de QN (µg/mL)</b>	<b>Dia 1 Conc. ± DP (exatidão %)</b>	<b>Dia 2 Conc. ± DP (exatidão %)</b>	<b>Dia 3 Conc. ± DP (exatidão %)</b>
<b>6,00</b>	5,98 ± 0,04 (99,6)	5,99 ± 0,04 (100,0)	6,01 ± 0,04 (100,3)
<b>7,00</b>	6,96 ± 0,05 (99,4)	6,91 ± 0,04 (98,6)	5,94 ± 0,04 (100,0)
<b>8,00</b>	8,05 ± 0,03 (101,3)	8,06 ± 0,1 (101,7)	8,05 ± 0,06 101,2

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão intra-corrída (ou repetibilidade) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A avaliação do coeficiente de variação a cada dia da validação (Tabela 1.2) demonstra pequena variação na análise de amostras de mesma concentração em um mesmo dia. A precisão intermediária, ou precisão inter-corrídas, considera a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes de análise. Neste caso, o CV inter-dia não ultrapassou 3 %, sendo inferior ao limite máximo estabelecido pelos códigos oficiais que é de 5 % (BRASIL 2003; ICH, 1996).

Tabela 1.2. Avaliação dos coeficientes de variação intra e inter-dia do método analítico para o doseamento da QN (n = 6)

Dia de validação	5,00 µg/mL de QN	
	Média (µg/mL)	CV %
1	5,1	2,7
2	5,0	3,0
3	5,0	2,0
Inter-dia	5,0	2,6

Os cromatogramas apresentados mostram a especificidade do método para a avaliação de QN a partir de amostras de nanocápsulas, demonstrando que não há interferentes de outros componentes da formulação na quantificação do fármaco (Figura 1.2).

Considerando que os resultados apresentados para a exatidão, repetibilidade e precisão intra-dia, além das curvas de calibração encontram-se em concordância com as especificações oficiais, este método analítico é adequado para a quantificação de QN em suspensões de NC.

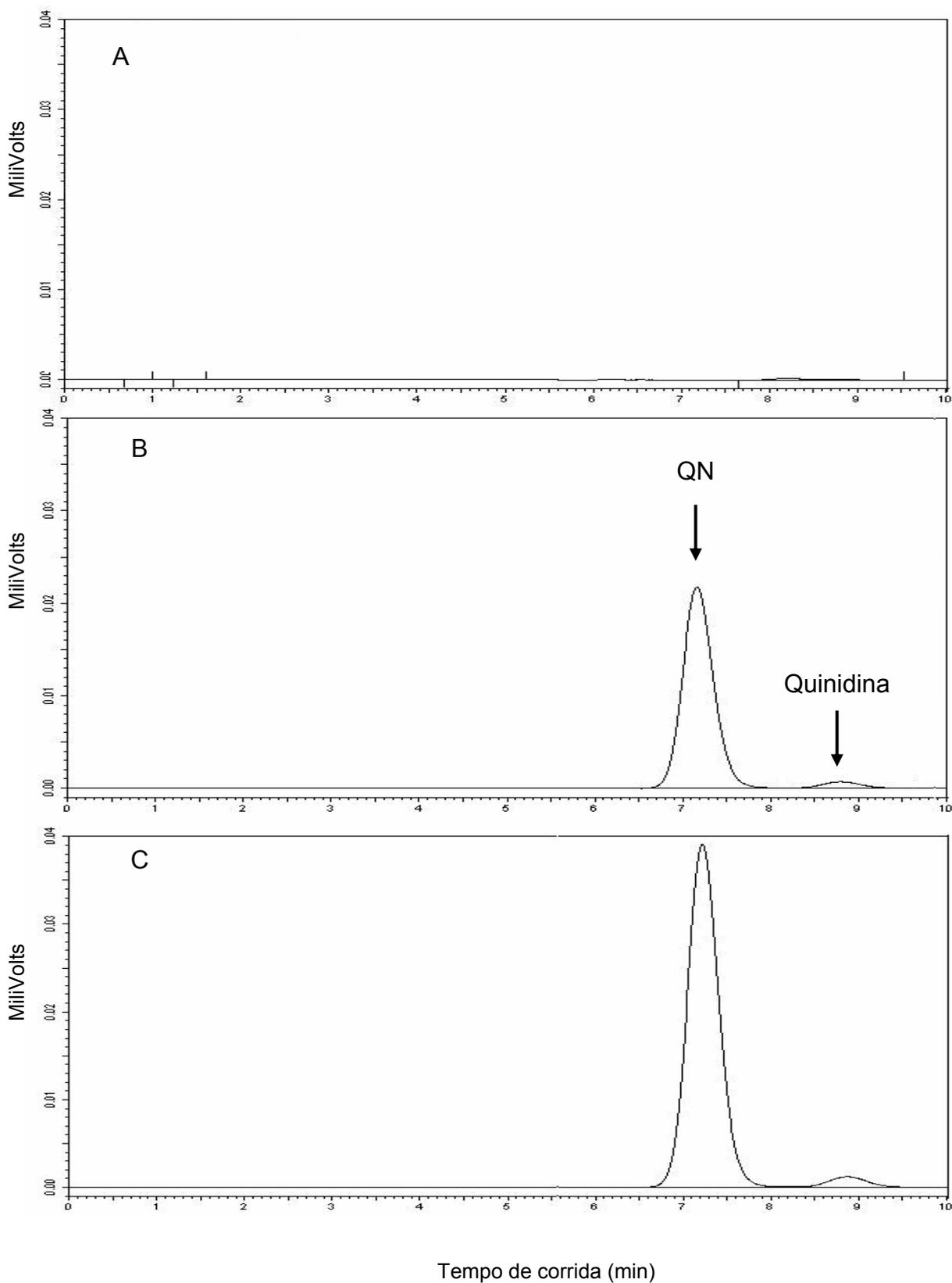


Figura 1.2. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de doseamento de QN em nanocápsulas. (A) nanocápsulas brancas; (B) amostra da curva padrão na concentração padrão de 2,5  $\mu\text{g/mL}$ ; (C) amostra de suspensão de nanocápsulas na concentração de 6,4  $\mu\text{g/mL}$ .



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CARTA DE APROVAÇÃO**

pro:pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

**Número :** 2005477

**Título :** Avaliação da eficácia e farmacocinética de nanocápsulas poliméricas de quinina revestidas com quitosana em ratos infectados com Plasmodium berghei

**Pesquisador (es) :**

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
CLARISSA CASSINI BETTONI	PESQUISADOR	klakete@yahoo.com.br	
CRISTÓFER FARIAS DA SILVA	PESQUISADOR	cvifqsi@yahoo.com.br	
SANDRA ELISA HAAS	PESQUISADOR	sanhaas@bol.com.br	
SILVIA STANISCUASKI GUTERRES	PESQUISADOR	nanoc@farmacia.ufrgs.br	33165218
TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA	PESQUISADOR	teresadc@farmacia.ufrgs.br	33165218

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 1 , ata nº 67 , de 19/01/2006 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quinta-feira, 23 de fevereiro de 2006

  
**LUIZ CARLOS BOMBASSARO**  
 Coordenador do CEP-UFRGS

## **Validação de método analítico para determinação de quinina em amostras biológicas**

### **3.1 Seletividade**

Os cromatogramas apresentados mostram a seletividade do método para a avaliação de QN em plasma de ratos, demonstrando mínima presença de interferentes da matriz biológica no tempo de retenção da QN, que foi aproximadamente 11 minutos (Figura 3.1). Segundo os códigos oficiais, a área de interferente no mesmo tempo de retenção do fármaco pode ser de até 20 % da área do pico de concentração do LIQ. Logo, considerando que o percentual do interferente na matriz biológica foi semelhante ao preconizado pode-se concluir que a matriz biológica não influenciou a quantificação do analito neste método.

### **3.2 Linearidade**

A linearidade do método foi observada na faixa de 25-2000 ng/ml, (Figura 3.2) sendo utilizado como fator de ajuste peso = 1 (1/y). A modelagem matemática foi realizada no programa Scientist<sup>®</sup>.

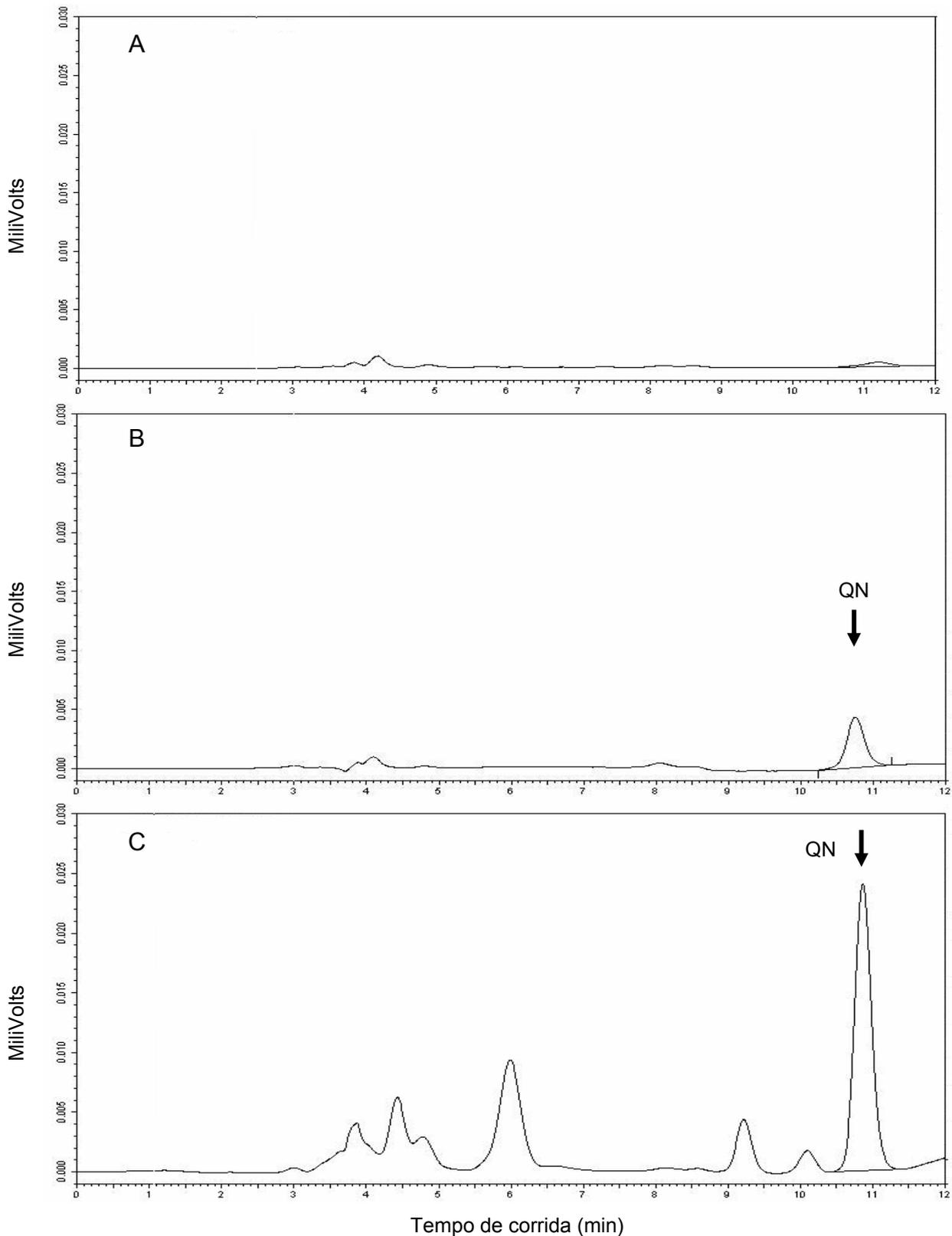


Figura 3.2. Cromatogramas obtidos por CLAE após a análise de plasma de ratos. (A) Plasma branco. (B) amostra da curva padrão de plasma na concentração de 25 ng/mL. (C) amostra de plasma de rato após a administração de QN livre (5400 ng/mL).

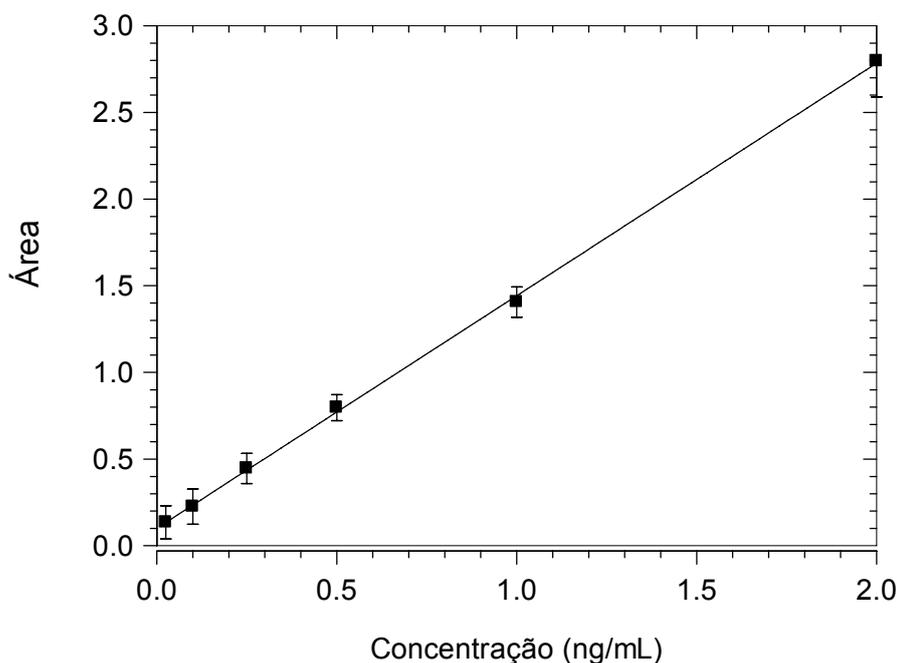


Figura 3.1. Representação gráfica da curva média de QN em plasma de ratos, quantificada através de CLAE ( $n = 9$  determinações por ponto). Curva ajustada com peso  $1/y$ .

Todos os coeficientes de correlação obtidos nos três dias de análises apresentaram valores iguais ou superiores a 0,9982 (Tabela 3.1), indicando linearidade entre a concentração de QN detectada e a área do pico medida. Estes valores estão de acordo com valores estabelecidos atualmente, de no mínimo 0,98 (BRASIL 2003). A linearidade da curva padrão foi também avaliada através de análise de variância (ANOVA), sendo que houve regressão linear significativa para a curva padrão, sem desvio da linearidade ( $\alpha = 0,05$ ).

Tabela 3.1. Parâmetros das curvas de calibração para a quantificação da QN em amostras de plasma de rato.

<b>Curva</b>	<b>Inclinação</b>	<b>Intercepto</b>	<b>R</b>
Dia 1			
1	1531,0	91872,4	0,9999
2	1432,4	93931,7	0,9999
3	1429,2	90748,5	0,9982
Dia 2			
1	1382,3	82314,8	0,9985
2	1440,6	99126,4	0,9995
3	1455,6	116174,6	0,9996
Dia 3			
1	1406,5	39441,0	0,9989
2	1205,0	40270,0	0,9982
3	1415,1	15032,3	0,9999
Média (n = 9)	1410,8		
DP.	87,6		
CV (%)	6,2		

R = coeficiente de correlação; DP = desvio padrão;  
CV = coeficiente variação.

### 3.2 Precisão

A precisão de um método analítico pode ser determinada considerando os coeficientes de variação intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária) das três amostras de controle de qualidade. Na Tabela 3.2, podem ser visualizados os valores dos coeficientes de variação intradia e interdia, determinados em triplicata pela análise de três concentrações de QN a cada dia de validação, durante 3 dias.

Os coeficientes de variação devem apresentar valores inferiores a 15 % ao longo da curva e não superior a 20 % para o limite inferior (FDA, 2001). Os valores descritos estão dentro das faixas aceitáveis, demonstrando que o método possui repetibilidade quando executado mais de uma vez no mesmo dia e que sua análise é precisa quando feita em dias diferentes.

Tabela 3.2. Variação intra-dia e inter-dia para a quantificação da QN em plasma por CLAE.

Concentração nominal (ng/mL)	dia	Concentrações experimentais		
		Média (ng/mL)	DP	CV %
Variação intra-dia				
25 (LIQ)	1	25,1	1,2	4,8
	2	24,0	3,7	15,4
	3	25,6	1,4	5,5
50	1	54,5	5,4	9,8
	2	52,0	5,6	10,8
	3	52,3	7,2	13,9
750	1	722,4	15,4	2,1
	2	716,3	11,7	1,6
	3	701,6	47,9	6,8
1500	1	1468,2	10,6	0,7
	2	1439,2	73,9	5,1
	3	1423,0	16,4	1,1
Variação inter-dia				
25 (LIQ)		24,8	0,8	3,4
50		52,1	1,4	2,7
750		709,0	10,7	1,6
1500		5,7	22,8	1,6

LIQ: limite inferior de quantificação.

### 3.4 Exatidão

Os resultados da análise da exatidão estão demonstrados na Tabela 3.3, juntamente com a faixa de concentração determinada experimentalmente para as amostras de controle de qualidade e para o limite inferior de quantificação da QN em plasma de ratos.

Tabela 3.3. Valores de exatidão obtidos após análise de QN em plasma de rato por CLAE (n = 9).

<b>Concentração nominal (ng/mL)</b>	<b>Faixa de concentração medida (ng/mL)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
25,0 (LIQ)	21,0 – 29,0	84,0 – 112,9
50,0	45,9 – 59,2	91,9 – 108,6
750,0	705,2 – 750,5	87,3 – 100,1
1500,0	1456,9 – 1478,9	90,2 – 98,9

Os valores percentuais de variação das concentrações experimentalmente determinadas não podem ser superiores a 15 % para os CQ ou 20 % para o LIQ (FDA, 2001; BRASIL, 2003). Os resultados mostraram que a exatidão da metodologia analítica por CLAE para a quantificação da QN em amostra de plasma de rato encontra-se dentro dos limites preconizados pelos órgãos oficiais.

Baseado nos resultados obtidos, os parâmetros bioanalíticos determinados encontram-se de acordo com os valores preconizados pelos órgãos oficiais (FDA, 2001; BRASIL, 2003), portanto, a metodologia analítica por CLAE para doseamento de QN em plasma de ratos encontra-se validada.