

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

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E FARMACOCINÉTICA DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO A ASSOCIAÇÃO DE
QUININA E DOXICICLINA**

LIBERATO BRUM JUNIOR

PORTO ALEGRE, 2011

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

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E FARMACOCINÉTICA DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO A ASSOCIAÇÃO DE
QUININA E DOXICICLINA

Tese apresentada por **Liberato Brum Junior**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Dalla Costa

Co-Orientadora: Profa Dra. Sílvia Staniçuaski Guterres

Porto Alegre, 2011

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 12.12.2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Marilise Brittes Rott

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Nádia Maria Volpato

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Universidade Federal de Santa Maria

Brum Junior, Liberato

Desenvolvimento e Avaliação da Atividade e Farmacocinética de Nanopartículas Lipídicas Sólidas Contendo a Associação de Quinina e Doxiciclina / Liberato Brum Junior. -- 2011. 129 f.

Orientadora: Teresa Cristina Tavares Dalla Costa.

Coorientadora: Sílvia Staniçuaski Guterres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BRRS, 2011.

1. Quinina . 2. Doxiciclina. 3. Nanopartículas Lipídicas Sólidas. 4. Malária. 5. Farmacocinética. I. Dalla Costa, Teresa Cristina Tavares, orient. II. Staniçuaski Guterres, Sílvia, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 e no Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, com financiamento do CNPq.

**Dedico esta tese aos amores da minha vida,
A minha esposa Fibebe e a minha querida filha Julia.**

Uma homenagem a minha mãe Maria e meu pai Liberato (*in memoriam*)

“É preferível arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfo e glória mesmo expondo-se à derrota, do que formar filas com os pobres de espírito, que nem gozam muito e nem sofrem muito porque vivem nesta penumbra cinzenta que não conhece vitória e nem derrota”.

Theodore Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Gostaria de realizar um agradecimento especial a Profa. Teresa por toda sua orientação durante a execução deste trabalho e também pelo seu exemplo de profissionalismo e competência.

À Profa. Sílvia pela co-orientação deste trabalho;

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

A todos que de uma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente os amigos e colegas que encontrei no Laboratório 405 e no Centro Bioanalítico de Medicamentos;

Aos amigos Moacir Kaiser e Sandra Haas e a bolsista de iniciação científica Fernanda Galves, pela ajuda em diversas etapas desta tese;

À minha esposa Fibebe pelo apoio, amor e companheirismo.

RESUMO

A malária, causada por protozoários intracelulares do gênero *Plasmodium*, é uma das doenças tropicais mais devastadoras existentes. Mais de 3 bilhões de pessoas vivem em regiões endêmicas para a malária. Cinco espécies de *Plasmodium* (*falciparum*, *vivax*, *ovale*, *malariae* e *knowlesi*) causam doenças em humanos e a infecção com *P. falciparum*, o mais letal desses parasitas, resulta em mais de 1 milhão de mortes anualmente. O desenvolvimento de resistência aos fármacos antimaláricos tradicionais, leva ao uso de combinações de fármacos como a quinina (QN) e a doxiciclina (DOX). Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram desenvolver e caracterizar formulação de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo a associação de QN/DOX, avaliar sua eficácia em um modelo *in vivo* de malária *berghei*, determinar a sua farmacocinética e o coeficiente de partição nos eritrócitos dos fármacos livres e nanoencapsulados. A formulação de NLS contendo QN/DOX (2,0/0,2 mg/mL) foi preparada pela técnica de homogeneização a alta pressão, utilizando polissorbato 80 e Lipoid® como emulsionantes e palmitato de cetila como matriz lipídica. No estudo preliminar de estabilidade, a formulação de NLS contendo QN/DOX apresentou tamanho de partícula adequado ($152,8 \pm 5,26$ nm), índice de polidispersão ($0,173 \pm 0,006$), potencial zeta ($-38,6 \pm 1,82$ mV), alto conteúdo dos fármacos ($95,9\% \pm 0,70/ 94,1\% \pm 2,41$) e adequada eficiência de encapsulação ($94,2\% \pm 1,14/83,0\% \pm 2,52$), após 21 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Para a análise do teor um método rápido e específico de cromatografia líquida-acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) foi desenvolvido e validado para a determinação simultânea de QN e DOX nas formulações. O método por LC-MS/MS utilizou coluna Waters Sun Fire C18 (50 mm x 3,0 mm de diâmetro) e a fase móvel foi composta de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (75:25, v/v), no fluxo de 0,45 mL/min (split 1:3). O volume de injeção foi de 10 µL. Ratos Wistar infectados por *P. berghei* foram utilizados para avaliar a eficácia da formulação de NLS contendo QN/DOX utilizando diferentes regimes de dose. As doses efetivas da formulação, i.v. (75/7,5 mg/kg/dia) e oral (105/10,5 mg/kg/dia), representam uma redução de quase 30% em comparação com os fármacos livres utilizados em associação. A farmacocinética foi avaliada após a administração dos fármacos livres ou nanoencapsulados pela vias i.v. (10/1 mg/ kg) e oral (25/2,5 mg/kg) em ratos Wistar infectados. Para a quantificação das amostras de plasma

dos ratos, método por LC-MS/MS foi desenvolvido e validado. A QN, a DOX e a cimetidina (padrão interno, PI) foram extraídos do plasma através de precipitação de proteínas e a fase móvel consistiu de metanol/ácido fórmico 0,1% (70:30, v/v), no fluxo de 0,5 mL / min (split 1:3). A detecção foi realizada através da ionização por electrospray positivo, no modo de monitoramento de reações múltiplas, onde foram monitoradas as transições 325,0>307,0, 445,0>428,1 e 252,8>159,0, para QN, DOX e PI, respectivamente. A análise foi realizada em 2,0 min e o método foi linear na faixa de concentração plasmática entre 5-5000 ng/mL. Nenhuma alteração significativa dos parâmetros farmacocinéticos foi observada para ambos os fármacos e vias de administração, após a nanoencapsulação. O coeficiente de partição da QN nos eritrócitos infectados por *P. berghei* aumentou ($5,53 \pm 0,28$) quando a formulação de NLS contendo QN/DOX foi usada em comparação com os fármacos livres em associação ($3,81 \pm 0,23$). Nenhuma alteração significativa na penetração intraeritrocitária da DOX foi observada com a nanoencapsulação. Os resultados demonstram que a nanoencapsulação da QN/DOX em NLS diminui a dose efetiva para o tratamento da malária, sendo uma alternativa interessante a ser investigada para o tratamento da malária *falciparum* resistente.

Palavras-chave: quinina, doxiciclina, nanopartículas lipídicas sólidas, *Plasmodium berghei*, malária, farmacocinética, coeficiente de partição nos eritrócitos, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Development and Evaluation of the Activity and Pharmacokinetics of Solid Lipid Nanoparticles Loaded with the Association of Quinine and Doxycycline

Malaria is one of the most devastating tropical diseases caused by intracellular protozoan parasites of the genus *Plasmodium*. More than 3 billion people live in malarial endemic regions. Five species of *Plasmodium* (*falciparum*, *vivax*, *ovale*, *malariae* and *knowlesi*) cause disease in humans and infection with *P. falciparum*, the most deadly of these parasites, results in more than 1 million deaths annually. The development of resistance to traditional antimalarial drugs leads to the use of drug combinations such as quinine (QN)/doxycycline (DOX). In this context, the aims of this work were to develop and characterize solid lipid nanoparticles (SLN) loaded with QN/ DOX, to evaluate their efficacy in an *in vivo* model of *berghei* malaria, and to determine their pharmacokinetics and erythrocyte partition coefficient compared to the non-encapsulated (free) drug association. The SLN were prepared by high pressure homogenization technique using polysorbate 80 and Lipoid[®] as emulsifiers and cetyl palmitate as lipid matrix. In the preliminary stability study, QN/DOX-loaded SLN (2.0/0.2 mg/mL) presented adequate particle size (152.8 ± 5.26 nm), polydispersion index (0.173 ± 0.006), zeta potential (-38.6 ± 1.82 mV), high drug content ($95.9\% \pm 0.70/94.1\% \pm 2.41$) and appropriate encapsulation efficiency ($94.2\% \pm 1.14/83.0\% \pm 2.52$) after 21 days of storage at room temperature. For the assay analysis, a fast and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated for the simultaneous determination of QN and DOX. The LC-MS/MS method was carried out on a Sun Fire Waters C₁₈ column (50 mm x 3.0 mm I.D.) and the mobile phase consisted of acetonitrile:0.1% formic acid (75:25, v/v), run at a flow rate of 0.45 mL/min (split 1:3). The injection volume was 10 μ L. *Plasmodium berghei* infected Wistar rats were used to evaluate the efficacy of QN/DOX-loaded SLN using different dosing regimens. The effective QN/DOX-loaded SLN i.v. (75/7.5 mg/kg/day) and oral (105/10.5 mg/kg/day) doses represent an almost 30% reduction compared to the free drugs in association. Plasma pharmacokinetics was evaluated after administration of free or nanoencapsulated QN/DOX by i.v. (10/1 mg/kg) and oral (25/2.5 mg/kg) routes to

infected Wistar rats. For the quantification of the rat plasma samples, a fast, sensitive and specific LC-MS-MS method was developed and validated for the determination of QN and DOX. QN, DOX and cimetidine (internal standard, IS) were extracted from the plasma by protein precipitation and the mobile phase consisted of methanol/formic acid 0.1% (70:30, v/v), run at a flow rate of 0.5 mL/min (split 1:3). Detection was carried out by positive Electrospray Ionization in multiple reaction monitoring mode, monitoring the transitions 325.0>307.0, 445.0>428.1 and 252.8>159.0, for QN, DOX and IS, respectively. The analysis was carried out in 2.0 min and the method was linear in the plasma concentration range of 5-5000 ng/mL. No significant alteration of pharmacokinetic parameters was observed for both drugs and routes of dosing after nanoencapsulation. QN partition coefficient into *P. berghei* infected erythrocyte was increased (5.53 ± 0.28) when the QN/DOX-loaded SLN was used in comparison with the free drugs in association (3.81 ± 0.23). No significant alteration on DOX erythrocyte partition coefficient was observed. In summary, the results showed that QN/DOX nanoencapsulation into SLN allows the reduction of the effective antimalarial dose being an interesting alternative to be investigated for the treatment of *falciparum* resistant malaria.

Keywords: quinine, doxycycline, solid lipid nanoparticles, *Plasmodium berghei*, malaria, pharmacokinetics, erythrocyte partition coefficient, LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1. Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual.....35

FIGURA 2. Registros de casos de malária e espécies parasitárias no Brasil (*P. vivax* e *P. falciparum*).....36

FIGURA 3. Ciclo da Malária.....38

CAPÍTULO 1

FIGURE 1. Chemical structures of quinine and doxycycline.....54

FIGURE 2. Representative LC-MS/MS chromatogram of quinine (10 ng/mL) and doxycycline (10 ng/mL).....60

CAPÍTULO 2

FIGURE 1. Chemical structures of quinine and doxycycline.....73

FIGURE 2. Representative LC-MS-MS chromatogram of low QC plasma sample containing DOX, QN and Cimetidine (IS).....81

FIGURE 3. Mean plasma concentration-time profiles of QN (▲) and DOX (■) after 25 and 2.5 mg kg⁻¹ single *iv bolus* dose to male Wistar rats (Mean ± S.D., n = 5).
.....85

CAPÍTULO 3

FIGURE 1. Backsttering profile of QN/DOX-loaded SLN by Turbiscan/lab®97

FIGURE 2. Survivor rate profiles of *Plasmodium berghei*-infected Wistar rats following the i.v. (top panel) and oral (bottom panel) treatments indicated in Table 2.....99

FIGURE 3. Mean plasma profiles of QN (left panel) and DOX (right panel) after a single intravenous dose of free drugs in association (solid line) or loaded into SLN (dashed line). Drugs were used in the proportion of QN/DOX 10/1 mg/kg.....102

FIGURE 4. Mean plasma profiles of QN (left panel) and DOX (right panel) after a single oral dose of free drugs (solid line) in association or loaded into SLN (dashed line). Drugs were used in the proportion of QN/DOX 25/2.5 mg/kg.....104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABLE 1. Intra-day precision for the determination of quinine and doxycycline in samples of pharmaceutical formulations.....	61
TABLE 2. Between-day precision for the determination of quinine and doxycycline in samples of pharmaceutical formulation.....	62
TABLE 3. Between-analysts precision for the determination of quinine and doxycycline in samples of pharmaceutical formulation.....	62
TABLE 4. Accuracy for the determination of quinine and doxycycline in samples of pharmaceutical formulations	63
TABLE 5. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing.....	64
TABLE 6. Determination of quinine and doxycycline in nanocapsules formulations by the LC-MS/MS method.....	65

CAPÍTULO 2

TABLE 1. Recovery of QN, DOX and cimetidine after the extraction procedure.....	82
TABLE 2. Intra-day precision and accuracy for the determination of QN and DOX in rat plasma.....	82
TABLE 3. Inter-day precision and accuracy for the determination of QN and DOX in rat plasma.....	83
TABELA 4. Summary of stability of QN and DOX experiments in rat plasma.....	84

CAPÍTULO 3

TABLE 1. Physicochemical characteristics of QN/DOX loaded nanoparticles (2/0.2 mg/mL) after storage at room temperature for up to 21 days.....	96
TABLE 2. Efficacy of QN/DOX free and QN/DOX loaded SLN (2/0.2 mg/mL) dosing to <i>P. berghei</i> infected Wistar rats.....	98
TABLE 3. QN/DOX pharmacokinetic parameters after administration of a single intravenous dose of free or nanoencapsulated drugs to <i>P. berghei</i> infected Wistar rats.....	103

TABLE 4. QN/DOX pharmacokinetic parameters after administration of a single oral dose of free or nanoencapsulated drug to <i>P. berghei</i> infected Wistar rats.....	105
--	-----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivos gerais.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1 Malária	33
3.1.1 A malária no mundo.....	33
3.1.2 A malária no Brasil.....	34
3.1.3 Ciclo da malária.....	37
3.1.4 Modelos animais para estudo da malária	39
3.1.5 Tratamento da malária e resistência	40
3.1.6 Nanotecnologia no tratamento da malária.....	44
3.1.7 Nanopartículas lipídicas sólidas	49
4. CAPÍTULO 1 - Development and validation of LC-MS/MS method for the simultaneous determination of quinine and doxycycline in pharmaceutical formulations	51
5. CAPÍTULO 2 - Determination of quinine and doxycycline in rat plasma by LC-MS-MS: application to a pharmacokinetic study	69
6. CAPÍTULO 3 - Quinine/Doxycycline loaded solid lipid nanoparticles to treat malaria	89
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
8. REFERÊNCIAS	119

A malária é uma doença infecciosa febril aguda cujo agente etiológico é o protozoário do gênero *Plasmodium*. Afeta aproximadamente 500 milhões de pessoas e mata mais de um milhão de pessoas por ano em todo o mundo (GREENWOOD *et al.*, 2008; GARCIA, 2010). No Brasil, são registrados cerca de 350.000 a 500.000 novos casos ao ano e as espécies que causam a doença são *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e, eventualmente, *Plasmodium malariae*. O mosquito fêmea do gênero *Anopheles* é o vetor do *Plasmodium* e hospedeiro definitivo, enquanto que o homem é o hospedeiro intermediário. A Amazônia Legal, composta pelos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte do Maranhão, concentra, atualmente, 99,9% dos casos de malária do país, pois as condições socioeconômicas e ambientais favorecem a proliferação do mosquito *Anopheles* e, conseqüentemente, a exposição a essa doença de grandes contingentes populacionais (BRASIL, 2010).

A utilização de fármacos antimaláricos em tratamentos seguros e eficazes é essencial para a redução da mortalidade por malária, principalmente considerando que a estratégia atual de controle está baseada no diagnóstico precoce e no tratamento adequado dos casos. No entanto, o aparecimento e propagação de parasitas resistentes à grande maioria dos antimaláricos disponíveis, no decorrer das últimas décadas, têm-se revelado como o principal obstáculo a uma eficiente diminuição dos casos da malária. Muitos dos fármacos empregados são relativamente de baixo custo, fáceis de distribuir e eficazes. No entanto, o problema da resistência do *P. falciparum* tem tornado a profilaxia e quimioterapia mais complexas e menos satisfatórias, portanto alternativas terapêuticas devem ser desenvolvidas a fim de contornar este problema mundial (OLLIARO, 2001; SANTOS-MAGALHÃES & MOSQUEIRA, 2010).

Nesse contexto, a associação de fármacos tem sido muito utilizada. Um exemplo é utilização de tratamento com quinina (QN) e doxiciclina (DOX), tendo em vista a elevada eficácia terapêutica, ausência de resistência e possibilidade de administração parenteral (LEAL *et al.*, 2003).

Uma área que tem sido muito estudada nos últimos anos é a nanotecnologia, que tem gerado inúmeras pesquisas científicas, nas mais variadas áreas de pesquisa (eletrônica, medicina, química, física, ciência da computação, biologia e engenharia dos materiais) e produção. Na área farmacêutica, os sistemas nanoparticulados têm sido estudados principalmente no desenvolvimento de

sistemas de liberação de fármacos. Considerando as suas vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais, pode-se destacar a possibilidade de vetorização de fármacos, redução da toxicidade, aumento da biodisponibilidade, proteção do fármaco frente à inativação no meio gastrintestinal e desenvolvimento de sistemas de ação prolongada (VAUTHIER & COUVREUR, 2007; SAKAMOTO *et al.*, 2010). Justifica-se, nesse contexto, o emprego da nanotecnologia visando melhorar a eficácia e segurança de fármacos antimaláricos bem como na busca de alternativas de tratamentos para essa infecção.

Com base no exposto, esse trabalho propõe-se a preparar, caracterizar e avaliar a farmacocinética e atividade *in vivo* de nanopartículas contendo fármacos antimaláricos em associação, a QN e a DOX visando melhorar a eficácia terapêutica dos tratamentos para a malária e dar prosseguimento a estudos já desenvolvidos pelo grupo de pesquisa que investigou a nanoencapsulação da QN. Paralelamente serão desenvolvidos métodos analíticos e bioanalíticos para a determinação quantitativa dos fármacos nas formulações desenvolvidas e em matriz biológica empregando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM/EM).

Com a concretização dos objetivos propostos esperamos obter alternativas terapêuticas mais eficazes e potencialmente mais seguras para o tratamento da malária, que poderão contribuir para o equacionamento desse importante problema de saúde pública no País.

OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade e o perfil farmacocinético de formulações de nanopartículas lipídicas sólidas contendo a associação QN/DOX, visando alternativas terapêuticas para tratamento da malária.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e caracterizar físico-quimicamente nanopartículas lipídicas sólidas contendo a associação QN/DOX.
- Desenvolver e validar método por CL-EM/EM para determinação quantitativa dos fármacos nas formulações desenvolvidas.
- Desenvolver e validar método por CL-EM/EM para determinação quantitativa dos fármacos em matriz biológica.
- Avaliar *in vivo* a atividade das formulações utilizando modelo de infecção para *P. berghei*.
- Avaliar comparativamente o perfil farmacocinético plasmático dos fármacos livres e nanoencapsulados em ratos infectados por *P. berghei*.
- Determinar o coeficiente de partição nos eritrócitos dos fármacos livres e nanoencapsulados.

3.1 Malária

3.1.1 A malária no mundo

A malária é uma doença infecciosa que, apesar de poder ser tratada e evitada ainda ocasiona um alto índice de mortalidade no mundo. É causada pelo protozoário intracelular do gênero *Plasmodium* e infecta humanos de todas as faixas etárias. No entanto indivíduos que possuem baixa imunidade, como crianças, mulheres grávidas e portadores de HIV são mais vulneráveis. Cerca de 50% da população mundial (3,3 bilhões) tem risco de contrair a doença. A malária é encontrada em regiões tropicais e subtropicais do mundo e é responsável por aproximadamente 500 milhões de novos casos e pelo menos um milhão de mortes anualmente (GREENWOOD *et al.*, 2008; GARCIA, 2010). Noventa por cento das mortes ocorrem na África, atingindo principalmente crianças menores de cinco anos. 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 prejudicar o desenvolvimento intelectual (OMS, 2009).

Fatores como resistência do vetor aos inseticidas utilizados, a resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos, às condições sócio-econômicas das populações atingidas, bem como esquemas de tratamento complexos dificultam o tratamento e erradicação da malária em todo mundo (WINSTANLEY, 2001; PIMENTEL *et al.*, 2007).

Na última década, esforços para erradicar a malária têm sido realizados em diversas 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, empresas privadas 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, 2010b).

Para atingir os objetivos, as estratégias do programa são: aprimorar o nível de informação sobre a doença nas regiões endêmicas, disponibilizar um acesso efetivo

e de qualidade aos medicamentos e promover a qualificação dos profissionais da saúde na prevenção e tratamento da doença (OMS, 2010b).

Investimentos significativos para a pesquisa e desenvolvimento de alternativas para a erradicação da malária também tem sido realizados através da liderança e financiamento da Fundação Bill & Melinda Gates. Fundada em 1994, a fundação investiu mais de US\$ 8,95 bilhões de dólares entre 1998 e 2007 em programas de combate a doença, no desenvolvimento de medicamentos e também de uma vacina contra a malária (MACCOY *et al.*, 2009).

3.1.2 A malária no Brasil

A malária é um grave problema de saúde pública devido a sua alta incidência e às conseqüências que trazem às pessoas acometidas pela doença, influenciando significativamente o potencial de desenvolvimento de países, regiões e estados, pelos múltiplos custos que acarreta. No Brasil, a doença incide predominantemente na chamada Amazônia Legal, prevalecendo às infecções pelo *Plasmodium vivax* e pelo *Plasmodium falciparum*, principalmente em populações vivendo em condições insatisfatórias de habitação e trabalho. Nessas populações, a ocorrência da malária está relacionada à ocupação desordenada de terras, à exploração manual de minérios, a projetos de assentamento e colonização agrária e à migração de pessoas da zona rural para a periferia de cidades amazônicas (REINERS *et al.*, 2010).

O quadro epidemiológico da malária no Brasil ainda é preocupante nos dias atuais. Embora em declínio, o número absoluto de casos no ano de 2008 foi superior a 300.000 pacientes em todo o país, sendo o *P. vivax* a espécie causadora da maioria dos casos. No entanto, a transmissão do *P. falciparum*, responsável pela forma grave e letal da doença, tem apresentado redução importante nos últimos anos. Além disso, a frequência de internações por malária no Brasil também vem mostrando declínio, ficando em 1,3% no ano de 2008, enquanto em 2003 era de 2,6% (BRASIL, 2010). Apesar dessa redução a malária ainda se constitui em grave problema de saúde pública no País. O risco de contrair a malária é medido pela incidência parasitária anual (IPA), que classifica as áreas de transmissão em alto (50 ou mais casos de malária por mil habitantes), médio (maior que 10 e menor que 50

casos por mil habitantes) e baixo risco (menor que 10 casos por mil habitantes) (BRASIL, 2010).

A distribuição espacial do risco de transmissão da doença no Brasil é apresentada na Figura 1.

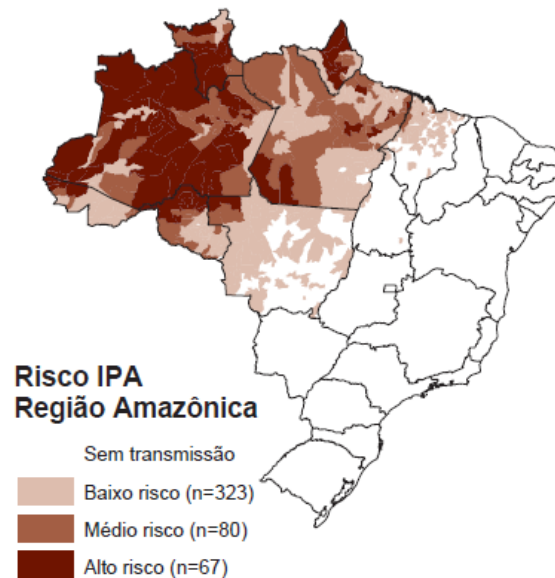


Figura 1. Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual (BRASIL, 2010).

Até a década de 80, houve relativa equivalência entre as espécies parasitárias (*P. vivax* e *P. falciparum*) inclusive com um período de inversão parasitária de 1983 a 1998 com predominância do *P. falciparum*. A partir de então, nota-se um distanciamento do número de registros das duas espécies, com a predominância do *P. vivax*, responsável por quase 90% dos casos notificados em 2009, conforme podemos observar na Figura 2. Essa inversão na proporção de casos de *P. vivax* e *P. falciparum* nas duas últimas décadas foi uma das principais realizações do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), levando a uma diminuição substancial do número de mortes (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

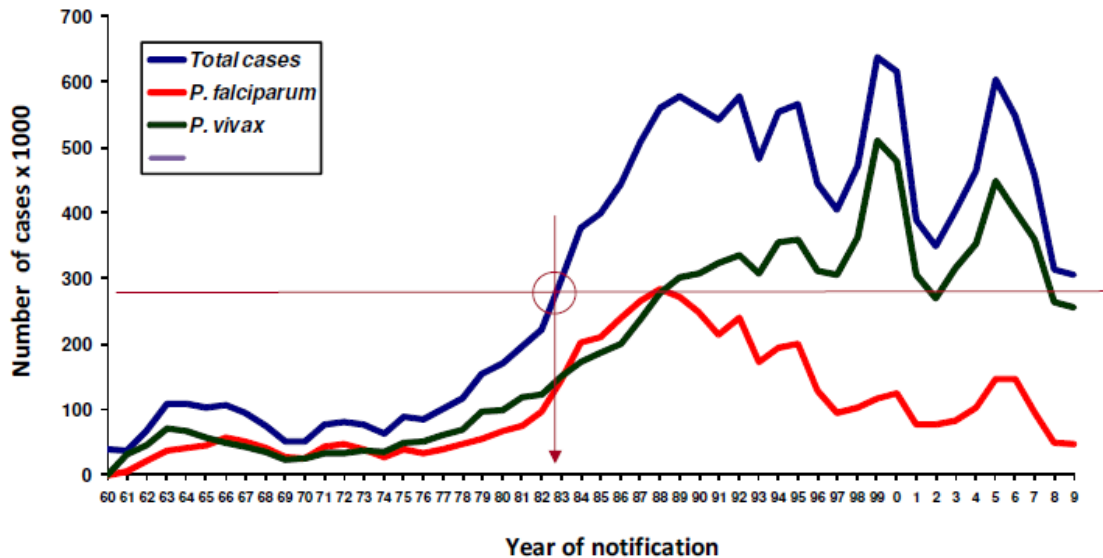


Figura 2. Registros de casos de malária e espécies parasitárias no Brasil (*P. vivax* e *P. falciparum*) (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2010), que recomenda os tratamentos e disponibiliza de forma gratuita os medicamentos antimaláricos utilizados no País, o tratamento da malária visa atingir o parasita em pontos-chave de seu ciclo evolutivo, os quais podem ser resumidos em:

- a) interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção;
- b) destruição de formas latentes do parasita no ciclo tecidual (hipnozoítos), evitando assim as recaídas tardias;
- c) interrupção da transmissão do parasita, através da utilização de fármacos que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitas (gametócitos).

O espectro de fármacos atualmente disponíveis para o uso na profilaxia e tratamento da malária é limitado. Vários fármacos são utilizados há décadas e ainda permanecem como primeira escolha na terapia da malária. Existem poucos estudos de desenvolvimento de novos agentes antimaláricos devido às dificuldades intrínsecas do desenvolvimento, como o alto custo e o fato da malária ser uma doença negligenciada que está presente em países subdesenvolvidos. Nesse sentido, há pouco interesse da indústria farmacêutica em investir, em virtude da incerteza sobre os retornos financeiros. Desse modo, tem-se buscado aprimorar a utilização dos fármacos existentes, através da associação de fármacos; desenvolvimento de análogos; utilização de nanotecnologia e o desenvolvimento de vacinas (ROSENTHAL, 2003; GREENWOOD *et al.*, 2005).

No Brasil as associações mais comumente utilizadas para o tratamento da malária são as seguintes: artemeter+lumefantrina, artesunato+mefloquina e quinina+doxiciclina. Para a malária severa ocasionada por *P. falciparum* pode-se destacar a utilização de artesunato, quinina ou quinina+clindamicina por via intravenosa (CARMARGO *et al.*, 2009).

3.1.3 Ciclo da malária

A malária é uma doença infecciosa cujo agente etiológico é um parasita do gênero *Plasmodium*. As espécies associadas à malária humana são: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. No Brasil, nunca foi registrada transmissão autóctone de *P. ovale* e *P. knowlesi*, que são restritas a determinadas regiões da África e Ásia, respectivamente. Cada espécie de *Plasmodium* produz um padrão de doença bastante característico, relacionado, em parte, com o momento de seu ciclo intra-eritrocitário assexuado. As infecções por *P. vivax* e *P. ovale* raramente são fatais e caracterizam-se por picos febris com intervalos de cerca de 48 horas (malária terçã benigna). Com o *P. malariae*, os picos febris ocorrem em intervalos de 72 horas (malária quartã benigna) (KUMAR *et al.*, 2005). Por outro lado, a infecção causada pelo *P. falciparum*, caracterizada por picos febris entre 36 e 48 horas, é responsável pelas mais altas parasitemias e pela maior parte da mortalidade. O ataque agudo de malária caracteriza-se por um conjunto de paroxismos febris, que apresentam quatro períodos sucessivos: o de frio, calor, suor e apirexia (TRACY & WEBSTER, 2003).

A transmissão natural da malária ocorre por meio da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo mais importante a espécie *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, muito frequentes na Amazônia brasileira (BRASIL, 2010).

No hospedeiro vertebrado, o ciclo inicia-se com a picada do mosquito infectado com as formas esporozoítas do *Plasmodium*, que então se dirigem para o fígado, onde se transformam em trofozoítas e, logo a seguir, em esquizontes (Figura 3).

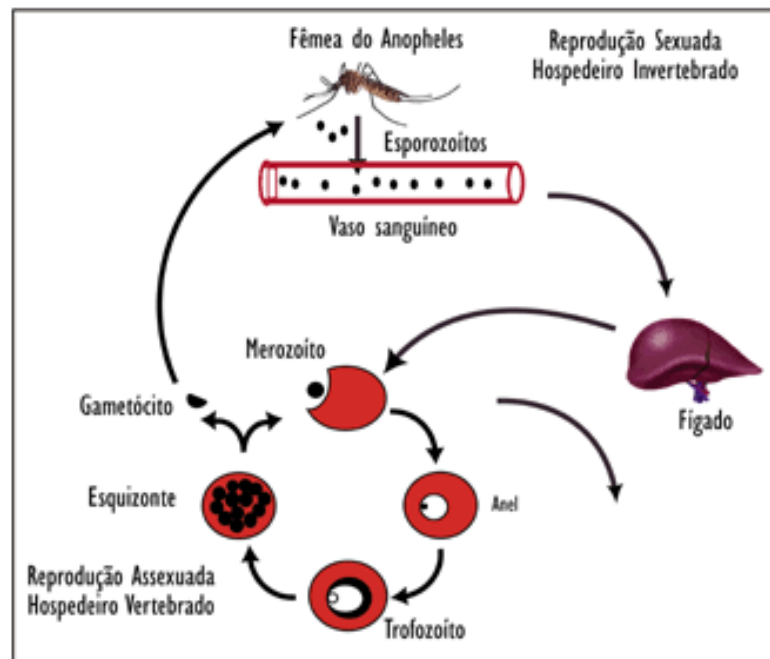


Figura 3. Ciclo da malária (Garcia, 2010).

O 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 à lectina a resíduos de ácido siálico nas moléculas de glicoforina na superfície dos eritrócitos. Estes se ligam 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 do 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 & FONTES, 2000; REY, 2001). Alguns merozoítos se diferenciam em formas sexuais conhecidas como gametócitos, sendo estas formas

ingeridas pelo mosquito, dando continuidade ao ciclo da malária, no hospedeiro invertebrado.

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 & FONTES, 2000). Outros sintomas comuns são tonturas, mal-estar, mialgia, dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia e tosse seca (SAMUELSON, 2000). 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 & 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).

3.1.4 Modelos animais para estudo da malária

Modelos de malária em animais de laboratório são necessários para o estudo da doença, porém nenhum dos parasitas que ocasiona a malária humana infecta camundongos ou ratos (HALL *et al.*, 2005). Nesse sentido, espécies de *Plasmodium* que infectam roedores murinos da África Central, *P. Berghei*, *P. vinckei*, *P. chabaudi* e *P. yoelii* são utilizados para a realização de modelos experimentais da infecção em animais de laboratório (NOGUEIRA & ROSARIO, 2010). Esses modelos tem sido amplamente utilizados, pois a infecção por esses parasitas tem demonstrado grande analogia com a malária humana na maioria dos aspectos essenciais de fisiologia, estrutura e ciclo de vida. Além disso, os animais como ratos e camundongos apresentam facilidade de manuseio e manutenção em laboratório.

Embora a extrapolação direta do modelo de roedores para a biologia do *P. falciparum* não seja possível em todas as situações, cada uma das quatro espécies

de *Plasmodium* possui características semelhantes às espécies de malária humana, tornando-as adequadas para realização de estudos experimentais. Por exemplo, ensaios de variação antigênica são realizados em *P. chabaudi*, testes *in vivo* de fármacos em *P. berghei* ou *P. chabaudi*, malária cerebral em *P. berghei*, testes de vacinas em fase pré-eritrocítica em *P. yoelii*, cronobiologia em *P. vinckei* (NOGUEIRA & ROSARIO, 2010).

A espécie *P. berghei* é muito utilizada em estudos experimentais, sendo descritos na literatura vários modelos usando essa espécie em camundongos. Além disso, é o modelo que tem sido empregado a fim de simular a infecção humana por *P. falciparum* (SINGH *et al.*, 2009).

Nesse sentido, PEDRONI *et al.*, 2006 desenvolveram um modelo de infecção experimental irreversível utilizando cepa de *P. berghei* ANKA em ratos Wistar. Entre as vantagens desse modelo destaca-se a possibilidade de avaliação de eficácia de medicamentos antimaláricos e a realização de experimentos farmacocinéticos em animais infectados.

3.1.5 Tratamento da malária e resistência

A eficácia de um agente terapêutico no tratamento da malária depende das interações entre os parasitas, os fármacos antimaláricos e o hospedeiro humano (KANEKO & NISHIYAMA, 2004). Nas últimas décadas, o aparecimento e a disseminação de cepas de *P. falciparum* resistentes à maioria dos fármacos antimaláricos disponíveis tem se tornado um problema para o controle e tratamento da doença. 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, 2010a). Nenhum antimalárico isoladamente controlou com sucesso a disseminação crescente de cepas resistentes de *P. falciparum* (TRACY & WEBSTER, 2003). Nesse sentido, a utilização das 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 & WHITE, 2005; GREENWOOD *et al.*; 2005; OMS, 2010a).

A resistência e a sensibilidade do *P. falciparum* aos antimaláricos não são absolutas, podendo ser classificadas como sensíveis (S), caracterizada pela negatificação da parasitemia assexuada dentro de sete dias após o 1º dia de

tratamento, sem recrudescência, ou resistentes (R). As cepas resistentes são classificadas em três níveis, RI, RII ou RIII. Uma resposta RI corresponde a uma negatificação da parasitemia como na sensível, porém seguida de recrudescência a partir do oitavo dia após o início do tratamento. A RII corresponde a uma redução acentuada da parasitemia, porém sem negatificação, com recrudescência e uma RIII não apresenta redução acentuada da parasitemia (BRASIL, 2001).

Antes do início do tratamento, a fim de escolher o melhor regime de tratamento a ser utilizado, devem-se levar em conta alguns fatores como espécie de *Plasmodium* infectante, idade do paciente, histórico de exposição à infecção e condições associadas como gravidez e problemas de saúde (BRASIL, 2010).

A maioria dos antimaláricos utilizados no tratamento da malária apresenta relatos de toxicidade e ocasionam efeitos gastrintestinais adversos, como náuseas e vômitos, dificultando a adesão dos pacientes e comprometendo a efetividade do tratamento (WINSTANLEY, 2001; PIMENTEL *et al.*, 2007).

Uma das principais estratégias de tratamento para a malária envolve a utilização de um ou mais fármacos em conjunto com a artemisinina (ou seus derivados), tentando conseguir o máximo de efeito e o mínimo de resistência. A OMS sugere a utilização de artemeter e lumefantrina, artesunato e amodiaquina, artesunato e mefloquina e artesunato e sulfadoxina-pirimetamina (FRASSON *et al.*, 2009; OMS, 2010a). Recentemente tem sido observado que a eficácia do tratamento com artemisina e combinações tem diminuído, provavelmente devido a problemas de resistência (DONDORP *et al.*, 2009).

Entre os fármacos utilizados na terapia antimalárica destacamos a QN, que há vários anos é utilizada para o tratamento da malária e continua a ser o fármaco de escolha para malária severa. Para o tratamento da malária não complicada é o tratamento de segunda escolha (em combinação com antibióticos) após a terapia com artemisinina e combinações (OKOMBO *et al.*, 2011). Para o tratamento da malária complicada a QN injetável é recomendada e deve ser utilizada combinada com antibióticos (OMS, 2010a). A utilização da QN é limitada devido a sua janela terapêutica estreita, efeitos colaterais como cinchonismo, hipoglicemia e hipertensão, e principalmente cardiotoxicidade (prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma), sendo sua toxicidade dose dependente (WHITE, 2007).

A QN atua como um esquizonticida sangüíneo contra todas as formas de *Plasmodium* e também é um gametocida para *P. vivax* e *P. malarie*. Trata-se de um

fármaco supressor, curando os surtos agudos, sem impedir recaída (REY, 2001). O seu mecanismo de ação não está completamente elucidado, mas uma hipótese é que ela atua inibindo a detoxificação do heme no vacúolo digestivo do parasita (SANCHEZ *et al.*, 2008). 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). O mecanismo de resistência a QN é complexo, multigênico, e não está bem elucidado, mas tem sido associado a mutações nos genes MDR1 (*Pfmdr1*) e *pfcr1* do *P. falciparum* (BRIOLANT *et al.*, 2011).

Há mais de 30 anos, resultados de estudos *in vitro* e de estudos clínicos demonstram a atividade antimalárica da tetraciclina e de seus derivados (BRIOLANT *et al.*, 2008). A DOX, um fármaco do grupo das tetraciclinas, é utilizada na profilaxia da malária em viajantes que vão para regiões endêmicas, utilização aprovada pelo FDA, e também em associação com um esquizonticida de ação rápida no tratamento da malária. Cabe destacar que a DOX vem substituindo a tetraciclina, devido à maior comodidade terapêutica e a menor frequência de efeitos colaterais gastrintestinais (WATT *et al.*, 1992; TAN *et al.*, 2011). O mecanismo de ação das tetraciclinas no tratamento da malária não está completamente elucidado, mas trabalhos evidenciam que a ação acontece em nível de uma organela presente no citoplasma do parasita, o apicoplasto, que é responsável por alguns processos de síntese metabólica essenciais. Abaixo são apresentados dois trabalhos que tentaram elucidar o mecanismo de ação da doxiciclina.

DAHAL *et al.*, 2006, realizaram estudo visando caracterizar o mecanismo de ação antimalárico das tetraciclinas, avaliando a atividade da DOX ao longo de dois ciclos de vida de 48h do *P.falciparum*. Os resultados obtidos indicaram que a DOX inibiu a produção de proteínas codificadas pelo apicoplasto do parasita, levando a uma subsequente perda de função, impedindo a reprodução do parasita a partir do segundo ciclo da infecção.

BRIOLANT *et al.*, 2010 pesquisaram os mecanismos metabólicos que são afetados no *P. falciparum* após o tratamento com DOX. Os autores concluíram que uma resposta específica para o tratamento com a DOX parece envolver mitocôndria e apicoplasto do parasita.

Conforme abordado anteriormente, a utilização de combinação de fármacos tem sido uma estratégia muito utilizada no tratamento da malária. Nesse sentido, a

associação da QN com antibiótico do grupo das tetraciclinas tem mostrado bons resultados no tratamento da malária, visto que possibilita a utilização de dois fármacos que atuam com diferentes modos de ação sobre o parasita, possibilitando uma melhor efetividade no combate a doença. Abaixo estão citados alguns artigos que descrevem a associação da QN com a DOX:

LEAL *et al.*, 2003 avaliaram a resposta de 21 pacientes com malária severa não complicada que receberam tratamento com QN associada à DOX. O esquema posológico foi realizado da seguinte maneira: sulfato de QN oral (comprimidos de 500 mg), durante os três primeiros dias, sendo a dose diária administrada a cada 12 horas e conforme a idade (até 11 anos: 1.000 mg; de 12 a 14 anos: 1.500 mg; e acima de 15 anos: 2.000 mg); DOX oral (comprimidos de 100 mg), durante os 5 dias de internação hospitalares, sendo a dose diária administrada a cada 12 horas (até 11 anos: 100 mg; de 12 a 14 anos: 150 mg; e acima de 15 anos: 200 mg); e primaquina oral (comprimido de 15 mg), dose única no primeiro dia de internação, sendo a dose de acordo com a faixa etária (até 11 anos: 15 mg; de 12 a 14 anos: 30 mg; e acima de 15 anos: 45 mg). O alto percentual de sensibilidade observado, de 76,2%, sem nenhum caso de resistência tipo II ou III, reforçou a eficácia do tratamento com a QN associada a DOX em casos de malária *falciparum* não complicada no Brasil.

EJAZ *et al.*, 2007 avaliaram a eficácia e tolerabilidade da combinação de QN e DOX no tratamento de malária *falciparum* não complicada. Foram estudados 100 pacientes do sexo masculino e a contagem de parasitas no sangue foi realizada no momento da admissão e depois a cada 12 horas até o desaparecimento ou até 28 dias. O tratamento inicial foi de 10 mg de sulfato QN/kg de peso corporal a cada 8 horas por via oral, no período de 3 a 7 dias em combinação com 100 mg de DOX a cada 12 horas durante 7 dias. Os resultados demonstraram que o tratamento foi eficaz no tratamento da malária.

RASHEED & SAEED, 2008 avaliaram a segurança e a eficácia do tratamento de QN (dose de 30 mg/kg/dia) associada à DOX (200 mg/dia) em malária ocasionada por *P. falciparum* através de estudo prospectivo observacional em 337 pacientes. Observaram uma menor incidência de efeitos colaterais e menor taxa de mortalidade (0,6%) em comparação com estudos anteriores utilizando QN e artemisina que descrevem taxas de mortalidade entre 5 a 23,9%. Os autores concluíram que, devido às vantagens acima mencionadas e também ao baixo custo

do tratamento, a associação QN/DOX pode ser utilizada com segurança e eficácia terapêutica no tratamento de malária ocasionada por *P. falciparum*.

3.1.6 Nanotecnologia no tratamento da malária

Vários fármacos antimaláricos incorporados em sistemas nanoparticulados têm sido estudados devido às potencialidades terapêuticas desses sistemas. Os nanossistemas oferecem várias vantagens para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, entre elas pode-se citar a redução da toxicidade, aumento da biodisponibilidade, possibilidade de tratar alvos específicos, possibilidade de incorporação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, diminuição da dose administrada, liberação controlada do fármaco, proteção do fármaco frente à inativação no meio gastrointestinal (VAUTHIER & COUVREUR, 2007; SAKAMOTO *et al.*, 2010).

Diversos sistemas nanoparticulados são utilizados na área farmacêutica, entre os principais podemos citar os lipossomas, as nanoesferas, as nanocápsulas e as nanocápsulas poliméricas. Os lipossomas são vesículas aquosas circundadas por bicamada lipídica podendo servir como veículo de fármacos encapsulados na cavidade aquosa da vesícula ou na bicamada lipídica (MUFAMADI *et al.*, 2011). As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As limitações existentes quanto à aplicação de nanopartículas poliméricas derivam da possibilidade de resíduos de solventes orgânicos utilizados no processo produtivo, citotoxicidade de alguns polímeros e maior dificuldade de produção em grande escala. Lipossomas, por sua vez, apesar das vantagens relacionadas à ausência de toxicidade dos materiais constituintes, apresentam limitações de estabilidade química e física, levando à agregação das vesículas lipossomais e à degradação do fármaco incorporado durante a estocagem (MEHNERT & MÄDER,

2001). Uma grande vantagem das nanopartículas lipídicas sólidas é o fácil escalonamento para aplicação industrial (HUYNH *et al.*, 2009).

A literatura científica apresenta inúmeros artigos que descrevem a utilização de fármacos antimaláricos incorporados em diferentes sistemas nanoparticulados. Nesse contexto, são citados abaixo alguns desses artigos.

OWAIS *et al.*, 1995 desenvolveram lipossomas de cloroquina com a superfície ligada covalentemente a anticorpos de membranas de eritrócitos infectados com *P. berghei*, chamados de MAB F10, o qual são capazes de reconhecer antígenos específicos da membrana de eritrócitos infectados pelo parasita *P. berghei*. Os lipossomas MAB F10 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 sua liberação no local de ação específico.

Lipossomas multilamelares contendo artemeter foram testados em camundongos infectados com *P. chabaudi* (CHIMANUKA *et al.*, 2002). A parasitemia do grupo tratado com artemeter solubilizado em Mygliol® diminuiu rapidamente em relação aos demais grupos, entretanto esses animais morreram devido à recorrência da infecção. No grupo tratado com lipossomas contendo o fármaco, o tratamento se mostrou mais efetivo, pois evitou as recaídas comuns da doença e levou a cura 100% dos camundongos tratados.

GABRIELS & PLAIZIER-VERCANMEN, 2003 desenvolveram formulação de lipossomas contendo artesunato. A dispersão foi avaliada em termos de estabilidade física e química, incluindo degradação química e cristalização do artesunato, bem como liberação, através da utilização da técnica de diálise. Os resultados demonstraram a estabilidade do sistema por 10 dias a 25 °C, contendo 1 mg de artesunato e 300 mg de lipídios por mL de tampão com pH 5,0 e taxa de encapsulamento de 100%.

LONGMUIR *et al.*, 2006 desenvolveram com sucesso formulação de lipossomas contendo um 19-amino peptídeo extraído de uma proteína do esporozoítio de *P. berghei*. Quando administrado por via intravenosa em camundongos, a formulação foi rapidamente eliminada do sangue e direcionada especificamente para o fígado. Esses resultados indicam que é possível direcionar

fármacos incorporados nesse tipo de lipossomas para tratar as formas do parasita no interior dos hepatócitos.

Triclosan, um antimicrobiano não-iônico de amplo espectro, que apresenta eficácia *in vitro* na inibição do crescimento de *P. falciparum*, foi encapsulado em nanocápsulas revestidas com quitosana. A formulação foi adequada para obtenção de uma liberação sistêmica do triclosan, devido as propriedades mucoadesivas da quitosana (MAESTRELLI & ALONSO, 2004).

MOSQUEIRA *et al.*, 2004 avaliaram a eficácia e farmacocinética de formulação de nanocápsulas contendo halofantrina em camundongos infectados por *P. berghei*. Os resultados obtidos demonstraram que a nanoencapsulação da halofantrina promoveu a modificação do seu perfil farmacocinético, mantendo as concentrações plasmáticas por mais de 70h e reduziu a cardiotoxicidade, sugerindo o uso de halofantrina nanoencapsulada, por via parenteral, para o tratamento da malária grave com menores efeitos adversos.

BHADRA *et al.*, 2006 desenvolveram nanopartículas contendo cloroquina baseadas em dendrímeros de PEG-poli-Lisina recobertas por sulfato de condroitina. Concluíram que o revestimento com sulfato de condroitina prolongou a liberação da cloroquina no sangue de camundongos após administração intravenosa.

Transferrina conjugada com nanopartículas lipídicas sólidas foram estudadas devido a sua capacidade de direcionar o dicloridrato de QN para o cérebro no tratamento de malária cerebral (GUPTA *et al.*, 2007). A formulação de transferrina conjugada com nanopartículas mostrou uma maior penetração pelo tecido cerebral, após administração da dose de 10 mg/kg pela via i.v., em comparação com nanopartículas sem modificações e solução de fármaco.

LEITE *et al.*, 2007, estudaram a redução da toxicidade da halofantrina em função da sua nanoencapsulação em nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona. Os parâmetros cardiovasculares, ECG e pressão arterial, foram avaliados em ratos Wistar anestesiados após a administração i.v. de dose única (100 ou 150 mg/kg) de halofantrina nanoencapsulada e em solução. Os resultados indicaram que a nanoencapsulação reduziu os efeitos cardiotóxicos da halofantrina quando comparado ao fármaco livre, possivelmente devido a alteração da distribuição do fármaco.

Nano-suspensões de diidroartemisinina (DHA) foram formadas após a dispersão de misturas ternárias de polivinilpirrolidona, desoxicolato de sódio e DHA

em água utilizando moinho coloidal. A nano-suspensão de DHA apresentou maior atividade antimalárica *in vitro* contra *P. falciparum* quando comparada com microsuspensões (CHINGUNPITAK *et al.*, 2008).

JOSHI *et al.*, 2008, prepararam o fármaco antimalárico artemeter utilizando carreadores lipídicos nanoestruturados para administração intravenosa. A atividade antimalárica da formulação foi avaliada em *P. berghei* em comparação com a formulação convencional. Estudos citotóxicos mostraram que a formulação nanoestruturada foi menos hemolítica e apresentou maior atividade antimalárica que a formulação convencional.

SINGH & VINGKAR, 2008 desenvolveram formulação de nanoemulsão lipídica de primaquina. Para avaliação da atividade foram administradas quatro diferentes doses (5.0, 2.0, 1.5 e 1.0 mg/kg/dia) pela via oral durante 4 dias. A formulação, que apresentou tamanho de partícula de 10 a 200 nm, mostrou atividade antimalárica contra infecção de camundongos infectados com *P. berghei*, sendo que a dose efetiva foi 25% inferior a dose do fármaco livre. Os autores enfatizaram ainda que a formulação aumentou de forma significativa a biodisponibilidade e a concentração de primaquina no fígado.

Vacinas estão sendo desenvolvidas para prevenir a infecção por malária. Conhecidas por RTS, S/AS01B e RTS, S/AS02B, essas formulações encontram-se em estudos clínicos de fase 1 e 2 e contêm lipossomas e emulsões óleo em água como adjuvantes (KESTER *et al.*, 2009).

HAAS *et al.*, 2009 desenvolveram e caracterizaram nanocápsulas poliméricas contendo QN para administração pela via i.v. que foram estáveis por 7 dias, permitindo a redução da dose efetiva para curar 100% dos ratos Wistar infectados com *P. berghei*, em cerca de 30%. A nanoencapsulação dobrou o coeficiente de ligação da QN aos eritrócitos infectados por *P. berghei* quando comparado com o coeficiente do fármaco livre. A farmacocinética plasmática da QN, no entanto, não foi alterada pela nanoencapsulação. Os resultados obtidos permitiram demonstrar que a nanoencapsulação pode ser uma alternativa para melhorar a eficácia da QN no tratamento da malária.

ADITYA *et al.*, 2010 desenvolveram formulação parenteral de nanopartículas lipídicas com artemeter, de tamanho médio entre 100 e 130 nm e polidispersão abaixo de 0,25 utilizando uma modificação no método do filme de hidratação. Com as nanopartículas lipídicas produzidas a atividade antimalárica *in vivo* do artemeter

foi aumentada em comparação a formulação convencional. Além disso, os autores destacam que a nanoencapsulação do artemeter previniu o metabolismo rápido e produção do metabólito tóxico diidroartemisina, devido à liberação sustentada de artemeter a partir das partículas lipídicas, permitindo dessa maneira a administração parenteral do fármaco com o objetivo de tratar a malária cerebral.

NAYAK *et al.*, 2010 desenvolveram formulação de nanopartículas lipídicas com curcuminóides, apresentando tamanho entre 100 e 250 nm. Entre as vantagens da formulação, os autores destacam a facilidade de preparação, utilização de lipídios biocompatíveis e a não utilização de solventes orgânicos. Além disso, destacaram a possibilidade de preparação de formulação parenteral, permitindo o aumento da biodisponibilidade e a utilização para tratamento da malária cerebral.

KAKRAN *et al.*, 2010 utilizaram método de precipitação por evaporação de nano-suspensões para fabricar nanopartículas de artemisinina, com o objetivo de aumentar a sua taxa de dissolução. O tamanho de partícula da formulação desenvolvida foi entre 100 e 360 nm. Concluíram que a dissolução da formulação de nanopartículas de artemisina aumentou de forma significativa quando comparada com a formulação convencional.

SLABBERT *et al.*, 2011 estudaram a estabilidade física, caracterizada pelo pH, tamanho de partícula e eficiência de encapsulação da mefloquina em lipossomas e vesículas Pheroid[®] (sistema coloidal patenteado que consiste de uma fase dispersa de plantas e de ácidos graxos essenciais em óxido nitroso saturado em fase aquosa contínua). Os autores concluem que a mefloquina foi encapsulada com sucesso nas vesículas de Pheroid[®], apresentando maior estabilidade quando comparada à formulação de lipossomas.

Conforme podemos observar, a nanotecnologia tem sido utilizada no desenvolvimento de formulações para o tratamento e também para fabricação de vacina para malária, demonstrando ser uma importante alternativa para reestabelecer a utilização de fármacos já existentes (SANTOS-MAGALHÃES & MOSQUEIRA, 2010). Não há, até o momento, relato de estudos utilizando a nanotecnologia para associação de fármacos antimaláricos, muito utilizados atualmente em função do aumento da resistência dos parasitas.

3.1.7 Nanopartículas lipídicas sólidas

Entre os sistemas nanoparticulados com grande potencial para o desenvolvimento de formulações com fármacos antimaláricos pode-se destacar as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), que foram desenvolvidas no início da década de 90, derivadas de emulsões O/A por substituição do óleo por um lipídio sólido, o qual permanece nesse estado na temperatura corporal. Esses sistemas, com diâmetro médio na faixa de aproximadamente 50 a 1000 nm, representam uma alternativa a lipossomas e nanopartículas poliméricas (MÜLLER *et al.*, 2000; PARDEIKE *et al.*, 2009).

Entre as vantagens que as NLS oferecem, pode-se destacar a possibilidade de liberação controlada em alvos específicos dos fármacos encapsulados, possibilidade de preparação de formulações para via tópica, oral e intravenosa, aumento da permeabilidade dos fármacos encapsulados, biocompatibilidade de seus componentes, a não utilização de solventes orgânicos em sua produção, facilidade de produção em escala industrial e possibilidade de esterilização. Entre as desvantagens pode-se citar a possibilidade de geleificação e aumento no tamanho das partículas ao longo do tempo (PATIDAR *et al.*, 2010).

Os métodos mais citados na literatura para preparação das nanopartículas são aqueles que utilizam homogeneizadores de alta pressão ou que levam a obtenção dos sistemas sólidos, a partir de microemulsões. Existe uma grande diversidade de equipamentos com diferentes capacidades para a preparação de NLS. O homogeneizador de alta pressão pode ser alimentado com a dispersão de lipídios e fármaco a quente ou a frio. No processo a quente, uma pré-emulsão é obtida e passada no homogeneizador ainda quente para a obtenção de nanoemulsões. A nanoemulsão homogeneizada é posteriormente resfriada a temperatura ambiente dando origem a NLS. No processo a frio a dispersão do fármaco no lipídio é inicialmente solidificada em nitrogênio líquido, moída, o pó disperso diluído com o auxílio de um tensoativo e posteriormente submetido à homogeneização (MEHNERT & MÄDER, 2001; PARDEIKE *et al.*, 2009).

NLS podem incorporar fármacos hidrofílicos e lipofílicos, sendo esses mais facilmente encapsulados nas NLS. Fármacos hidrofílicos são, na maioria das vezes, liberados mais rapidamente das NLS, pois tendem a particionar na fase externa aquosa do sistema em formação. Quando a dispersão é resfriada, a fase oleosa

precipita antes e o fármaco hidrofílico precipita na superfície da partícula, facilitando sua liberação mais rápida do sistema (PATIDAR *et al.*, 2010).

A influência do tipo de homogeneizador, da pressão utilizada, do número de ciclos aplicados e da temperatura no tamanho das partículas obtidas tem sido muito estudada. Independente da técnica utilizada é possível trabalhar com concentrações de lipídios entre 5 e 40%, sendo que concentrações mais elevadas originam formulações de consistência semi-sólida. A concentração de lipídios determina a concentração de tensoativo necessária para a estabilização física do sistema, que varia de 0,5 a 5% (WISSING, 2004; SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007). Observa-se também que a utilização de uma mistura de emulsificantes origina dispersões com menor tamanho de partícula e maior estabilidade física em comparação com a utilização de um único componente estabilizador (MEHNERT & MÄDER, 2001).

Não há relatos da investigação de NLS com QN descritos na literatura, nem da associação desse fármaco com a DOX. Diante do exposto, considerando a possibilidade de transposição industrial, esse trabalho objetivou a preparação e avaliação de NLS da associação QN/DOX.

Os resultados da tese estão apresentados na forma de capítulos. No primeiro capítulo é apresentado o artigo já publicado relativo à validação do método analítico para quantificação dos fármacos em formulação farmacêutica e no segundo capítulo é apresentado o artigo já publicado que descreve a validação do método bioanalítico para quantificação dos fármacos em matriz biológica. No terceiro capítulo está apresentado o artigo principal da tese, que ainda será submetido para publicação.

CAPÍTULO 1

Liberato Brum Junior, Flávia de Toni Uchôa, Silvia Staniçuaski Guterres, Teresa Dalla Costa. Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Quinine and Doxycycline in Pharmaceutical Formulations. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 32, n. 18, p. 2699-2711, 2009.

DOI: 10.1080/10826070903245805

Abstract

A fast, sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated for the simultaneous determination of quinine and doxycycline in pharmaceutical formulations. The LC-MS/MS method was carried out on a Sun Fire Waters C₁₈ column (50 mm x 3.0 mm I.D.) and the mobile phase consisted of acetonitrile:0.1% formic acid (75:25, v/v), run at a flow rate of 0.45 mL/min (split 1:3). The injection volume was 10 µL for both standard and samples. The triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray source in positive mode (ES+) was set up in multiple reaction monitoring mode (MRM), monitoring the transitions of 325.0>307.0 and 445.0>428.1, for quinine and doxycycline, respectively. The total analysis time was 2 min and the method was linear in the concentration range of 10-1500 ng/mL for both compounds. Method validation investigated parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy and robustness, giving results within the acceptable range. Moreover, the proposed method was successfully applied for determination of quinine and doxycycline in nanocapsule formulations to support the quality control.

Keywords: Quinine, Doxycycline, Validation, LC-MS/MS.

CAPÍTULO 2

Liberato Brum Junior, Manoela Guerra Leal, Flávia de Toni Uchôa, Moacir Kaiser, Sílvia Staniçuaski Guterres, Teresa Dalla Costa. Determination of Quinine and Doxycycline in Rat Plasma by LC-MS-MS: Application to a Pharmacokinetic Study *Chromatographia*, v. 73, p. 1081-1088, 2011.

DOI: 10.1007/s10337-011-1949-y

Abstract

A fast, sensitive and specific LC-MS-MS method was developed and validated for the determination of quinine (QN) and doxycycline (DOX) in rat plasma. QN, DOX and cimetidine (internal standard, IS) were extracted from the plasma by protein precipitation and the mobile phase consisted of methanol/formic acid 0.1% (70:30, v/v), run at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ (split 1:3). Detection was carried out by positive Electrospray Ionization (ESI+) in multiple reaction monitoring (MRM) mode, monitoring the transitions 325.0 → 307.0, 445.0 → 428.1 and 252.8 → 159.0, for QN, DOX and IS, respectively. The analysis was carried out in 2.0 min and the method was linear in the plasma concentration range of 5-5000 ng mL⁻¹. The mean extraction recoveries for QN, DOX and IS from plasma were 89.4, 90.5 and 86.3%, respectively. Method validation investigated parameters such as the linearity, precision, accuracy, specificity and stability, giving results within the acceptable range. The proposed method was successfully applied for the determination of QN and DOX in rat plasma samples to support pharmacokinetic studies.

Keywords: LC-MS-MS, Protein precipitation, Validation, Rat plasma, Pharmacokinetic, Quinine, Doxycycline.

CAPÍTULO 3

Liberato Brum Junior, Sandra Elisa Haas, Moacir Kaiser, Fernanda Galves, Sílvia Staniçuaski Guterres, Teresa Dalla Costa. Quinine/Doxycycline Loaded Solid Lipid Nanoparticles to Treat Malaria. Artigo em elaboração

Abstract

The aim of this work was to develop and characterize quinine (QN)/doxycycline (DOX) solid lipid nanoparticles (SLN), to evaluate their efficacy in an *in vivo* model of malaria, and determine their pharmacokinetics and erythrocyte partition coefficient compared to the not encapsulated (free) drug association. The SLN were prepared by high pressure homogenization technique using polysorbate 80 and lipid as emulsifiers and cetyl palmitate as lipid matrix. In the preliminary stability study, QN/DOX-loaded SLN presented adequate particle size (153.0 ± 5.2), polydispersity index (0.173 ± 0.006), zeta potential (-38.6 ± 1.82 mV), and high drug content ($95.9\% \pm 0.70/94.1\% \pm 2.41$) and appropriate encapsulation efficiency ($94.2\% \pm 1.14/83.0\% \pm 2.52$) after 21 days of storage at room temperature. *Plasmodium berghei* infected Wistar rats were used to evaluate the efficacy of QN/DOX-loaded SLN using different dosing regimens. The effective QN/DOX-loaded SLN i.v. (75/7.5 mg/kg/day) and oral (105/10.5 mg/kg/day) doses represent an almost 30% reduction compared to the free drugs in association. Plasma pharmacokinetics was evaluated after administration of free or nanoencapsulated QN/DOX by i.v. (10/1 mg/kg) and oral (25/2.5 mg/kg) routes to infected Wistar rats. No significant alteration of pharmacokinetic parameters was observed for both drugs and routes of dosing after nanoencapsulation. QN partition coefficient into *P. berghei* infected erythrocyte was increased (5.53 ± 0.28) when the QN/DOX-loaded SLN was used in comparison with the free drugs in association (3.81 ± 0.23). In summary, this work suggests that nanoencapsulation of QN/DOX into SLN improved the efficacy of free QN/DOX association and may be used as an alternative for future treatment of malaria.

Keywords: quinine, doxycycline, solid lipid nanoparticles, *Plasmodium berghei*, antimalarial efficacy, pharmacokinetics, erythrocyte partition coefficient.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A malária é uma doença infecciosa que, apesar de poder ser tratada e evitada, ainda ocasiona um alto índice de mortalidade mundial, sendo relatados aproximadamente 500 milhões de novos casos e sendo responsável por pelo menos um milhão de mortes anualmente.

No Brasil, são registrados cerca de 350.000 a 500.000 novos casos ao ano. A Amazônia Legal concentra atualmente 99,9% dos casos de malária do país. A malária é um grave problema de saúde pública devido a sua alta incidência e às conseqüências que traz às pessoas acometidas pela doença, influenciando significativamente o potencial de desenvolvimento de regiões em função dos múltiplos custos que acarreta.

Entre os fatores que contribuem para a não erradicação da malária, a resistência do *Plasmodium spp.* aos fármacos antimaláricos existentes tem levado a utilização de associação de fármacos e a busca de alternativas tecnológicas como a nanotecnologia, para aumentar a eficácia de antimaláricos tradicionais, devido à possibilidade de vetorização dos fármacos, redução da toxicidade, aumento da biodisponibilidade e desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada.

O presente trabalho se propôs a dar continuidade a estudos já desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, que inicialmente adaptou modelo de malária experimental com *P. berghei* para ratos Wistar e, na continuidade do trabalho, demonstrou a possibilidade de redução da dose efetiva de QN em aproximadamente 30% quando da nanoencapsulação do fármaco em nanocápsulas poliméricas. No presente projeto, buscou-se a nanoencapsulação inédita da associação de fármacos QN/DOX, utilizada no Brasil para o tratamento de malária resistente a *P. falciparum*, em nanopartículas lipídicas sólidas, escolhidas devido à facilidade de transposição industrial desse sistema.

A QN é um fármaco que há vários anos tem sido utilizado para o tratamento da malária. Atua no ciclo eritrocítico da infecção, provavelmente inibindo a detoxificação do heme no vacúolo digestivo do parasita. A QN apresenta janela terapêutica estreita e muitos relatos de toxicidade ocasionados pelo seu uso, como cinchonismo, hipoglicemia, hipertensão e principalmente cardiotoxicidade (prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma), sendo sua toxicidade dose dependente.

A DOX vem sendo utilizada na profilaxia da malária em viajantes que vão para regiões endêmicas e também em associação com um esquizotocida de ação

rápida. A DOX atua de forma parcial nos ciclos pré-eritrocítico e eritrocítico da infecção, mas seu mecanismo de ação não está completamente elucidado. Trabalhos científicos evidenciam que a ação acontece em nível de uma organela presente no citoplasma do parasita, o apicoplasto. A associação da QN com a DOX vem sendo amplamente utilizada e tem mostrado bons resultados no tratamento da malária, visto que possibilita a utilização de dois fármacos que atuam com diferentes modos de ação sobre o parasita, possibilitando uma melhor efetividade no tratamento da doença.

Inicialmente foi desenvolvida e caracterizada a formulação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo QN e DOX através da técnica de homogeneização a alta pressão, que se mostrou estável por 21 dias a temperatura ambiente e adequada para administração oral e intravenosa.

Paralelamente ao estudo da formulação, e visando possibilitar a quantificação concomitante dos fármacos nas formulações testadas na fase de desenvolvimento utilizando apenas um método analítico, foi desenvolvido método por LC-MS/MS para quantificação da QN e DOX. O método foi validado de acordo com as normas do ICH tendo sido publicado no *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*.

A atividade da NLS contendo QN/DOX (10:1) adequadamente caracterizada foi avaliada *in vivo* utilizando o modelo de malária *berghei* em ratos Wistar desenvolvido pelo grupo, utilizando as vias de administração oral e intravenosa e diferentes doses. As doses efetivas para a formulação de NLS contendo QN/DOX foram de 75/7,5 mg/kg/dia pela via i.v. e 105/10,5 mg/kg/dia pela via oral. Esses regimes de dose representam uma redução de 30% da dose necessária para curar 100% dos animais infectados quando comparado aos fármacos livre em associação utilizados como controle. Esse resultado é semelhante ao obtido com as nanopartículas poliméricas contendo apenas QN, previamente estudadas pelo grupo de pesquisa, com a vantagem de possibilitar a redução da dose mesmo após a administração oral, o que não havia sido demonstrado para as nanopartículas poliméricas.

Visando elucidar a causa da redução da dose efetiva da associação QN/DOX incorporada na NLS foram programados dois estudos adicionais. O primeiro estudo consistiu na comparação da farmacocinética da QN/DOX em associação na forma livre e nanoencapsulados após dose i.v. e oral em ratos infectados com *P. berghei*.

O segundo estudo foi realizado buscando determinar o coeficiente de partição nos eritrócitos dos fármacos livre e nanoencapsulados utilizando sangue de ratos saudáveis e infectados por *P. berghei*.

Previamente a realização dos experimentos farmacocinéticos, foi desenvolvido e validado método por LC-MS/MS para quantificação concomitante da QN e DOX em plasma de rato utilizado pequeno volume de amostra (90 µL) e método de extração por precipitação de proteínas. O método, validado de acordo com normas do FDA foi publicado na revista *Chromatographia*.

A avaliação farmacocinética foi realizada após a administração dos fármacos livre e nanoencapsulados pelas vias i.v. (10/1 mg/kg) e oral (25/2,5 mg/kg) em ratos infectados. Não foram verificadas alterações farmacocinéticas significativas para ambos os fármacos e vias de administração após a nanoencapsulação. Dessa maneira a diminuição da dose efetiva não pode ser atribuída à alteração nos processos de absorção e disposição (distribuição tecidual e eliminação) dos fármacos após a nanoencapsulação.

Por outro lado, a determinação do coeficiente de partição nos eritrócitos infectados aumentou quando a QN foi nanoencapsulada ($5,53 \pm 0,28$) em comparação a QN livre ($3,81 \pm 0,23$). Para a DOX não ocorreu alteração significativa no coeficiente de partição nos eritrócitos entre o fármaco livre e nanoencapsulado. Dessa maneira a diminuição da dose efetiva pode ser explicada pelo aumento da penetração da QN nos eritrócitos infectados quando nanoencapsulada, uma vez que a QN age no ciclo eritrocitário da malária.

No presente estudo, utilizando o protocolo de tratamento validado previamente, ou seja, administração do tratamento entre o 7^o-9^o dias após infecção dos ratos Wistar com *P. berghei*, não foi observada melhora no tratamento em função da incorporação da DOX na formulação de NLS, em associação com a QN. Para avaliar a contribuição da nanoencapsulação no efeito da DOX dessa formulação, outros protocolos de tratamento utilizando o modelo experimental de malária *berghei* empregado nesse estudo devem ser testados e validados.

Entre as vantagens da utilização das NLS em comparação com as nanocápsulas poliméricas utilizadas em trabalho desenvolvido previamente pelo grupo de pesquisa, podemos destacar a facilidade do processo de fabricação e transposição para escala industrial, o uso de lipídios biocompatíveis e a não utilização de solventes orgânicos. Além disso, a formulação também apresentou

efetividade através da via oral, que é a via mais utilizada para o tratamento da malária.

Em resumo, o presente trabalho sugere que a nanoencapsulação da QN/DOX em NLS aumentou a eficácia dos fármacos, possibilitando a diminuição da dose efetiva, sendo uma alternativa interessante a ser investigada para o tratamento da malária *falciparum* resistente.

REFERÊNCIAS

ADITYA, N.P.; PATANKAR, S.; MADHUSUDHAN, B. *et al.* Arthemeter-loaded lipid nanoparticles produced by modified thin-film hydration: Pharmacokinetics, toxicological and in vivo anti-malarial activity. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 40, p. 448-455, 2010.

ASHLEY, E.A.; WHITE, N.J. Artemisinin-based combinations. **Curr. Opin. in Infect. Dis.**, v. 18, p. 531-536, 2005.

BHADRA, D.; BHADRA, S.; JAIN, N.K. PEGylated peptide dendrimeric carriers for the delivery of antimalarial drug chloroquine phosphate. **Pharm. Res.**, v. 23, n. 3, p. 623-633, 2006.

BRAGA, E.M.; FONTES, C.J.F. *Plasmodium* - Malária. *In*: NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 10ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Manual de terapêutica da malária, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil, 2010.

BRIOLANT, S.; FUSAI, T.; ROGIER, C. *et al.* Tetracycline antibiotics in Malaria. **Open Trop. Med. J.**, v. 1, p. 31-46, 2008.

BRIOLANT, S.; ALMERAS, L.; BELGHAZI, M. *et al.* *Plasmodium falciparum* proteome changes in response to doxycycline treatment. **Malaria J.**, v. 9, p. 1-14, 2010.

BRIOLANT, S.; PELLEAU, S.; BOGREAU, H. *et al.* In vitro susceptibility to quinine and microsatellite variations of the *Plasmodium falciparum* Na⁺/H⁺exchanger (Pfnhe-1) gene: the absence of association in clinical isolates from the Republic of Congo. **Malaria J.**, v. 10, p. 1-7, 2011.

CARMARGO, L.M.A.; OLIVEIRA, S.; BASANO, S.; GARCIA, C.R.S. Antimalarials and the fight against malaria in Brazil. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 5, p. 311-317, 2009.

CHIMANUKA, B.; GABRIËLS, M.; DETAEVERNIER, M.R. *et al.* Preparation of β -artemether liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing recrudescence parasitaemia in *Plasmodium chabaudi* malaria-infected mice. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 13-22, 2002.

CHINGUNPITAK, J.; PUTTIPIATKHACHORN, S.; CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P. *et al.* Formation, physical stability and in vitro antimalarial activity of dihydroartemisinin nanosuspensions obtained by cogrinding method. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 34, p. 314-322, 2008.

DAHAL, E.L.; SHOCK, J.L.; SHENAI, B.R. *et al.* Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 9, p. 3124-3131, 2006.

DONDORP, A.M.; NOSTEN, F.; PORAVUTH, Y. *et al.* Artemisin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **N. Eng. J. Med.**, v. 361, p. 455-467, 2009.

EJAZ, A.; HAQNAWAZ, K.; HUSSAIN, Z. *et al.* Treatment of uncomplicated plasmodium falciparum malaria with quinedoxycycline combination therapy. **J. Pak. Med. Assoc.**, v. 57, n. 10, p. 502-505, 2007.

FRASSON, A.P.; BARLETTE, A.G.; DALPIZOLO, C. *et al.* Estratégias e desafios no combate a malária. **Rev. Liberato**, v. 10, n. 14, p. 201-208, 2009.

GABRIELS, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Physical and chemical evaluation of liposomes containing artesunate. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 31, p. 655-667, 2003.

GARCIA, L.S. Malaria. **Clin. Lab. Med.**, v. 30, p. 93-129, 2010.

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

GREENWOOD, B.M.; FIDOCK, D.A.; KYLE, D.E. *et al.* Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 1266-1276, 2008.

GUPTA, Y.; JAIN, A.; JAIN, S.K. Transferrin-conjugated solid lipid nanoparticles for enhanced delivery of quinine dihydrochloride to the brain. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 59, p. 935-940, 2007.

HAAS, S.E.; BETTONI, C.C.; OLIVEIRA, L.K. *et al.* Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 34, p. 156-161, 2009.

HALL, N.; KARRAS, M.; RAINE, D. *et al.* A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. **Nature**, v. 307, p. 82-86, 2005.

HUYNH, N.T.; PASSIRANI, C.; SAULNIER, P. *et al.* Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. **Int. J. Pharm.**, v. 379, n. 2, p. 201-209, 2009.

JOSHI, M.; PATHAK, S.; SHARMA, S. *et al.* Design and in vivo pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: Nanoject. **Int. J. Pharm.** v. 364, p. 119-126, 2008.

KAKRAN, M.; SAHOO, N.G.; LI, L. *et al.* Dissolution of artemisinin/polymer composite nanoparticles fabricated by evaporative precipitation of nanosuspension. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 62, n. 4, p. 413-421, 2010.

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.

KESTER, K.E.; CUMMINGS, J.F.; OCKENHOUSE, C.F. et al. S.V.E.G. RTS, randomized, double-blind, phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naive adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. **J. Infect. Dis.** v. 200, p. 337-346, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K; FAUSTO, N. Patologia - Bases patológicas das doenças. 7 ed. Rio de Janeiro: Ed. Saunders Elsevier, 2005.

LEAL, O.; LEAL, E.A.S.; JUNIOR, F.R.P.B.; PAEZ, M.L.T. *et al.* Clinical-parasitological response to treatment with quinine associated to doxycycline in uncomplicated falciparum malaria. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 6, p. 751-754, 2003.

LEITE, E.A.; GRABE-GUIMARÃES, A.; GUIMARÃES, H.N. *et al.* Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. **Life Sci.**, v. 80, p. 1327-1334, 2007.

LONGMUIR, K.J.; ROBERTSON, R.T.; HAYNES, S.M. *et al.* Effective targeting of liposomes to liver and hepatocytes in vivo by incorporation of a Plasmodium amino acid sequence. **Pharm. Res.**, v. 23, p. 759-769, 2006.

MAESTRELLI, F.; ALONSO, M.J. Formulation and characterization of triclosan sub-micron emulsions and nanocapsules. **J. Microencapsul.**, v. 21, p. 857-864, 2004.

MCCOY, D.; KEMBHAVI, G.; PATEL, J. *et al.* The Bill & Melinda Gates Foundation's grant-making programme for global health. **Lancet**, v. 373, p. 1645-1653, 2009.

MEHNERT W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 47, p. 165-196, 2001.

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.; LOISEAU, P.M.; BORIES, C. *et al.* Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in *Plasmodium berguei*-infected mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 4, p. 1222-1228, 2004.

MUFAMADI, M.S.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y.E. *et al.* A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. **J. Drug Deliv.**, v. 2011, p. 1-19, 2011.

MÜLLER, R.H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 50, p. 161-177, 2000.

NAYAK, A.P.; TIYABOONCHAI, W.; PATANKAR, S. *et al.* Curcuminoids-loaded lipid nanoparticles: novel approach towards malaria treatment. **Colloids Surf. B.**, v. 81, p. 263-273, 2010.

NEWTON, P.N.; WARD, S.; ANGUS, B.J. *et al.* Early treatment failure in severe malaria resulting from abnormally low plasma quinine concentrations. **Roy. Soc. of Trop. Med. H.**, v. 100, p. 184-186, 2006.

NOGUEIRA, F.; ROSARIO, V.E. Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the *Plasmodium* life cycle. **Rev. Pan-Amaz. Saude**, v. 1, n. 3, p. 109-124, 2010.

OKOMBO, J.; OHUMA, E.; PICOT, S. *et al.* Update on genetic markers of quinine resistance in *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biochem. Parasit.**, v. 177, p. 77-82, 2011.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.G.V.; BRASIL, P. *et al.* Malaria in Brazil: an overview. **Malaria J.**, v. 9, p. 1-15, 2010.

OLLIARO, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. **Pharmacol. Ther.**, v. 89, p. 207-219, 2001.

OMS - Organização Mundial da Saúde. World Malaria Report: 2009. World Health Organization, 2009.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Malaria. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. World Health Organization, 2010a.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Malaria. Financiamento e utilização de recursos para o combate à malária: A primeira década da campanha Roll Back Malaria, 2010b.

OWAIS, M.; VARSHNEY, G.; CHOUDHURY, A. *et al.* Chloroquine encapsulated in malaria-infected erythrocyte-specific antibody-bearing liposomes effectively controls chloroquine-resistant *Plasmodium berguei* infections in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 1, p. 180-184, 1995.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **Inter. J. Pharm.**, v. 366, p. 170-184, 2009.

PATIDAR, A.; THAKUR, D.S.; KUMAR, P. *et al.* A review on novel lipid based nanocarriers. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 2, n. 4, p. 30-35, 2010.

PEDRONI, H.C.; BETTONI, C.C.; SPALDING, S.M. *et al.* *Plasmodium berghei*: development of an irreversible experimental malaria model in Wistar rats. **Exp. Parasitol.**, v. 113, n. 3, p. 193-196, 2006.

PIMENTEL, L.F.; JÁCOME JUNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, F.C.F. *et al.* Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 43, n. 4, p. 503-514, 2007.

PLANCHE, T.; KRISHNA, S. The relevance of malaria pathophysiology to strategies of clinical management. **Curr. Opin. in Infect. Dis.**, v. 18, p. 369-375, 2005.

RASHEED, A.; SAEED, S. *In vivo* efficacy and safety of quinine- doxycycline combination in acute *plasmodium falciparum* malaria. **J. Pak. Med. Assoc.**, v. 24, n. 5, p. 684-688, 2008.

REINERS, A.A.O.; AZEVEDO, R.C.S.; RICCI, H.A. *et al.* Adesão e reações de usuários ao tratamento da malária: implicações para a educação em saúde. **Texto Contexto Enferm.**, v. 19, n. 3, p. 536-544, 2010.

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

ROSENTHAL, P.J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 3735-3744, 2003.

SANCHEZ, C.P.; STEIN, W.D.; LANZER, M. Dissecting the components of quinine accumulation in *Plasmodium falciparum*. **Mol. Microbiol.**, v. 67, n. 5, p. 1081-1083, 2008.

SAMUELSON, J. Doenças infecciosas. *In*: ROBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR V. Fundamentos de Robbins – Patologia Estrutural e Funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; MOSQUEIRA, V.C.F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 62, p. 560-575, 2010.

SAKAMOTO, J.H.; VAN DE VEN, A.L.; GODIN, B. *et al.* Enabling individualized therapy through nanotechnology. **Pharm. Research**, v. 62, p. 57-89, 2010.

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

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H.C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 59, p. 427-443, 2007.

SINGH, K.K.; VINGKAR, S.K. Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. **Int. J. Pharm.**, v. 347, p. 136-143, 2008.

SINGH, A.; HOZUMI, N.; SHIRAIISHI, C. CD4+ T cell response in early erythrocytic stage malaria: Plasmodium berghei infection in BALB/c and C57BL/6 mice. **Parasitol. Res.**, v. 105, p. 281-286, 2009.

SLABBERT, C.; PLESSIS, L.H.; KOTZÉ, A.F. Evaluation of the physical properties and stability of two lipid drug delivery systems containing mefloquine. **Int. J. Pharm.**, v. 409, p. 209-215, 2011.

SUH, K.N.; KAIN, K.C.; KEYSTONE, J.S. Malaria. **J. Canadian Med. Assoc.**, v. 170, n. 11, p. 1693-702, 2004.

TAN, K.R.; MAGILL, L.; PARISE, M.E. *et al.* Doxycycline for Malaria Chemoprophylaxis and Treatment: Report from the CDC Expert Meeting on Malaria Chemoprophylaxis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, p. 517-531, 2011.

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. 9º ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003.

VAUTHIER, C.; COUVREUR, P. Nanomedicines: A new approach for the treatment of serious diseases. **J. Biomed. Nanotech.**, v. 3, p. 223-234, 2007.

WATT, G.; LOESUTTIVIBOOL, L.; SHANKS, G.D. *et al.* Quinine with tetracycline for treatment of drug-resistant falciparum malaria in Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, p. 108-111, 1992.

WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

WHITE, N.J. Cardiotoxicity of antimalarials. **Lancet Infect Dis.**, v. 7, p. 549-558, 2007.

WINSTANLEY, P.O. Modern chemotherapeutic options for malaria. **Lancet**, v. 1 p. 242-250, 2001.

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A.L.; WESNSDORFER, W.H. *et al.* Epidemiology of drug-resistant malaria. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, p. 209-218, 2002.