

**UFG/UFRGS/UFSM/UFSC/USP-RP/UNESP-AR/UFOP/UFMG/UFRN/UFPE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA**



**TESE DE DOUTORADO**  
**Universidade Federal de Ouro Preto**

**NANOCÁPSULAS DE ARTEMÉTER: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-  
QUÍMICA, CARDIOTOXICIDADE, NEUROTOXICIDADE E EFICÁCIA  
NA MALÁRIA EXPERIMENTAL**

**ALESSANDRA TEIXEIRA VIDAL DINIZ**

**OURO PRETO**

**2014**

**UFG/UFRGS/UFSM/UFSC/USP-RP/UNESP-AR/UFOP/UFMG/UFRN/UFPE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA**

**NANOCÁPSULAS DE ARTEMÉTER: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-  
QUÍMICA, CARDIOTOXICIDADE, NEUROTOXICIDADE E EFICÁCIA  
NA MALÁRIA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Nanotecnologia Farmacêutica, como requisito  
para obtenção do título de Doutor.

**OURO PRETO**

**2014**

D585n     Diniz, Alessandra Teixeira Vidal.  
Nanocápsulas de Arteméter [manuscrito]: caracterização físicoquímica, cardiotoxicidade, neurotoxicidade e eficácia na malária experimental / Alessandra Teixeira Vidal Diniz. - 2014.  
129f.: il.: color; graf; tabs.

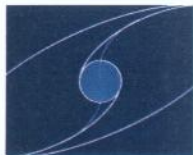
Orientador: Prof. Dr. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.  
Coorientador: Prof. Dr. Andrea Grabe-Guimarães.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. DEFAR/DEACL/DEQUI. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Malaria. 2. Medicamentos - Artemether - Efeitos colaterais. 3. cardiotoxicidade. I. Mosqueira, Vanessa Carla Furtado. II. Grabe-Guimarães, Andrea. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

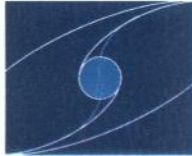
CDU: 615.1/2:620.3

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA  
UFG/UFRGS/UFMS/UFSC/USP-RP/UNESP-AR/UFOP/UFMG/UFRN/UFPE****ATA da 7ª DEFESA de TESE**

No dia 18 de junho de 2014, ocorreu a Defesa de Tese da aluna **Alessandra Teixeira Vidal Diniz** no **PROGRAMA de PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA**, em sessão presidida e registrada pela Orientadora **Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira**. A Tese tem como título: **NANOCÁPSULAS DE ARTEMÉTER: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, CARDIOTOXICIDADE, NEUROTOXICIDADE E EFICÁCIA NA MALÁRIA EXPERIMENTAL**.

De acordo com o Regimento do Programa, o processo de defesa de tese consta de duas etapas: na primeira ocorre a apresentação oral do estudo realizado e na segunda a sustentação do mesmo frente à arguição dos membros da Banca Examinadora. O Presidente da Banca Examinadora deu início aos trabalhos, com a abertura formal às 14 horas, no Auditório da Escola de Farmácia da UFOP, com a leitura da **Portaria nº. PGNANOFARMA-02/2014**, de designação da Banca Examinadora, assinada pela Coordenadora Geral do **PGNANOFARMA**. A seguir, passou a palavra à doutoranda, que apresentou seu trabalho, durante 45 minutos. Após sua exposição, foi dada a palavra aos membros da Banca Examinadora, para que procedessem à arguição da doutoranda, com respostas a cada um dos examinadores. Concluída esta fase, registraram-se as possíveis sugestões de alterações necessárias ao texto. De acordo com a avaliação dos membros da Banca Examinadora, a doutoranda **Alessandra Teixeira Vidal Diniz** foi () **aprovado(a)**; (  ) **aprovado(a) com alterações** ou (  ) **reprovado(a)**. A aprovação será válida desde que sejam satisfeitas as condições exigidas pelos membros da Banca Examinadora, com entrega da versão final da tese, referendada pela Professora Orientadora, até o prazo máximo de (  ) **30 (trinta)** ou () **60 (sessenta)** dias na Secretaria Local do Programa, a contar da presente data. A doutoranda está ciente de que somente poderá usufruir de todos os direitos e prerrogativas que o Título de Doutor lhe confere quando da Homologação da Ata em Reunião da Coordenadoria Geral do PPGNanofarma,



após entrega da documentação exigida para formação do processo de concessão do Diploma de Doutor na Universidade Federal de Ouro Preto.

Ouro Preto, 18 de junho de 2014.

**Banca Examinadora:**

ITULARES:	ASSINATURA
rofa Dra Vanessa Carla Furtado Mosqueira – residente	
rofa Dra Érika Martins Braga	
rofa Dra Maria Terezinha Bahia	
rof. Dr. Romulo Leite	
rof. Dr. Helder Ferreira Teixeira	

De acordo da Doutoranda:

Alessandra Teixeira Vidal Diniz

**Orientadora:**

Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira - Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanobiotecnologia (LDGNANO) – Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

**Co-orientadora:**

Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães - Laboratório de Farmacologia Experimental – UFOP

**Colaboradores:**

Prof. Dr. Homero Nogueira Guimarães - Departamento de Engenharia Elétrica – UFMG

Prof. Dr. José Mário Carneiro Vilela - Laboratório de Nanoscopia – Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC-MG)

Profa. Dra. Margareth Spangler Andrade - Laboratório de Nanoscopia - CETEC-MG

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia – LDGNano – e no Laboratório de Farmacologia Experimental da Universidade Federal de Ouro Preto.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)



À Lívia, fruto do amor mais forte e verdadeiro, pedacinho de mim...

## AGRADECIMENTOS

Esta tese é resultado de anos de trabalho, nos quais pude contar com o apoio e ensinamentos de pessoas especiais. A todos os envolvidos neste processo, minha sincera gratidão. Agora que alcanço meus objetivos, não poderia deixar de reconhecer a importância de cada um de vocês.

À Lívia, minha florzinha, por me permitir conhecer um amor maior que eu pudesse imaginar. Você, minha pequena, fez de mim uma pessoa muito mais forte, me concedendo a maravilhosa oportunidade de realização com as pequenas vitórias do dia-a-dia. Agora que a tese chegou ao fim, prometo ser muito mais sua!

Ao Maurício, pela cumplicidade que nos une e torna o nosso amor mais intenso. Obrigada por sua força e pela espera paciente nos momentos de ausência. Obrigada pelo auxílio precioso na digitação dos dados e na formatação deste trabalho. Enfim, obrigada por toda a sua capacidade de compreensão, por sua dedicação à nossa família, por sua presença em minha vida!

Às minhas queridas orientadoras Vanessa e Andrea, sou profundamente grata por todo o suporte pessoal e acadêmico. Obrigada por todos os ensinamentos, pela confiança e amizade, pelo incentivo e pelos exemplos de competência e perseverança no campo científico e frente às adversidades da vida. Pela admirável paciência na finalização deste trabalho. Sem vocês a meu lado, teria sido impossível prosseguir.

Aos meus amados pais, por sempre fazerem de meus anseios os seus. Pela sabedoria em me educar. Por me mostrarem todos os dias o caminho da honestidade e da solidariedade. Pela força protetora nos momentos mais difíceis. Pelo inestimável cuidado de avós nos incontáveis momentos em que tive que me ausentar.

Aos meus irmãos e sobrinho, por serem meu porto seguro. Pelo carinho acolhedor. A presença de vocês torna as coisas muito mais fáceis. A meus tios e primos pela base familiar sólida que nos une, herança de meus saudosos avós. Em especial, às vodrinhas Marta e Cida e à Gil pelos maternais cuidados com minha princesa enquanto me dedicava a este trabalho.

A meu sogro, pela torcida constante e pelas palavras de incentivo.

Aos grandes amigos e compadres Cláudia e McGlennon, obrigada pelo agradável convívio e apoio constante. Desculpem minha ausência em relação ao afilhadinho e à Ana Clara, meus sobrinhos queridos. Retomaremos nossos prazerosos finais de semana em breve!

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Experimental. Carol, Dani, Gabi e Quênia, obrigada pela ajuda valiosa ao longo de todos esses anos e por seu desprendimento na conclusão dos experimentos. Ao Renan, pelos testes de eficácia e ao Rafael por abraçar com tanta dedicação os experimentos finais. Ana Paula e Daiane, pelo auxílio nas análises dos dados. A todos que de alguma forma se envolveram: Nívea, Gisele, Rubens, Sherliane.

Carol e Dani, mais uma vez, pela amizade sincera, pela agradável companhia nas idas e vindas ouro-pretanas, pelos sorrisos, desabafos, lágrimas.

Às colegas do LDGNano por todo o suporte no preparo e caracterização das nanocápsulas. Carina, Giani e Liliam, obrigada por compartilharem comigo seus conhecimentos. Carina, ainda, pela companhia nas viagens e pelas palavras amigas. E Giani, novamente, pelo auxílio com as dosagens.

Aos professores Dr. Helder Teixeira e Dra. Maria Terezinha Bahia pela valorosa contribuição no exame de qualificação e por estarem gentilmente enriquecendo este trabalho mais uma vez. Aos professores Dra. Érika Braga e Dr. Romulo Leite pela disponibilidade em participar da banca de defesa de tese. Certamente todas as considerações serão valiosas.

Ao professor Dr. Homero Nogueira pelo sistema de aquisição de dados.

Os professores Dr. José Mário Carneiro Vilela e Dra. Margareth Spangler Andrade (CETEC-MG), pelas imagens de MFA.

À professora Dra. Érika Braga, pela doação da cepa de *Plasmodium*.

Aos professores do PPGNanofarma e do CiPharma, pelos ensinamentos.

Ao professor Dr. Sylvain Richard, Université Montpellier, pela doação do sal de arteméter.

Ao Wilson, pelo cuidado com os animais.

Às instituições que financiaram esta pesquisa:

- Capes, pela concessão da bolsa de estudos;
- Rede NANOBIOIMG e FAPEMIG pelos equipamentos e reagentes;
- Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária – CGPNMCM, Ministério da Saúde, pela doação das ampolas de Artesiane®.

**A Deus e Nossa Senhora, por me carregarem no colo quando minhas pernas falharam...**

## Resumo

Mesmo com o incremento das pesquisas na área e os esforços para sua erradicação, a malária persiste como um grave problema de saúde no Brasil e no mundo. As pesquisas recentes na área utilizam estratégias como o rejuvenescimento terapêutico de fármacos existentes, através de sua associação a nanocarreadores. No presente estudo foram desenvolvidas e caracterizadas nanocápsulas poliméricas de PCL e PLA-PEG para a administração intravenosa (IV) de arteméter, um antimalárico lipofílico e com tempo de meia-vida plasmática curta. As partículas obtidas apresentaram tamanho entre 197 e 296nm, com percentuais de encapsulação superiores a 93%. Sua eficácia antimalárica foi comprovada frente ao *Plasmodium berghei* sensível à cloroquina. A toxicidade cardiovascular aguda induzida pela administração IV do arteméter, fármaco com potencial arritmogênico, foi avaliada por meio das alterações de pressão arterial (PA) e ECG, bem como a neurotoxicidade, utilizando-se protocolo de avaliação comportamental. Dois protocolos foram utilizados para avaliar as alterações cardiovasculares *in vivo*: doses únicas e múltiplas de arteméter livre e em nanocápsulas foram administradas pela via IV a ratos Wistar. As doses únicas de 40 e 80 mg/kg de arteméter livre induziram um prolongamento do intervalo QT de 19,6 e 32,8%, respectivamente, e de 7,9 e 16,4% para as nanocápsulas de arteméter nas mesmas doses. Foram observadas hipotensão grave e bradicardia nos animais que receberam arteméter livre, com reduções na PAS e PAD de 17,8 e 22,2% para a dose de 40 mg/kg e de 41,4% e 49,9% para a dose de 80 mg/kg, respectivamente. Da mesma forma, após quatro doses de 20 mg/kg, o prolongamento do intervalo QT foi de 22,7% para o arteméter livre e 5,6% para o arteméter em nanocápsulas. No protocolo de quatro doses, o arteméter livre induziu aumentos significativos de PA e frequência cardíaca, com hipertensão e taquicardia importantes. A encapsulação do arteméter reduziu significativamente todas as alterações na PA e ECG nos dois protocolos. Embora o arteméter esteja entre os derivados de artemisinina mais neurotóxicos, este efeito não foi confirmado a partir dos testes comportamentais realizados em camundongos tratados com quatro doses de 20 mg/kg IV. Em síntese, a eficácia antimalárica foi mantida e todas as alterações cardiovasculares foram reduzidas quando o arteméter foi vetorizado em nanocápsulas, indicando a segurança da associação entre o arteméter e a formulação nanométrica proposta.

**Palavras-chave:** malária, arteméter, cardiotoxicidade, nanocápsulas, neurotoxicidade.

## Abstract

Even with the increase in research in the area and efforts to eradicate, malaria remains a major health problem in Brazil and worldwide. Recent research in the area use strategies such as therapeutic rejuvenation of of drugs already used, through their association with nanocarriers. In the present study, polymeric nanocapsules of PCL and PLA-PEG for intravenous administration of artemether, a highly lipophilic drug with short plasma half-life, were developed and characterized. The obtained particles had sizes between 197 and 296nm, with a higher percentage encapsulation of 93%. Its antimalarial efficacy was demonstrated against chloroquine-sensitive *Plasmodium berguei*. The antimalarial artemether has a cardiotoxic profile. Two protocols were used to assess *in vivo* cardiovascular changes in anaesthetized Wistar rats, single high doses and multiple doses as artemether loaded in nanocapsules or free artemether. The empty polymeric nanocapsules proved to be safe, since the maximal variation on ECG parameters were lower than 7%. Artemether dose of 40 and 80 mg/kg induced the QT interval prolongation of 19.6 and 32.8%, respectively, and 7.9 and 16.4% for artemether nanocapsules. Similarly, after four doses of 20 mg/kg the QT prolongation were 22.7% for free artemether and 5.6% for artemether loaded nanocapsules. Severe hypotension and bradycardia were observed. The SAP and DAP reduction were 17.8 and 41.4% for 40 mg/kg and 22.2 and 49.9% for 80 mg/kg free artemether, respectively. The nanocapsules loading artemether reduced all of these changes. In the four doses protocol, the free artemether induced significantly increases of the HR and AP, with important hypertension and tachycardia. Nanocapsules also reduced all the variations. Although artemether is among the most neurotoxic artemisinin derivatives, this effect was not confirmed from the behavioral tests. Summarizing, the antimalarial activity was maintained and all cardiovascular alterations were reduced when artemether was loaded in nanocapsules, indicating the safety of drug association with these polymeric nanocarriers preventing cardiovascular toxic effects.

**Keywords:** malaria, artemether, cardiotoxicity, nanocapsules, neurotoxicity.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Distribuição mundial da malária. ....	6
<b>Figura 2:</b> Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> . ....	8
<b>Figura 3:</b> Estrutura da artemisinina e seus derivados .....	12
<b>Figura 4:</b> Traçado normal do ECG .....	16
<b>Figura 5:</b> Método de ultrafiltração / centrifugação.....	24
<b>Figura 6:</b> Registro gráfico da dispersão de tamanho das formulações de nanocápsulas constituídas de PCL. ....	27
<b>Figura 7:</b> Registro gráfico do potencial das nanocápsulas.....	28
<b>Figura 8:</b> Imagens de microscopia de força atômica de nanocápsulas de PCL.....	30
<b>Figura 9:</b> Imagens de microscopia de força atômica de nanocápsulas de PLA_PEG .....	31
<b>Figura 10:</b> Cromatograma do arteméter .....	32
<b>Figura 11:</b> Curva de Calibração do arteméter .....	32
<b>Figura 12:</b> Esfregaços sanguíneos de camundongos infectados pelo <i>P. berghei</i> .....	36
<b>Figura 13:</b> Curvas de parasitemia média de camundongos Swiss infectados pelo <i>P. berghei</i> tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL na dose de 40 mg/kg.....	39
<b>Figura 14:</b> Curvas de parasitemia média de camundongos Swiss infectados pelo <i>P. berghei</i> tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL na dose de 80 mg/kg.....	40
<b>Figura 15:</b> Curvas de parasitemia média de camundongos Swiss infectados pelo <i>P. berghei</i> tratados com arteméter em nanocápsulas de PCL, nas doses de 40 e 80 mg/kg, por diferentes vias.....	42
<b>Figura 16:</b> Curvas de parasitemia média de camundongos Swiss infectados pelo <i>P. berghei</i> tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL na dose de 20 mg/kg IV.....	44
<b>Figura 17:</b> Curva de sobrevivência de camundongos Swiss infectados pelo <i>P. berghei</i> tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL na dose de 40 mg/kg.....	46
<b>Figura 18:</b> Curva de sobrevivência de camundongos Swiss infectados pelo <i>P. berghei</i> tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL na dose de 80 mg/kg.....	47

<b>Figura 19:</b> Curva de sobrevivência de camundongos Swiss infectados pelo <i>P. berghei</i> tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL na dose de 20 mg/kg IV.....	48
<b>Figura 20:</b> Protocolos experimentais para avaliação da cardiotoxicidade .....	51
<b>Figura 21:</b> Exemplo de registro de sinal da PA ao longo do tempo após a administração IV de veículo ou nanocápsulas brancas .....	54
<b>Figura 22:</b> Exemplo de registro de sinal da PA ao longo do tempo após a administração IV de 120 mg/kg de arteméter livre ou em nanocápsulas.....	54
<b>Figura 23:</b> Parâmetros do ECG em animais antes e após a administração IV de nanocápsulas brancas, arteméter livre e em nanocápsulas 80 mg/kg.....	55
<b>Figura 24:</b> Variação percentual do Intervalo QT após administração IV de dose única de arteméter 40 ou 80 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	57
<b>Figura 25:</b> Variação percentual do Intervalo QTc após administração IV de dose única de arteméter 40 ou 80 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	58
<b>Figura 26:</b> Variação percentual do Intervalo PR após administração IV de dose única de arteméter 40 ou 80 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	59
<b>Figura 27:</b> Variação percentual do Intervalo QRS após administração IV de dose única de arteméter 40 ou 80 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	60
<b>Figura 28:</b> Variação percentual de FC após administração IV de dose única de arteméter 40 ou 80 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	62
<b>Figura 29:</b> Variação percentual de PAS após administração IV de dose única de arteméter 40 ou 80 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	63
<b>Figura 30:</b> V Variação percentual de PAD após administração IV de dose única de arteméter 40 ou 80 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	64
<b>Figura 31:</b> Valores absolutos de PAS e PAD após administração IV de dose única de arteméter 40 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	65
<b>Figura 32:</b> Valores absolutos de PAS e PAD após administração IV de dose única de arteméter 80 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	66



<b>Figura 33:</b> Variação percentual máxima dos intervalos QT e QTc após administração IV de dose única de arteméter 40 e 80 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	67
<b>Figura 34:</b> Variação percentual máxima de PA e FC após administração IV de dose única de arteméter 40 e 80 mg/kg livre e em nanocápsulas. ....	68
<b>Figura 35:</b> Variação percentual dos intervalos QT e QTc após administração IV de quatro doses arteméter 20 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	69
<b>Figura 36:</b> Variação percentual de PA e FC após administração IV de quatro doses de arteméter 20 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	70
<b>Figura 37:</b> Valores absolutos de PAS e PAD após administração IV de quatro doses de arteméter 20 mg/kg livre e em nanocápsulas.....	70
<b>Figura 38:</b> Métodos para avaliação de alterações comportamentais. ....	78
<b>Figura 39:</b> Efeito do arteméter em doses múltiplas (4x 20 mg/kg IV) sobre a locomoção espontânea e atividade exploratória de camundongos .....	80
<b>Figura 40:</b> Efeito do arteméter em doses múltiplas (4x 20 mg/kg IV) sobre a capacidade exploratória de camundongos.....	80

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Indicadores de malária grave .....	9
<b>Tabela 2:</b> Agentes antimaláricos, uso e resistência.....	13
<b>Tabela 3:</b> Nanocarreadores como vetores para antimaláricos .....	19
<b>Tabela 4:</b> Características físico-químicas das nanocápsulas de PCL.....	25
<b>Tabela 5:</b> Características físico-químicas das nanocápsulas de PLA-PEG .....	25
<b>Tabela 6:</b> Eficiência e rendimento de encapsulação de nanocápsulas de arteméter .....	33
<b>Tabela 7:</b> Efeito das formulações de arteméter sobre o tempo de permanência na haste girante e sobre a força muscular dos animais na barra de tração .....	81
<b>Tabela 8:</b> Valores absolutos dos parâmetros do ECG e de PA .....	104

## Lista de abreviaturas

ALD	Anemometria de Laser Doppler
AUC	Área sob a curva
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DLS	Dynamic Light Scattering
ECG	Eletrocardiograma
EPM	Erro padrão da média
EPR	Efeito de perfusão e retenção
EUA	Estados Unidos da América
FC	Frequência cardíaca
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
MFA	Microscopia de força atômica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietilenoglicol
PLA-PEG	monometoxi de polioxietileno-co-poli-D,L-lactídeo
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SNC	Sistema nervoso central
VO	Via Oral

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão da literatura .....</b>	<b>6</b>
2.1 Malária: considerações gerais.....	6
2.2 Malária grave.....	8
2.3 Terapia antimalárica .....	11
2.4 Toxicidade dos antimaláricos .....	14
2.5 Nanotecnologia aplicada à malária .....	17
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivos específicos .....	20
<b>4. Desenvolvimento e caracterização das nanocápsulas de arteméter .....</b>	<b>21</b>
4.1 Introdução.....	21
4.2 Metodologia.....	21
4.2.1 Preparo das nanocápsulas.....	21
4.2.2 Distribuição de tamanho e potencial zêta.....	22
4.2.3 Determinação do teor de arteméter por CLAE.....	22
4.2.4 Análise morfológica das nanocápsulas .....	24
4.3 Resultados e Discussão .....	24
<b>5. Avaliação da eficácia antimalárica do arteméter .....</b>	<b>35</b>
5.1 Introdução.....	35
5.2 Metodologia.....	35
5.3 Resultados e Discussão .....	37
<b>6. Avaliação da cardiotoxicidade do arteméter .....</b>	<b>50</b>
6.1 Introdução.....	50
6.2 Metodologia.....	50
6.3 Resultados e discussão .....	52
<b>7. Avaliação da neurotoxicidade do arteméter .....</b>	<b>75</b>
7.1 Introdução.....	75
7.2 Metodologia.....	75
7.2.1 Método de campo aberto ( <i>Open-field</i> ).....	76
7.2.2 Método de labirinto em cruz elevado.....	76
7.2.3 Método de haste girante (Rota road) .....	77
7.2.4 Método de tração .....	77

7.3	Resultados e Discussão .....	78
<b>8.</b>	<b>Discussão geral.....</b>	<b>83</b>
<b>9.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>87</b>
<b>10.</b>	<b>Perspectivas .....</b>	<b>89</b>
<b>11.</b>	<b>Referências.....</b>	<b>90</b>
<b>12.</b>	<b>Apêndices.....</b>	<b>103</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A malária, infecção parasitária humana, é considerada importante causa de morbidade em crianças e adultos e a segunda maior causa de mortalidade no mundo, matando mais de meio milhão de pessoas por ano (WHO, 2012). A malária humana tem como agentes etiológicos quatro espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. falciparum*), além do *P. knowlesi*, parasita símio que passou a infectar o homem. Os casos mais graves da doença são decorrentes da infecção pelo *Plasmodium falciparum* (DANESHVAR *et al.*, 2009; WHO, 2012; WHITE *et al.*, 2014). A malária causa considerável morbidade e mortalidade no Brasil (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). A malária grave, sobretudo na sua forma de síndrome inflamatória disseminada que acomete especialmente a microvasculatura dos órgãos vitais como o cérebro, causa uma forma grave e fatal da doença, que é uma das maiores causas de morte de crianças na África e no mundo (LIKWELAA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012).

Vários estudos vêm demonstrando o rápido desenvolvimento de resistência do *Plasmodium falciparum* aos fármacos antimaláricos disponíveis, incluindo a cloroquina (LEHANE *et al.*, 2012) e, mais recentemente, também aos derivados da artemisinina (CHENG *et al.*, 2012; WHO, 2010; WHO, 2012). Este fator reduz as perspectivas de sucesso dos esquemas terapêuticos usualmente empregados. As estratégias modernas para o controle dessa doença preveem ações conjuntas, como o combate do inseto vetor, diagnóstico rápido e preciso, garantia de terapêutica adequada, associação de fármacos antimaláricos, além do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e vacinas (SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010; WHO, 2012). Diante deste cenário, o desenvolvimento de novas quimioterapias, a busca por novos alvos e o fortalecimento das políticas de controle à infecção formam, em conjunto, o principal plano para eliminação do *Plasmodium* (WHO, 2012; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A otimização da ação dos fármacos em utilização no momento e o rejuvenescimento terapêutico de antigos fármacos antimaláricos através de novos

estudos de formulação, tais como a inclusão em nanocarreadores, são estratégias que vêm sendo utilizadas na pesquisa. A associação de tais fármacos com lipossomas, sistemas nanoemulsionados e nanopartículas poliméricas vem permitindo um melhor controle da cinética de liberação do fármaco, resultando em níveis plasmáticos mais adequados aos esquemas terapêuticos. Esta estratégia resulta, muitas vezes, em redução dos efeitos tóxicos e aumento da eficácia desses antimaláricos (CHIMANUKA *et al.*, 2002; MOSQUEIRA *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2007; SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010). (HAAS *et al.*, 2009).

Existem diversas metodologias de produção de carreadores de fármacos dentro da escala nanométrica, sendo várias delas simples e pouco dispendiosas, que possibilitam o uso de polímeros e tensoativos acessíveis comercialmente e obtenção de nanocarreadores com métodos escalonáveis para a produção industrial. Dentre as técnicas disponíveis para a produção de nanocápsulas, o método de nanoprecipitação seguida de deslocamento de solvente (FESSI *et al.*, 1989), o método de emulsificação seguido de remoção do solvente (MORA-HUERTAS *et al.*, 2012), a homogeneização a altas pressões e a extrusão em membranas são os métodos mais utilizados tanto em escala laboratorial quanto industrial. A hidrofobicidade da molécula é uma característica essencial nesses processos, permitindo uma alta taxa de associação de fármacos com o núcleo oleoso das nanocápsulas poliméricas, nanocarreadores adequados para administração parenteral, ou mais precisamente a via intravenosa (IV) (REIS *et al.*, 2006; MORA-HUERTAS *et al.*, 2012) no caso de doenças como a malária grave.

Os carreadores convencionais, com superfície polimérica mais hidrofóbica, podem ter a superfície modificada pela formação de uma coroa polimérica hidrofílica e bastante solvatada. Esta estratégia de modificação da superfície, denominada estabilização estérica, permite torná-los parcialmente “invisíveis” por algum tempo, frente ao sistema imunológico após administração IV. Estas partículas com circulação sanguínea prolongada, também chamadas de “furtivas” são mais lentamente opsonizadas e capturadas pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) (GREF *et al.*, 1994; MOSQUEIRA *et al.*, 2001). Assim, com o uso desses sistemas podem-se obter

perfis de distribuição e acúmulo do fármaco em diferentes órgãos que não fazem parte do SFM (MOSQUEIRA *et al.*, 2001a) e, principalmente pode-se obter uma redução do volume de distribuição aparente do fármaco associado, mantendo-o por mais tempo dentro do compartimento vascular (MOSQUEIRA *et al.*, 2001a; REIS *et al.*, 2006). Esses permanecem na circulação por mais tempo, e como resultado, a associação fármaco-carreador sofre acúmulo gradual nos sítios traumáticos, como infecções (MAYA *et al.*, 2012; MORITZ e GESZKE-MORITZ, 2013), tumores (NICHOLS e BAE, 2012; PODDUTURI *et al.*, 2013), inflamações (PEREIRA *et al.*, 2009; ISHIHARA *et al.*, 2010; ULBRICH e LAMPRECHT, 2010) e tecidos infartados (SUN *et al.*, 2012; PAULIS *et al.*, 2012), devido ao efeito de perfusão e retenção (EPR) aumentadas nesses locais. A encapsulação também está associada à seletividade de ação nos órgãos ou células alvos (SINHA *et al.*, 2013) e maior alcance e concentração no nível intracelular (MAYA *et al.*, 2012), características essenciais para se vencer o desafio do tratamento da malária. Considerando que as células alvo (hemácias infectadas pelo *Plasmodium*) podem manter contato com os sistemas de liberação manométricos logo após a administração IV do fármaco, esta linha torna-se bastante interessante para o tratamento da malária. De fato, vários nanodispositivos vêm demonstrando eficácia no desenvolvimento de vacinas e quimioterápicos destinados ao controle da malária experimental (LEITE *et al.*, 2007; HAAS *et al.*, 2009; ADITYA *et al.*, 2010; TRIPATHY *et al.*, 2012; MEMVANGA e PRÉAT, 2012; PATIL *et al.*, 2013).

Os derivados da artemisinina, extraída da planta *Artemisia annua*, compõem hoje a principal classe de fármacos utilizada na terapêutica da malária (WHO, 2010; WHO, 2013; HORTELANO *et al.*, 2013). O arteméter, um desses derivados, é um fármaco muito ativo contra o *Plasmodium*, inclusive em cepas resistentes à cloroquina, atuando como potente inibidor da formação da hemozoína e da degradação da hemoglobina, devido à presença do grupo heme (MESHNICK, 2002). Por esta razão, este fármaco foi incluído na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o tratamento da malária grave multirresistente (WHO, 2010; WHO, 2013). No Brasil, o arteméter é fornecido pelo Programa Nacional de Combate à Malária do Ministério da Saúde na forma de injeções intramusculares. No entanto, sua



meia-vida de eliminação curta – entre 3 e 5 horas, o risco de degradação em condições ácidas e baixa solubilidade aquosa, com consequente baixa biodisponibilidade oral (cerca de 30%), são fatores que tornam necessárias várias aplicações parenterais diárias, resultando em baixa adesão dos pacientes ao tratamento (VAN AGTMAEL *et al.*, 1999; HIEN *et al.*, 2004). Além disso, a administração intramuscular está associada a um alto risco de absorção errática (HIEN *et al.*, 2004; WHO, 2010), cardio e neurotoxicidade (NONTPRASERT *et al.*, 1998; NONTPRASERT *et al.*, 2000; WHITE, 2007) e não é considerada adequada para o tratamento da malária cerebral, ou quando a supressão rápida do parasita é necessária (DONDORP e DAY, 2007; GAY *et al.*, 2012; WHO, 2013). Portanto, o desenvolvimento de uma forma farmacêutica para administração parenteral (IV) de arteméter, a qual poderia também ser utilizada por via oral, representa uma vantagem importante do ponto de vista do tratamento da malária grave.

O alto risco de toxicidade associado ao arteméter também é um fator que limita sua aplicação terapêutica (MEDHI *et al.*, 2009; AKINLOLU e SHOKUNBI, 2010). Este fármaco, assim como outros derivados da artemisinina, foi associado à efeitos adversos de neurotoxicidade (LI e HICKMAN, 2011), sendo o responsável pelo desenvolvimento de uma síndrome neurológica progressiva em cães e ratos, incluindo colapso cardiorrespiratório e perda dos reflexos espinhais (CLASSEN *et al.*, 1999; AKINLOLU e SHOKUNBI, 2010). Nontprasert *et al.* (2000) também relataram o aparecimento de sinais neurotóxicos em camundongos tratados com arteméter por via oral e intramuscular, sendo as alterações mais severas observadas apenas no último grupo. As condições que levam à neurotoxicidade pelo uso dos derivados da artemisinina ainda não foram bem estabelecidas, embora sejam associadas à presença dos fármacos e seus metabólitos no sistema nervoso central (SNC) (GENOVESE e NEWMAN, 2008).

Os derivados da artemisinina, incluindo o arteméter, possuem ainda um potencial efeito arritmogênico, levando a um prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma (ECG) (HIEN *et al.*, 1996; CLASSEN *et al.*, 1999; WHITE, 2007). O prolongamento do intervalo QT tem sido extensamente relacionado ao tratamento

com antimaláricos, em especial com o halofantrino e com as quinolinas quinina e mefloquina (HARA e KIZAKI, 2002; TOUZE *et al.*, 2002; TRAEBERT e DUMOTIER, 2005; WHITE, 2007). Tal alteração constitui a mais importante anormalidade do traçado eletrocardiográfico, devido à associação entre o prolongamento do intervalo QT e arritmias ventriculares potencialmente fatais (MOSKOVITZ *et al.*, 2013). O prolongamento do intervalo QT decorrente do uso de halofantrino parece estar associado à inibição do canal de potássio, responsável pelo potencial de ação no início da repolarização que determina o intervalo QT (HARA e KIZAKI, 2002). Por outro lado, em relação aos derivados da artemisinina, tal efeito parece ser secundário à toxicidade sobre o SNC (WHITE, 2007). Independente da via, o estabelecimento da chamada “síndrome do QT longo” leva ao desenvolvimento de taquicardia ventricular polimórfica atípica conhecida como “*torsade de pointes*” e, em muitos, mas não todos os casos, a um risco relativamente elevado de morte súbita (MOSKOVITZ *et al.*, 2013).

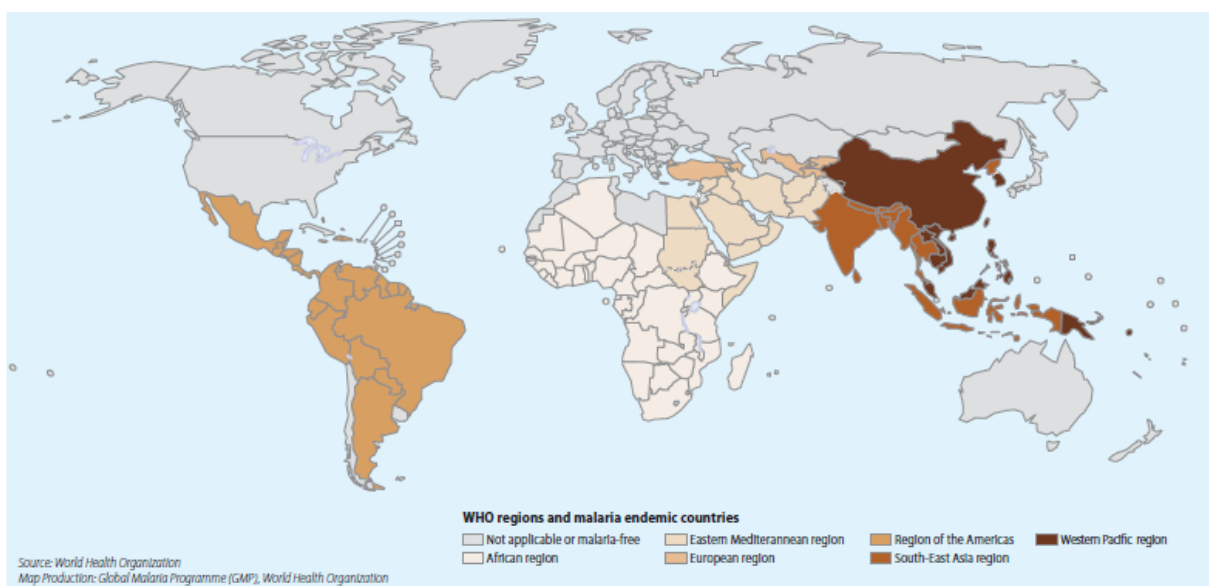
Assim, o desenvolvimento de alternativas que viabilizem a transposição das limitações relacionadas ao arteméter seria de grande utilidade na terapêutica da malária. Uma das possibilidades consiste em modificar sua biodistribuição por associá-lo a um sistema transportador nanométrico, sem alterar sua composição química ou seu mecanismo de ação. A principal hipótese a ser testada consiste na capacidade das nanoestruturas em modificar o perfil de distribuição e depuração plasmática do arteméter, alterando sua eficácia terapêutica. Espera-se também, com a redução da associação do arteméter encapsulado com os tecidos não-alvos (menor volume de distribuição), reduzir a toxicidade em relação à administração na sua forma livre, mantendo-o por mais tempo no compartimento alvo, em contato com os eritrócitos do sangue infectados.

Diante do exposto, neste estudo propõe-se incorporar o arteméter, fármaco altamente lipofílico, em nanocápsulas poliméricas para o aumento de sua estabilidade, para o prolongamento de sua liberação pela via IV, visando uma potencial redução da sua cardiotoxicidade e neurotoxicidade *in vivo*, além da investigação do perfil de eficácia em modelo experimental murino.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Malária: considerações gerais

A malária ou paludismo, doença parasitária que tem como agentes etiológicos os protozoários intraeritrocitários do gênero *Plasmodium*, permanece como um dos maiores problemas de saúde a serem combatidos em nível nacional (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013) e mundial (WHO, 2012). A distribuição atual da malária abrange regiões tropicais e grande parte do subtropicais (Figura 1).



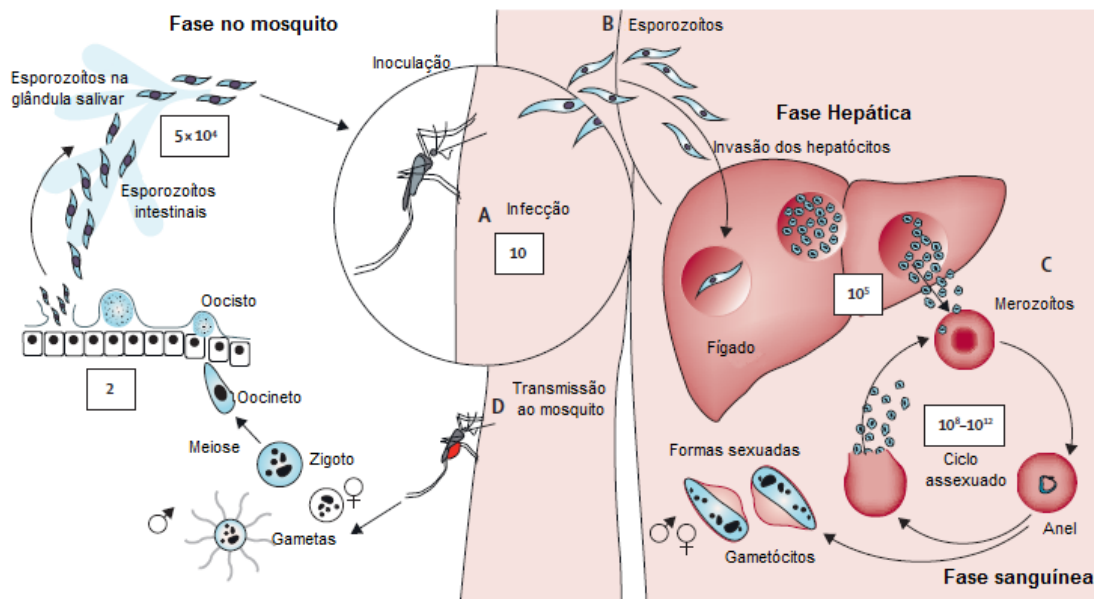
**Figura 1:** Distribuição mundial da malária. Fonte: WHO, 2012.

Segundo o relatório da OMS, *World Malaria Report*, publicado no último ano, apesar do crescimento do financiamento internacional para a prevenção, controle e eliminação da doença, a endemia ainda atinge 104 países e, só em 2010, ocorreram 219 milhões de casos de malária, com 660 mil mortes. Mais de 90% das mortes ocorreram no continente africano (MHARAKURWA *et al.*, 2012), decorrentes das formas graves da doença, como a malária cerebral e a anemia grave, atingindo majoritariamente crianças com menos de cinco anos de idade (LIU *et al.*, 2012).

No Brasil, a malária é endêmica e ocorre a transmissão de três espécies de parasitas: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, sendo o primeiro o causador da maioria das infecções (BRAZ *et al.*, 2013). O país é responsável por 55% dos casos da doença

notificados nas Américas, sendo registrados, em média, 422.858 casos por ano, com 99,7% da transmissão concentrando-se na região Amazônica (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A infecção ocorre através da picada de fêmeas do inseto do gênero *Anopheles* (figura 2) (WHITE *et al.*, 2014). O ciclo inicia-se com a inoculação de esporozoítos na derme (A), que alcançam os capilares linfáticos locais e, em seguida, migram para o fígado (B). Cada um dos esporozoítos invade um hepatócito e se multiplica, dando início à fase hepática da malária, clinicamente assintomática. Após cerca de uma semana os esquizontes hepáticos eclodem, liberando milhares de merozoítos na corrente sanguínea, os quais invadem os eritrócitos e iniciam o ciclo assexuado (C). A eclosão dos esquizontes sanguíneos, seguida da destruição da hemácia infectada, libera na circulação sanguínea novos parasitas aptos a infectar outras hemácias, perpetuando o ciclo assexuado. A doença se manifesta quando o total de parasitas assexuados na circulação chega a 100 milhões. Alguns parasitas se desenvolvem em formas sexuais (gametócitos), que não estão envolvidos na sintomatologia da doença, mas são as formas de transmissão para o hospedeiro invertebrado (D), onde se reproduzem sexuadamente, originando um oocineto e, em seguida, um oocisto no intestino do mosquito. O oocisto se rompe e libera esporozoítos, que migram para as glândulas salivares e aí permanecem até inoculação no próximo repasto sanguíneo. O ciclo completo pode durar um mês. Rotas menos comuns de infecção incluem a transfusão de sangue com eritrócitos parasitados e a transmissão congênita. (MICHALAKIS e RENAUD, 2009; NADJM e BEHRENS, 2012; WHITE *et al.*, 2014).



**Figura 2:** Ciclo de vida do *Plasmodium*. Fonte: **WHITE et al., 2014**, traduzido.

## 2.2 Malária grave

A malária grave é causada primariamente por *P. falciparum*, traduzindo-se por um distúrbio complexo multissistêmico, com uma gama variável de quadros clínicos (DONDORP *et al.*, 2000; MAITLAND e MARSH, 2004; CRAWLEY *et al.*, 2010; OSONUGA *et al.*, 2011; GAY *et al.*, 2012; LIKWELAA *et al.*, 2012). Esta definição abrange a maioria dos pacientes com risco de morte e identifica as crianças que necessitam de hospitalização e tratamento por via parenteral (JALLOW *et al.*, 2012). Tal forma representa a terceira causa de morte na infância (LIU *et al.*, 2012) e afeta principalmente crianças menores de cinco anos de idade (REYBURN *et al.*, 2005; MILNER JR *et al.*, 2008; CRAWLEY *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012), sobretudo aquelas com alta taxa de parasitemia – acima de 4-5% dos eritrócitos infectados – e sem exposição prévia a agentes antimaláricos (CRAWLEY *et al.*, 2010).

A malária grave pode ocorrer de três a sete dias após o início da febre, contudo existem relatos de situações de ocorrência de gravidade com óbito após 24 horas do início dos sintomas em pacientes não imunes (MAITLAND e MARSH, 2004), sendo a maioria das mortes decorrentes de malária cerebral e/ou anemia profunda

(JALLOW *et al.*, 2012). O curso da doença resulta da associação de fatores específicos do parasita, tais como adesão e sequestro na microcirculação e a liberação de mediadores inflamatórios no hospedeiro, como produção de citocinas, quimiocinas e antígenos celulares (MAITLAND e MARSH, 2004; CUNNINGTON *et al.*, 2013). A gravidade depende da combinação de vários processos, como a proliferação rápida da infecção em eritrócitos, a destruição maciça de eritrócitos (parasitados ou não) e a obstrução microvascular associada ao processo inflamatório. Esta obstrução pode resultar na redução da perfusão tecidual, principalmente na microcirculação cerebral, o que leva geralmente ao coma (DONDORP *et al.*, 2000). As manifestações clínicas das formas mais graves de malária dependem da idade e do estado geral do paciente (REYBURN *et al.*, 2005; JALLOW *et al.*, 2012) e incluem prostração, alterações da consciência, convulsões, dificuldade respiratória, anemia, icterícia e choque (MAITLAND e MARSH, 2004; OSONUGA *et al.*, 2011; LIKWELAA *et al.*, 2012; VAN DEN STEEN *et al.*, 2013). De acordo com a OMS, pacientes com parasitemia por *P. falciparum* acima de 5% e a presença de uma ou mais das características clínicas e laboratoriais sumarizadas na tabela 1, caracterizam a malária grave.

**Tabela 1:** Indicadores de malária grave

<b>Alterações da consciência ou coma</b>	Coma não despertável, persistente por mais de 30 minutos depois de uma convulsão generalizada.
<b>Prostração</b>	Fraqueza generalizada, o paciente é incapaz de caminhar ou sentar-se sem ajuda.
<b>Múltiplas convulsões</b>	Mais de dois episódios em 24 horas.
<b>Dificuldades respiratórias</b>	Respiração profunda ou acidose respiratória.
<b>Colapso circulatório</b>	Pressão arterial sistólica inferior a 70 mmHg ou 50 mmHg em adultos ou crianças, respectivamente.
<b>Hipertermia</b>	Temperatura corporal superior a 40°C.
<b>Hipoglicemia</b>	Glicemia inferior a 2,2 mmol/l ou 40 mg/dl.
<b>Acidose metabólica</b>	Bicarbonato no plasma inferior a 15mmol/l.
<b>Anemia normocítica severa</b>	Hemoglobina inferior a 5g/dl ou hematócrito menor a 15%.
<b>Hiperlactatemia</b>	Lactato sérico superior a 5 mmol/l.
<b>Insuficiência renal</b>	Creatinina sérica superior a 265 mmol/l.

Fonte: (WHO, 2010)

O aumento da mortalidade por malária grave está relacionado à ocorrência de malária cerebral (GAY *et al.*, 2012), convulsões e complicações metabólicas, tais como hipoglicemia (OSONUGA *et al.*, 2011) e acidose láctica (CRAWLEY *et al.*, 2010). O envolvimento neurológico por *P. falciparum* é comum, sendo que a associação entre diminuição da consciência e síndrome respiratória aumenta consideravelmente o risco de morte (VAN DEN STEEN *et al.*, 2013). Em crianças, a malária cerebral é a principal causa de óbitos (JALLOW *et al.*, 2012), particularmente em áreas de alta endemicidade e, dentre as sobreviventes, quase um quarto desenvolve sequelas neurológicas (LIKWELAA *et al.*, 2012).

A malária cerebral é definida pela OMS como o estado de coma em um paciente com parasitemia comprovada para *P. falciparum*, no qual outras causas de encefalopatia foram excluídas (WHO, 2013). O principal evento envolvido na patogênese da doença é o sequestro de eritrócitos parasitados nas vênulas pós-capilares da circulação cerebral, acarretando um processo inflamatório (DONDORP *et al.*, 2000; IDRO *et al.*, 2005; CUNNINGTON *et al.*, 2013). A produção de toxinas pelo parasita e de citocinas pelo hospedeiro, acompanhados pela amplificação de receptores para citoaderência expressos nas células do endotélio capilar cerebral, contribuem para a gênese dos eventos neurológicos (MAITLAND e MARSH, 2004). Uma possível causa de morte associada à malária cerebral é o desequilíbrio na produção de fatores neurotóxicos e neuroprotetores, provocadas pela inflamação cerebral (CUNNINGTON *et al.*, 2013). Clinicamente, a síndrome é altamente variável, com a maioria dos casos abrangidos em uma das três categorias principais: coma com desarranjo fisiológico acentuado (anemia severa, acidose metabólica, insuficiência respiratória, choque); coma com prolongada ou várias convulsões, perda de consciência, desvio conjugado dos olhos, salivação e hipoventilação ou uma síndrome neurológica pura de coma e postura motor anormal, que pode ser complicada pelo aumento da pressão intracraniana e crises recorrentes (IDRO *et al.*, 2005; GAY *et al.*, 2012). A taxa de mortalidade em adultos e crianças é de cerca de 20%, e a maioria das mortes acontece nas primeiras 24 horas após a hospitalização, antes mesmo dos efeitos farmacológicos dos antimaláricos (JALLOW *et al.*, 2012). Portanto, a

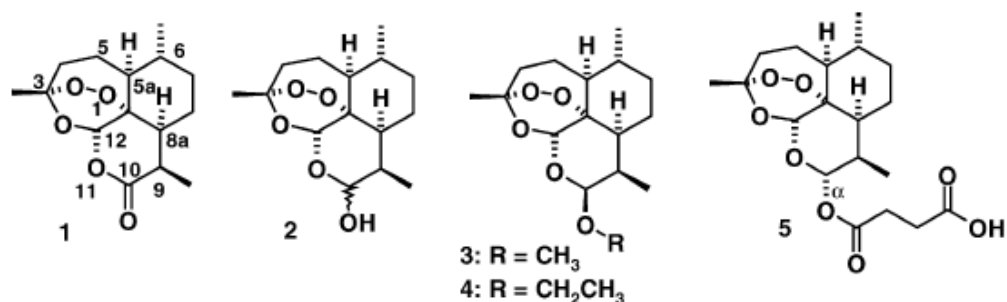
administração de quimioterapia por via parenteral é uma regra para se atingir uma resposta mais rápida do tratamento.

### **2.3 Terapia antimalárica**

A OMS categoriza, através do *Guidelines for the treatment of malaria*, as recomendações baseadas em evidências para o manejo da doença (WHO, 2010). Informações como a gravidade da doença, espécie de plasmódio, idade do paciente, histórico de exposição à infecção e a suscetibilidade dos parasitas aos antimaláricos devem preceder a tomada de decisão para o tratamento adequado (NADJM e BEHRENS, 2012; HORTELANO *et al.*, 2013). Classicamente, a terapêutica antimalárica deve se basear no potencial dos fármacos em destruir o *Plasmodium* por diferentes mecanismos de ação, retardando e principalmente, impedindo o desenvolvimento de resistência (WHO, 2010; WHO, 2013).

A terapia medicamentosa da malária não complicada foi revolucionada pela introdução das terapias combinadas contendo derivados da artemisinina: arteméter, artesunato ou dihidroartemisinina (HASTINGS, 2011; CASTELLI *et al.*, 2012). Embora seu mecanismo de ação não tenha sido completamente elucidado, o anel endoperóxido (figura 3) desta classe de medicamentos é necessário para a atividade antimalárica (KRUNGKRAI e YUTHAVONG, 1987). A eficácia anti-*Plasmodium* está relacionada à formação de radicais livres dependentes de ferro. Sendo o parasita da malária rico em ferro heme, derivado da proteólise da hemoglobina da célula hospedeira (MESHNICK *et al.*, 1993), o heme intraparasitário pode, então, funcionar de forma a ativar as artemisininas em radicais livres tóxicos e, uma vez formados, estes parecem danificar alvos intracelulares específicos do parasito, possivelmente através de alquilação (MESHNICK, 2002; KRISHNAA *et al.*, 2004).





**Figura 3:** Estrutura da artemisinina (1) e seus derivados: dihidroartemisinina (2), arteméter (3), arteéter (4) e artesunato (5). Fonte: (KRISHNAA *et al.*, 2004)

A artemisinina atua em quase todas as fases do ciclo intraeritrocítico do *Plasmodium*, reduzindo rapidamente a parasitemia (HORTELANO *et al.*, 2013). Ao matar rapidamente as formas jovens do parasita, os derivados da artemisinina não só impedem o desenvolvimento de trofozoítos maduros e esquizontes, os quais podem ser sequestrados e causar a forma grave da doença (NZILA e CHILENGI, 2010), como reduzem a formação de gametócitos e, assim, os riscos de transmissão (WHO, 2010). Devido à meia-vida curta de eliminação dos derivados da artemisinina, a primeira linha de tratamento da malária por *P. falciparum* inclui a associação de arteméter, artesunato ou dihidroartemisinina a outros antimaláricos com maior tempo de meia vida plasmática, possibilitando a utilização de esquemas terapêuticos mais adequados e, conseqüentemente, maior adesão dos pacientes ao tratamento (GERSTL *et al.*, 2010), reduzindo a possibilidade de aparecimento de resistência (HASTINGS, 2011). Atualmente, são indicadas as seguintes combinações com derivados da artemisinina: arteméter e lumefantrino (COARTEM<sup>®</sup>, RIAMET<sup>®</sup>), artesunato e amodiaquina (COARSUCAM<sup>®</sup>), artesunato e mefloquina (artesunato+mefloquina, FARMANGUINHOS<sup>®</sup>), artesunato e sulfadoxina-pirimetamina ou dihidroartemisinina e piperquina (EURARTESIM<sup>®</sup>), sendo que a escolha deve ser orientada pela resistência regional do parasita ao fármaco associado (WHO, 2010). Para a malária grave, considerada sempre uma emergência médica, o tratamento requer a admissão dos pacientes em unidades de tratamento intensivo (UTI) (DONDORP e DAY, 2007; LIKWELAA *et al.*, 2012). O tratamento parenteral deve ser administrado sempre que houver suspeita da forma grave da doença (LALLOO *et al.*, 2007). Os protocolos de

tratamento da OMS (WHO, 2010; WHO, 2013) referem-se a duas classes de medicamentos para uso parenteral no tratamento farmacológico da malária grave: os alcalóides da Cinchona – quinina e quinidina e os derivados da artemisinina – artesunato, arteméter e artemotil. Recentemente, Dondorp *et al.* (2010) comprovaram, em um estudo multicêntrico realizado com 5.425 crianças africanas menores de 15 anos internadas com malária grave, uma redução significativa de 22,5% na taxa de mortalidade nos pacientes tratados com artesunato IV, em comparação àqueles que receberam quinina, motivo pelo qual esse passou a ser considerado como primeira opção terapêutica em todo o mundo (WHO, 2013). A incidência de convulsões, coma e hipoglicemia também foi significativamente reduzida, sem haver diferença significativa na incidência de sequelas neurológicas graves (DONDORP *et al.*, 2010).

Outras classes de antimaláricos disponíveis estão relacionadas na Tabela 2. Embora seu uso esteja atualmente limitado devido ao desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e ao surgimento de resistência, alguns ainda são utilizados em áreas de baixa endemicidade (LALLOO *et al.*, 2007; NZILA e CHILENGI, 2010).

**Tabela 2:** Agentes antimaláricos, uso e resistência

Classe	Antimalárico	Uso terapêutico	Relato de resistência
<b>4-aminoquinolina</b>	Cloroquina	malária por <i>P. falciparum</i>	(LEHANE <i>et al.</i> , 2012)
<b>4-aminoquinolina</b>	Amodiaquina	tratamento da malária não-complicada	(FOLARIN <i>et al.</i> , 2011)
<b>aminoálcool</b>	Quinina	tratamento da malária não-complicada	(MÉNARD <i>et al.</i> , 2013)
<b>aminoálcool</b>	Mefloquina	profilaxia da malária	(NA-BANGCHANG <i>et al.</i> , 2007)
<b>aminoálcool</b>	Halofantrino	em desuso	(WILSON <i>et al.</i> , 1993)
<b>antifolato</b>	Pirimetamina/ sulfadoxina	tratamento da malária em gestantes	(ZAKERI <i>et al.</i> , 2010)
<b>amino-8-quinoleínas</b>	Primaquina	malária por <i>P. vivax</i> . Profilaxia da malária por <i>P. falciparum</i>	(ARNOLD <i>et al.</i> , 1961)
<b>triazina</b>	Proguanil	profilaxia da malária	(MUSSET <i>et al.</i> , 2006)

## 2.4 Toxicidade dos antimaláricos

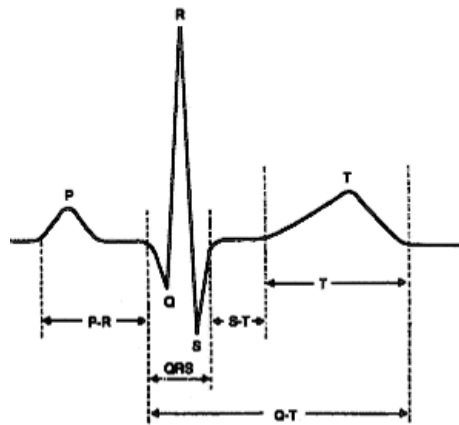
A toxicidade relacionada aos medicamentos antimaláricos tem sido amplamente relatada e revisada nos últimos anos incluindo, principalmente, neurotoxicidade (TOOVEY, 2007; LI e HICKMAN, 2011; ERICKSON *et al.*, 2011), embriotoxicidade (LONGO *et al.*, 2010; BOARETO *et al.*, 2012; MCGREADY *et al.*, 2012) e cardiotoxicidade (HARA e KIZAKI, 2002; TRAEBERT e DUMOTIER, 2005; WHITE, 2007). As toxicidades relatadas abrangem os componentes das classes terapêuticas mais utilizadas na atualidade, que são os alcalóides extraídos da cinchona e os derivados da artemisinina.

A artemisinina e seus derivados compõem a classe de antimaláricos mais relacionada à neurotoxicidade e, por isso, o assunto é tópico frequente de revisões (GENOVESE e NEWMAN, 2008; MEDHI *et al.*, 2009; LI e HICKMAN, 2011). Efeitos neurotóxicos foram observados em modelos animais após a administração parenteral prolongada de altas doses de arteméter (NONTPRASERT *et al.*, 1998; CLASSEN *et al.*, 1999; AKINLOLU e SHOKUNBI, 2010), e de arteéter (NONTPRASERT *et al.*, 1998; ERICKSON *et al.*, 2011). Os sinais relatados incluem danos aos centros do tronco cerebral envolvidos no processamento auditivo e reflexos vestibulares (NONTPRASERT *et al.*, 1998) e ao núcleo trapezoidal (AKINLOLU e SHOKUNBI, 2010), refletindo em diminuição da motilidade, tremores, convulsões e morte (CLASSEN *et al.*, 1999; AKINLOLU e SHOKUNBI, 2010; ERICKSON *et al.*, 2011). Os efeitos limitam-se, contudo, à administração parenteral, não sendo observados após a administração oral de arteméter em animais adultos (CLASSEN *et al.*, 1999; NONTPRASERT *et al.*, 2000) ou de arteméter em ratos recém-nascidos (BECKMAN *et al.*, 2013). Tal fato é devido, provavelmente, às menores concentrações plasmáticas dos fármacos após sua administração oral (MEDHI *et al.*, 2009). Apesar da existência de diversos estudos clínicos para avaliação dos efeitos dos derivados da artemisinina, não existem evidências significativas de toxicidade sobre o SNC em seres humanos. No entanto, em pacientes severamente acometidos, é possível que a ausência de relatos se deva à dificuldade de distinguir os eventos neurotóxicos relacionados aos fármacos dos eventos sobre o SNC inerentes à malária (GENOVESE e NEWMAN, 2008).

Gestantes, principalmente primigestas, são especialmente susceptíveis à infecção por malária, uma vez que o acúmulo de eritrócitos parasitados na placenta contribui para o aumento da carga parasitária e ativação aumentada do sistema de complemento, eventos responsáveis pela morbidade e mortalidade materna e efeitos adversos sobre o embrião, como morte intrauterina, parto prematuro, baixo peso ao nascer e transmissão vertical da doença (MCGREADY *et al.*, 2012; KHATTAB *et al.*, 2013). Mc Donald *et al.* (2013) acreditam que a ativação excessiva do complemento pode resultar, ainda, em comprometimento neurocognitivo das crianças expostas à malária no período intrauterino, secundário à neuroinflamação e desregulação da angiogênese neurovascular mediadas pelos componentes do complemento. Desta maneira, a terapia antimalárica deve ser imediatamente iniciada após o diagnóstico (WHO, 2010). No entanto, efeitos embriotóxicos como malformações do esqueleto, teratogenicidade e aumento da embriofetividade *in vivo* são frequentemente descritos em relação aos antimaláricos (CLARCK, 2009). As artemisininas compõem a classe mais relacionada à ocorrência deste tipo de toxicidade, sendo encontrados relatos de aumento da letalidade associada à administração oral de 3,5 mg/kg de arteméter em ratas (EL-DAKDOKY, 2009), malformações tissulares e ósseas para o artesunato na dose de 15 mg/kg por via oral (BOARETO *et al.*, 2012) e malformações no coração, cabeça e na região caudal de culturas de embriões de ratos expostos a artemisinina e arterolano (LONGO *et al.*, 2010). O mecanismo para a embriotoxicidade parece estar, segundo estes autores, relacionado a um “efeito da classe” dos antimaláricos que atuam como endoperóxidos. Boareto *et al.*, (2012), por sua vez, mostraram que a associação com mefloquina pode atenuar as alterações fetais do artesunato administrado a ratas prenhas.

A cardiotoxicidade dos antimaláricos é marcada, principalmente, pelo prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma (ECG) (figura 4) (WHITE, 2007). Este corresponde ao tempo desde o início do complexo QRS até ao final da onda T e representa as manifestações eletrocardiográficas da despolarização do miocárdio, decorrente do influxo de íons sódio, seguida da repolarização ventricular, após o efluxo de íons potássio. Anormalidades neste seguimento podem ser correlacionadas

ao início de complicações cardiovasculares agudas como taquiarritmias ventriculares malignas e “*torsades de pointes*”, marcadas clinicamente por síncope, palpitações, atividade convulsiva ou morte súbita (MOSKOVITZ *et al.*, 2013).



**Figura 4:** Traçado normal do ECG

Fármacos utilizados na terapêutica da malária podem produzir atrasos significativos na repolarização ventricular, resultando em um prolongamento do intervalo QT do ECG (TRAEBERT e DUMOTIER, 2005; WHITE, 2007). A descoberta tardia de que o halofantrino está relacionado ao prolongamento dose-dependente do intervalo QT e ocorrência de morte súbita despertou a atenção para a potencial cardiotoxicidade dos antimaláricos (NOSTEN *et al.*, 1993; MONLUN *et al.*, 1995). A ocorrência de prolongamento do intervalo QT, levando à taquicardia ventricular seguida por fibrilação ventricular e morte súbita foi também relatada após a administração de quinina IV em casos de malária por *P. falciparum* em pacientes debilitados, predispostos a altas concentrações plasmáticas do fármaco (BONINGTON *et al.*, 1996).

Em relação aos derivados da artemisinina, a administração prolongada de altas doses orais e intramusculares de arteémeter e arteéter foi associada a um aumento significativo do intervalo QT em estudos toxicológicos realizados em cães, sugerindo cardiotoxicidade relacionada à lentificação da repolarização ventricular (BREWER *et al.*, 1994; CLASSEN *et al.*, 1999). Não está claro, contudo, se os efeitos dos derivados da

artemisinina sobre o ECG resultam de cardiotoxicidade direta ou se são reflexo da toxicidade sobre o SNC (WHITE, 2007). Em um estudo comparando a administração de altas doses de arteméter ou quinina em adultos com malária grave, Hien *et al.* (1996) observaram um prolongamento de QT superior a 25% em 7% dos pacientes que receberam arteméter e 9% daqueles que receberam quinina. Por outro lado, a administração IV do derivado artesunato parece estar isenta de efeitos cardiotóxicos em adultos em tratamento por malária grave (MAUDE *et al.*, 2009).

## **2.5 Nanotecnologia aplicada à malária**

O desenvolvimento da nanotecnologia revolucionou o controle e manipulação de substâncias em nível molecular, permitindo velocidades de dissolução consideravelmente mais rápidas, aumento da biodisponibilidade de muitos fármacos e melhora na estabilidade de agentes sensíveis (SOSNIK e AMIJI, 2010). As nanopartículas são sistemas carreadores de fármacos que têm sido utilizados com sucesso nas Ciências Farmacêuticas, possibilitando a proteção de substâncias da degradação gástrica e aumento de sua biodisponibilidade (ITALIA *et al.*, 2012), aumento da meia-vida e eficácia de fármacos (MADAN *et al.*, 2013), acúmulo em sítios específicos com liberação controlada (WANG *et al.*, 2013) e redução da cardiotoxicidade (LEITE *et al.*, 2007; MACIEL *et al.*, 2010).

As nanocápsulas constituem um tipo específico de nanopartículas, compostas por um núcleo oleoso circundado por uma membrana polimérica biodegradável e estabilizado por tensoativos (LEGRAND *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2006). São utilizadas para a vetorização de fármacos hidrofóbicos, e o uso de diferentes polímeros possibilita prolongar o tempo de circulação plasmática ou aprimorar as propriedades de liberação de tais carreadores (MOSQUEIRA *et al.*, 2001a). As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas pelo método de nanoprecipitação, que consiste na precipitação e formação cineticamente controlada de vesículas de tamanho coloidal constituídas por uma fase oleosa revestida por uma camada polimérica em um ambiente externo aquoso. Após a mistura das fases orgânica e aquosa, o polímero precipita na interface pela redução da sua solubilidade na mistura de solventes, sendo

que a difusão mútua dos solventes fornece uma energia favorável para a formação de nanogotas oleosas, as quais atuam como núcleo para a precipitação do polímero (FESSI *et al.*, 1989).

A nanotecnologia tem sido bastante pesquisada como alternativa no tratamento de doenças infecciosas de alto impacto social, como tuberculose, SIDA e malária (SOSNIK e AMIJI, 2010). Diferentes antiparasitários têm sido veiculados em nanocarreadores com o objetivo de reduzir a toxicidade e melhorar sua distribuição, como é o caso do halofantrino (LEITE *et al.*, 2007). Os autores mostraram que a associação do halofantrino a nanocápsulas de policaprolactona (PCL) foi capaz de reduzir a cardiotoxicidade do fármaco, sem prejuízo de sua atividade antimalárica *in vivo*. Santos-Magalhães e Mosqueira (2010) revisaram os principais requisitos para o desenvolvimento de novos nanocarreadores como alternativa promissora no tratamento da malária. Os estudos mais recentes acerca de nanocarreadores e antimaláricos estão apresentados na tabela 3.

**Tabela 3:** Nanocarreadores como vetores para antimaláricos

Antimalárico	Nanocarreador	Principais resultados	Referência
<b>Arteméter</b>	lipossomas	100% de cura e ausência de recrudescência em camundongos infectados pelo <i>P. chabaudi</i>	(CHIMANUKA <i>et al.</i> , 2002)
<b>Halofantrino</b>	nanocápsulas de PLA	Manutenção ou aumento da eficácia <i>in vivo</i> frente ao <i>P. berghei</i> .	(MOSQUEIRA <i>et al.</i> , 2004)
<b>Halofantrino</b>	nanocápsulas de PCL	Manutenção da eficácia <i>in vivo</i> frente ao <i>P. berghei</i> e diminuição da cardiotoxicidade	(LEITE <i>et al.</i> , 2007)
<b>Arteméter</b>	nanopartículas lipídicas sólidas	Aumento da meia-vida do fármaco, aumento da eficácia antimalárica e redução da mortalidade em relação à formulação IM em animais infectados pelo <i>P. berghei</i>	(JOSHI <i>et al.</i> , 2008)
<b>Quinina</b>	nanocápsulas de PCL	Aumento da eficácia antimalárica <i>in vivo</i> frente ao <i>P. berghei</i>	(HAAS <i>et al.</i> , 2009)
<b>Arteméter</b>	nanopartículas lipídicas sólidas	Aumento da eficácia <i>in vivo</i> frente ao <i>P. berghei</i> e diminuição da toxicidade hepática	(ADITYA <i>et al.</i> , 2010)
<b>Cloroquina</b>	nanopartículas de quitosana	Manutenção da eficácia <i>in vivo</i> frente ao <i>P. berghei</i> e eficácia na prevenção de infecções	(TRIPATHY <i>et al.</i> , 2012)
<b>Clotrimazol</b>	nanoemulsão	Redução da parasitemia e aumento da sobrevida de animais infectados pelo <i>P. berghei</i>	(BORHADE <i>et al.</i> , 2012)
<b>Arteméter-lumefantrino</b>	nanopartículas lipídicas I	100% de cura pela via oral e sem recrudescência em camundongos infectados pelo <i>P. berghei</i>	(PATIL <i>et al.</i> , 2013)

Percebe-se, portanto, que o desenvolvimento de vetores nanométricos contendo derivados da artemisinina para administração segura por via IV é uma prioridade para aplicação no tratamento da malária grave. Neste estudo propõe-se a incorporação do arteméter, fármaco altamente lipofílico, em nanocápsulas poliméricas, visando o aumento de sua estabilidade em meios biológicos e o prolongamento de sua liberação no compartimento sanguíneo, associado à redução da sua cardiotoxicidade e neurotoxicidade *in vivo*. Estes aspectos foram investigados neste trabalho e serão mostrados a seguir, além da investigação do perfil de eficácia destes nanocarreadores contendo arteméter em modelo experimental murino.



### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e a caracterização de nanocápsulas contendo o arteméter, e a avaliação de suas atividades farmacológicas e toxicológicas *in vivo* em modelos experimentais.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Desenvolvimento de nanoestruturas poliméricas (nanocápsulas) contendo o arteméter como substância ativa;
- Caracterização físico-química das nanocápsulas desenvolvidas;
- Avaliação da eficácia antimalárica *in vivo* do arteméter associado às nanocápsulas por diferentes vias de administração e em diferentes esquemas de tratamento;
- Avaliação da cardiotoxicidade *in vivo* do arteméter intravenoso livre ou associado às nanocápsulas, em protocolos de dose única e múltiplas doses;
- Avaliação da neurotoxicidade *in vivo* do arteméter intravenoso livre ou associado às nanocápsulas.

## 4. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE ARTEMÉTER

### 4.1 Introdução

Devido à sua natureza altamente lipofílica, o arteméter é um candidato ideal para a associação a nanocápsulas, visando a melhoria de sua meia-vida plasmática e diminuição da toxicidade a ele associadas. Neste estudo, foram desenvolvidas e caracterizadas nanocápsulas poliméricas de PCL e PLA-PEG, preparadas pela técnica deposição interfacial de um polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989), reconhecida como eficaz na produção de partículas homogêneas e com altas taxas de encapsulação (MORA-HUERTAS *et al.*, 2012).

### 4.2 Metodologia

#### 4.2.1 Preparo das nanocápsulas

Nanocápsulas com superfície modificada pelo polietilenoglicol (PEG), “furtivas, de monometoxi de polioxietileno-co-poli-D,L-lactídeo (PLA-PEG) e convencionais de poli-ε-caprolactona (PCL) sem fármaco e contendo arteméter foram preparadas pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado, como previamente descrito por Fessi *et al.* (1989), com algumas adaptações. Para as nanopartículas brancas de PCL, 6 mg/ml de polímero foram dissolvidos em uma solução de acetona contendo 7,5mg/ml de lecitina (Epikuron® 170) e 25 µl de Miglyol 810, para a obtenção de uma fase orgânica. Essa dissolução ocorreu em chapa elétrica (Corning, EUA), sob agitação e com aquecimento de no máximo 40 °C. Em seguida, a solução orgânica foi vertida em uma solução externa aquosa contendo 7,5 mg/ml de Poloxamer 188 (Synperonic® F68), mantendo a mesma agitação por 10 min, a fim de promover a formação das nanocápsulas. Posteriormente, essa suspensão foi levada ao rotavapor (Heidolph Instruments, Alemanha), mantendo-se a temperatura do banho em torno de 50 °C para evaporação do solvente à pressão reduzida. As nanocápsulas brancas de PLA-PEG foram preparadas utilizando as mesmas proporções de constituintes, à exceção do tensoativo Poloxamer, não utilizado. As formulações de nanocápsulas contendo fármaco foram preparadas adicionando-se arteméter

dissolvido em óleo de amendoim (Artesiane®) em diferentes concentrações (1, 2 e 4 mg/ml) na fase orgânica, em substituição ao Miglyol, seguindo as mesmas condições descritas acima.

#### **4.2.2 Distribuição de tamanho e potencial zêta**

O diâmetro médio, a distribuição de tamanho e o potencial zêta das nanopartículas foram determinados no equipamento Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments). O diâmetro médio (raio hidrodinâmico) e o índice de polidispersão (IP) foram obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS – *Dynamic Light Scattering*). As amostras foram analisadas após a correta diluição em água MilliQ. O potencial zêta foi determinado pela técnica de microeletroforese associada à anemometria do laser doppler (ALD). As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente, diluindo-se as amostras em água MilliQ e utilizando-se um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 90°. As medidas de diâmetro médio e potencial zêta foram realizadas em três formulações distintas e os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.2.3 Determinação do teor de arteméter por cromatografia líquida de alta eficiência**

A porcentagem e a eficiência de encapsulação foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando o método analítico desenvolvido e validado por César e Pianetti (2009) para quantificação do arteméter.

Foi utilizado o módulo de separação Alliance Waters 2695 acoplado ao detector de ultravioleta, no comprimento de onda de 216 nm. Uma coluna C18 Phenomenex®, modelo Gemini 5 $\mu$ , de 150 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5  $\mu$ m e pré-coluna também da marca Phenomenex®, modelo AJ0-4287 C18, de 0,5 cm de comprimento 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5  $\mu$ m foram utilizadas. Como fase móvel, foi utilizada a mistura de acetonitrila e água, na proporção de 70:30 (v/v). A fase móvel foi filtrada em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22  $\mu$ m e, para degaseificar, levada ao banho ultrassônico por trinta minutos. O fluxo foi de

1,0 ml/min e a coluna foi aquecida em forno de coluna a 30°C.

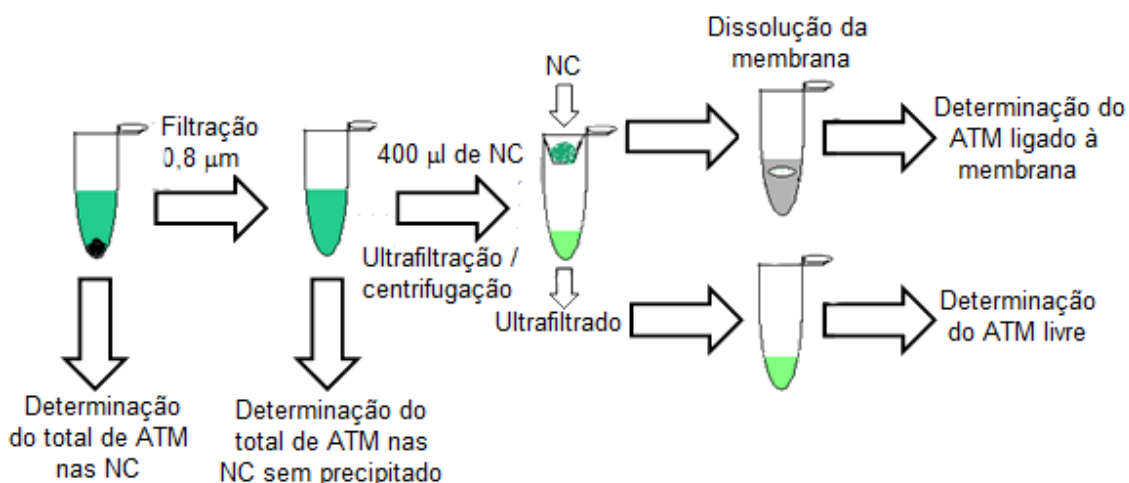
A porcentagem de fármaco encapsulado nas nanoestruturas foi calculada pela diferença entre a quantidade total de arteméter na suspensão coloidal após a retirada do precipitado grosseiro da formulação, por meio da filtração em membrana de 0,8 µm (Millex®-Millipore), e a quantidade de fármaco livre solúvel na fase aquosa externa, dividida pela quantidade total de arteméter na suspensão após a filtração x 100, segundo a equação:

$$\% \text{ encapsulação} = \frac{(\text{fármaco total na suspensão após filtração (mg)} - \text{fármaco no ultrafiltrado (mg)}) \times 100}{\text{fármaco total na suspensão após filtração}}$$

O total (100%) de arteméter presente na suspensão de nanocápsulas foi determinado diluindo-se 400µL da suspensão de nanocarreadores em acetonitrila/etanol (1:1). O arteméter livre solúvel na fase externa aquosa foi obtido pelo método de ultrafiltração/centrifugação de 400µl da suspensão de nanoestruturas a 500 × g por 30 minutos em unidades AMICON (membranas MICROCON de 100.000Da, Millipore®). A quantidade de fármaco ligado à membrana foi determinada após a ultrafiltração/centrifugação. Para isso, a membrana do AMICON foi retirada, lavada com água MiliQ, imersa em 500µl de etanol/acetonitrila (1:1), levada ao vórtex por 15 minutos, centrifugada e o arteméter dosado no sobrenadante (figura 5).

A eficiência de encapsulação das nanoestruturas foi calculada pela quantidade de arteméter encapsulado em 400µl de formulação dividida pela quantidade do fármaco adicionado a 400µl de formulação x 100. Foi utilizada, portanto, a seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de Encapsulação} = \frac{\text{quantidade total de fármaco encapsulado (mg)} \times 100}{\text{quantidade de fármaco colocado na formulação}}$$



**Figura 5:** Método de ultrafiltração / centrifugação. **Fonte:** Paula *et al.*, 2013, adaptado.

#### 4.2.4 Análise morfológica das nanocápsulas

A microscopia de força atômica (MFA) foi realizada utilizando os equipamentos Multimode e Dimension 300, ambos monitorados por controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, EUA), do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC, MG). As imagens foram obtidas no modo de contato intermitente (*tapping mode*), utilizando sondas de silício de comprimento de 228 μm, com uma frequência de ressonância de 75-98 kHz, força constante de 29-61 N/m e raio de curvatura de 5 nm a 10 nm. As imagens foram obtidas depositando-se aproximadamente 5 μL das amostras em placas de mica clivadas no momento do uso. Após a deposição das amostras na superfície da mica, essas foram secas utilizando jato de argônio. A varredura foi efetuada em uma velocidade de 1 Hz com resolução de 512 x 512 pixels. A análise das amostras para determinação do tamanho e da relação diâmetro/altura foi realizada utilizando o programa de análise do sistema (*Section Analysis*). Pelo menos 40 partículas de cada amostra foram analisadas para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

#### 4.3 Resultados e Discussão

As nanocápsulas foram os vetores de escolha para a encapsulação do arteméter por serem estas os nanocarreadores mais adequados para a administração

IV de substâncias altamente lipofílicas, como o fármaco em questão. Ainda, as nanocápsulas possibilitam altas taxas de encapsulação da substância ativa e possuem alta compatibilidade biológica (REIS *et al.*, 2006; LEGRAND *et al.*, 1999). Além disso, os polímeros normalmente utilizados possuem baixa toxicidade e biodegradabilidade, características essenciais para a administração parenteral de fármacos (MOSQUEIRA *et al.*, 2001a).

Na tabela 4 são apresentados os diâmetros médios, os índices de polidispersão e potencial zêta das formulações de nanocápsulas preparadas. Nas figuras 6 e 7 são representados, respectivamente, registros gráficos da análise da dispersão de tamanho e do potencial zêta das formulações de nanocápsulas obtidas com o polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL).

**Tabela 4:** Características físico-químicas das nanocápsulas de poly- $\epsilon$ -caprolactona (PCL)

Formulação	Concentração teórica de ATM (mg/ml)	Diâmetro hidrodinâmico (nm) <sup>α</sup>	Índice de polidispersão	Potencial zêta (mV)
PCL	0	197,3±0,81	0,14±0,02	-56,2±1,70
PCL-ATM	2	232,1±2,7	0,20±0,02	-49,3±1,62
PCL-ATM	4	243,2±4,7	0,28±0,05	-41,9±8,31

Resultados expressos em média  $\pm$  EPM de 3 preparações. <sup>α</sup>obtido por DLS. Equipamento Nanosizer ZS (UFOP).

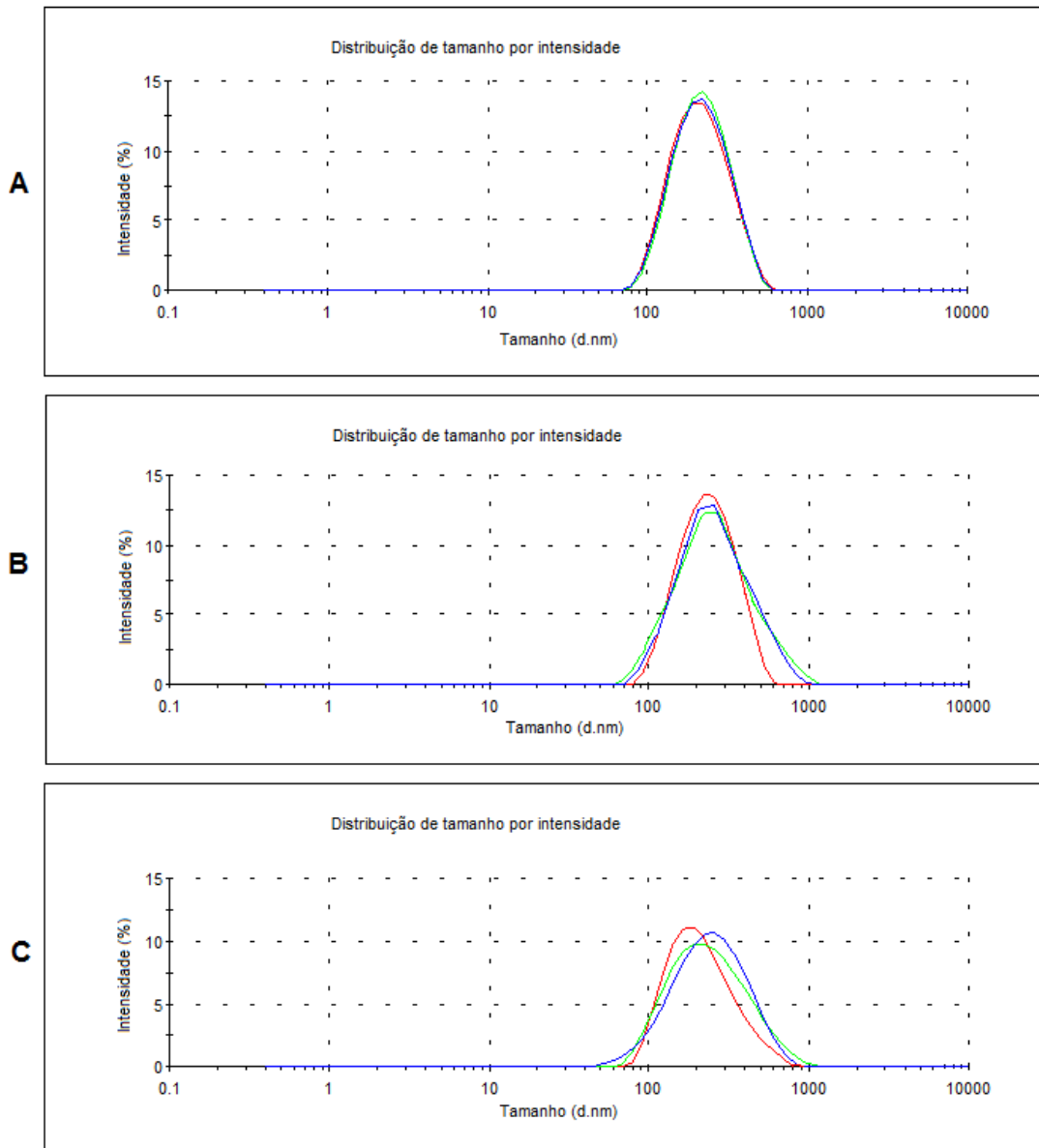
**Tabela 5:** Características físico-químicas das nanocápsulas de PLA-PEG

Formulação	Concentração teórica de ATM (mg/ml)	Diâmetro hidrodinâmico (nm) <sup>α</sup>	Índice de polidispersão	Potencial zêta (mV)
PLA-PEG	0	222,7±3,43	0,17±0,05	-54,4±3,50
PLA-PEG-ATM	1	296,6±1,46	0,22±0,05	-61,2±1,21
PLA-PEG-ATM	2	343,5±4,72	0,58±0,08	-63,8±4,10

Resultados expressos em média  $\pm$  EPM de 3 preparações. <sup>α</sup> Obtido por DLS no equipamento ZETASIZER HS3000 (UFMG).

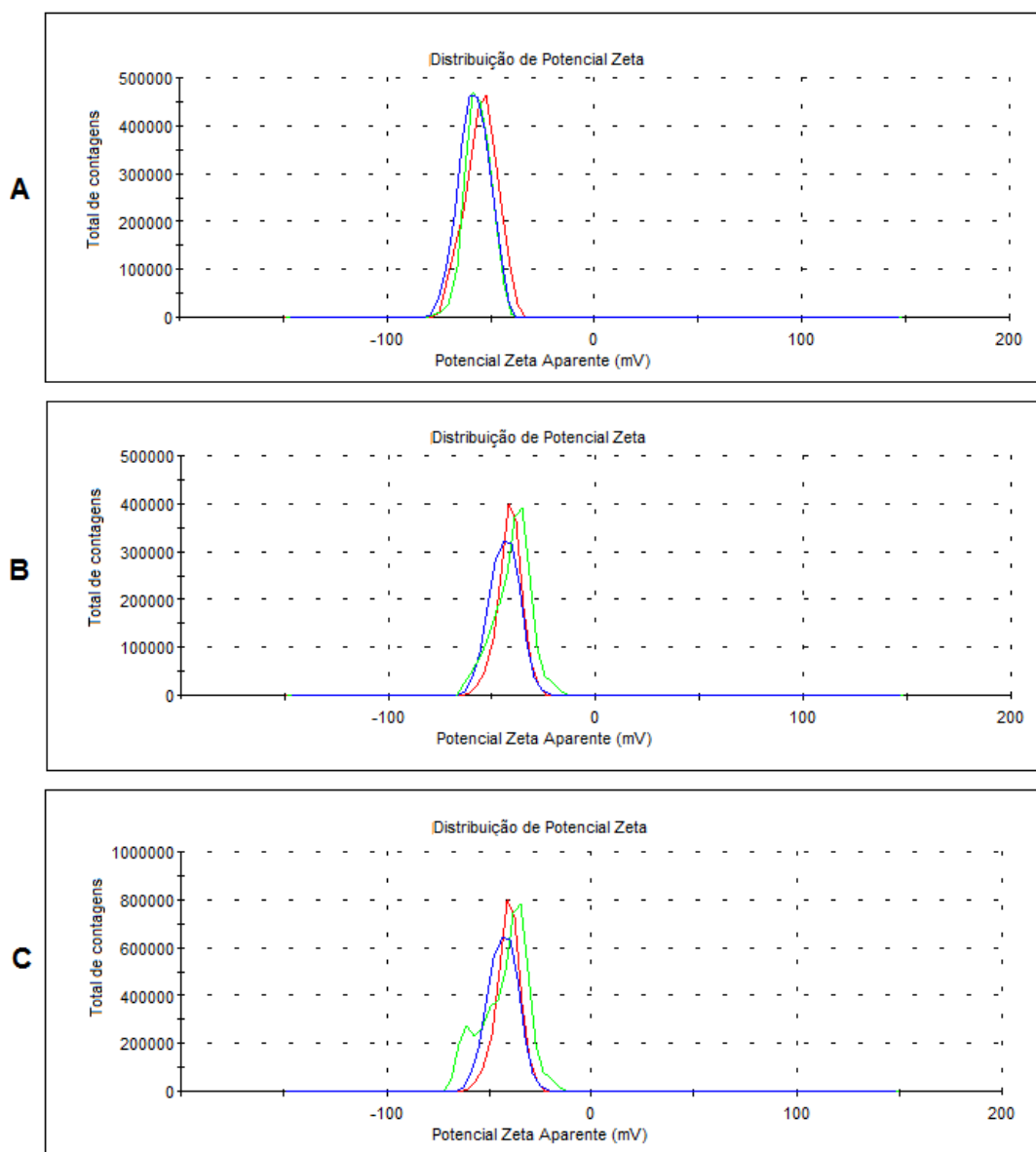
Em revisão feita por Rao e Geckeler (2011), o método de nanoprecipitação, utilizado neste estudo, foi apontado como ideal para produzir partículas pequenas e homogêneas, adequadas à administração parenteral. O tamanho das partículas é um parâmetro que pode ser influenciado pela utilização de surfactantes, pela natureza do núcleo oleoso, pelos cuidados na técnica de preparação dos vetores, como a correta homogeneização das preparações (MORA-HUERTAS *et al.*, 2012). O IP indica a homogeneidade na distribuição de tamanho das partículas em suspensão e valores superiores a 0,3 mostram heterogeneidade do diâmetro, enquanto variações nos valores de polidispersão em função do tempo são indicio de agregação ou degradação de partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A partir dos resultados apresentados, foi possível observar que as nanopartículas de PCL mostraram-se mais homogêneas em relação ao tamanho, além de veicularem maior quantidade de substância ativa, o que acarreta menor volume de administração pela via IV, característica altamente desejável para tal via. Para ambas as formulações, o tamanho médio sofreu aumento gradual e significativo ( $p < 0.005$ ) com a adição de arteméter, um dos indicativos da incorporação do fármaco no núcleo oleoso das nanocápsulas (tabelas 4 e 5).

A figura 6 mostra que, à medida que se aumentou a concentração do arteméter nas nanocápsulas de PCL, houve um alargamento do pico referente a distribuição de tamanhos determinada por PCS, indicando que a polidispersão de tamanho aumentou, entretanto, sem comprometimento significativo da qualidade das amostras que se mantiveram todas com tamanho inferior a 1 micrômetro, conforme o gráfico, adequadas à administração IV ( $< 5\mu\text{m}$ ). A ausência de picos próximo a 1000nm e inferiores a 50nm indicam ausência de agregados grosseiros e de micelas, respectivamente, em todas as amostras.



**Figura 6:** Registro gráfico da dispersão de tamanho das formulações de nanocápsulas constituídas de PCL. Obtidas em Zetasizer Nano ZS. A: nanocápsulas brancas; B: nanocápsulas contendo arteméter 2 mg/ml; C: nanocápsulas contendo arteméter 4 mg/ml.





**Figura 7:** Registro gráfico do potencial zêta medido no Zetasizer Nano ZS das formulações de nanocápsulas constituídas de PCL. A: nanocápsulas brancas; B: nanocápsulas contendo arteméter 2 mg/ml; C: nanocápsulas contendo arteméter 4 mg/ml.

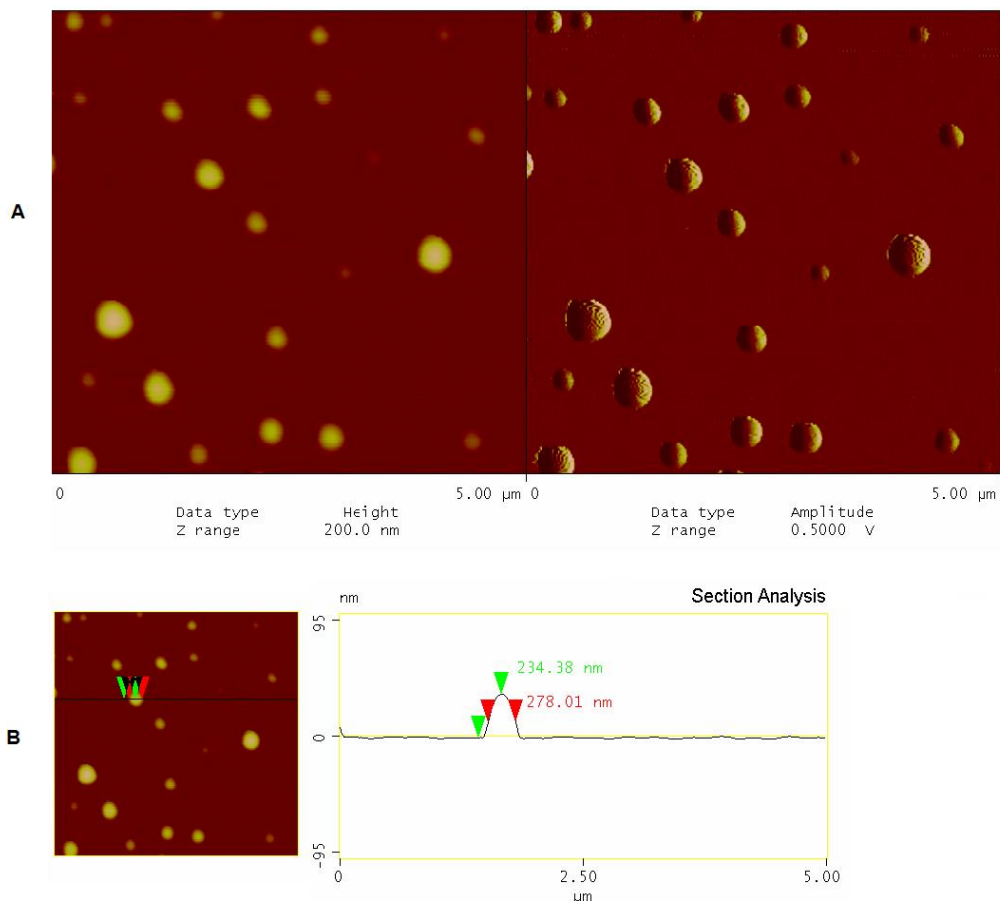
O potencial zêta é uma medida que reflete a carga superficial das partículas e é utilizado para se comparar os efeitos de diversos fatores sobre a superfície dos coloides entre diferentes formulações, sendo sobretudo uma medida comparativa e não absoluta, uma vez que exige padrões de calibração. Os registros gráficos do potencial zêta para as preparações de nanocápsulas de PCL estão representados na figura 7. Foram obtidos valores negativos para as formulações de nanocápsulas

brancas e contendo arteméter, variando de -56,2 a -41,9 mV para as formulações de PCL (tabela 4) e de -54,4 a -63,8 mV para as formulações de PLA-PEG (tabela 5). Em ambos os casos, o potencial zêta foi influenciado pela associação de arteméter, indicando que uma parte do fármaco poderia estar localizada na superfície da nanocápsula sem, contudo, impactar a estabilidade coloidal, pois os valores continuam muito negativos e elevados em módulo.

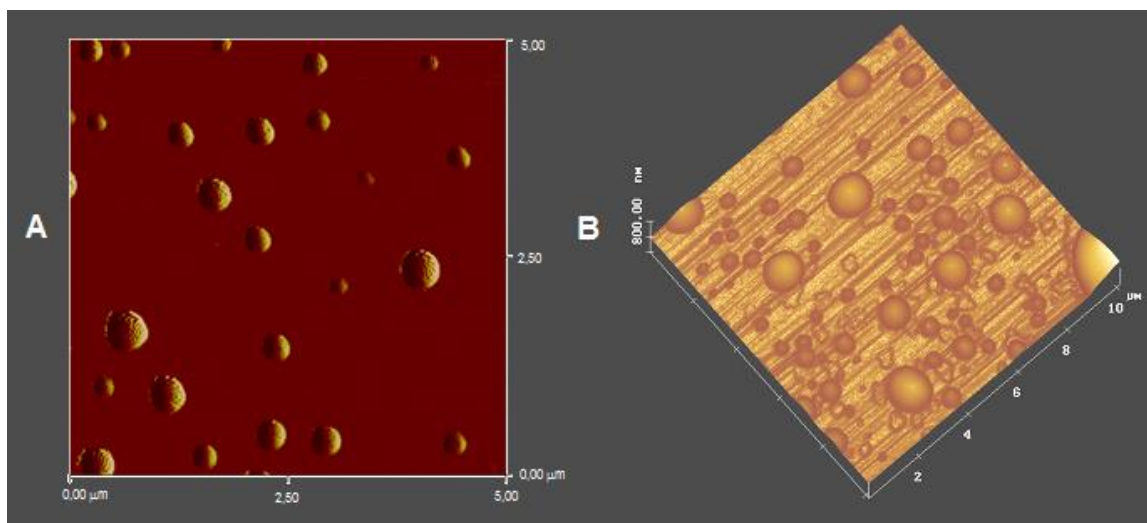
A análise dos dados da figura 7 indica que, à medida que se aumentou a concentração do arteméter nas nanocápsulas de PCL, houve uma redução em módulo dos valores de zêta e também o aparecimento de novas populações de nanopartículas com valores diferentes (figura 7 C). Valores altos de potencial zêta contribuem para a estabilidade elétrica do sistema coloidal, por ser a repulsão gerada pelas cargas um fator que minimiza a agregação das vesículas (LOURENCO *et al.*, 1996). Dentre os componentes das formulações, os fosfolípidos e os polímeros constituintes das nanopartículas são capazes de influenciar muito o potencial zêta por seus grupos polares fortemente ionizáveis (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O tensoativo anfótero lecitina e os poliésteres, como o PLA e o PCL, tipicamente conferem uma carga superficial negativa às partículas (LEGRAND *et al.*, 1999). O polímero PCL, por ser mais hidrofóbico, gera partículas menos ionizáveis, e, portanto, com carga superficial menos negativa (MOSQUEIRA *et al.*, 2000) enquanto a cadeia de PEG não exerce influência significativa no potencial zêta em presença de lecitina na formulação das nanocápsulas, quando se apresenta com baixa densidade de cadeias de PEG na superfície (MOSQUEIRA *et al.*, 2001). De fato, observa-se na tabela 5 que o potencial zêta das nanocápsulas de PLA-PEG é mais elevado em módulo que as de PCL, muito provavelmente devido à cobertura insuficiente da superfície hidrofóbica constituída de PLA, ou seja, baixa densidade de cadeias de PEG, e também à ausência, nesta formulação, do agente tensoativo não-iônico poloxamer-188 que recobre a superfície das nanocápsulas de PCL reduzindo o valor do potencial zêta.

A MFA permitiu observar a morfologia das nanocápsulas e avaliar as propriedades físicas das partículas, tais como estabilidade da partícula após aplicação de uma determinada “força” (set point = 0) e flexibilidade do filme polimérico. Esta

característica confere às partículas a capacidade de se deformar para atravessar espaços intercelulares *in vivo*. A avaliação da morfologia da suspensão de nanocápsulas de PCL permitiu concluir que esta apareceu como uma população de partículas monodispersas em relação ao tamanho. Os diâmetros médios extraídos a partir da análise de MFA foram maiores do que os obtidos por DLS ( $298,2 \pm 14,4$ ) e a relação diâmetro/altura foi igual a 3,5, evidenciando a deformação das nanoestruturas quando depositadas sobre a superfície de mica e confirmando a presença de um núcleo oleoso envolvido por uma membrana polimérica, constituindo sistemas de liberação do tipo reservatório (figura 8). As nanopartículas de PLA-PEG se mostraram visivelmente mais polidispersas em relação ao tamanho que as nanopartículas de PCL (figura 9).



**Figura 8:** (A) Imagens de MFA de altura (esquerda) e fase (direita) da nanocápsulas de PCL. Escala: 5μm x 5μm. (B) Perfil topográfico das nanoestruturas, determinado pelo software "Section Analysis", mostrando medidas de diâmetro e altura.



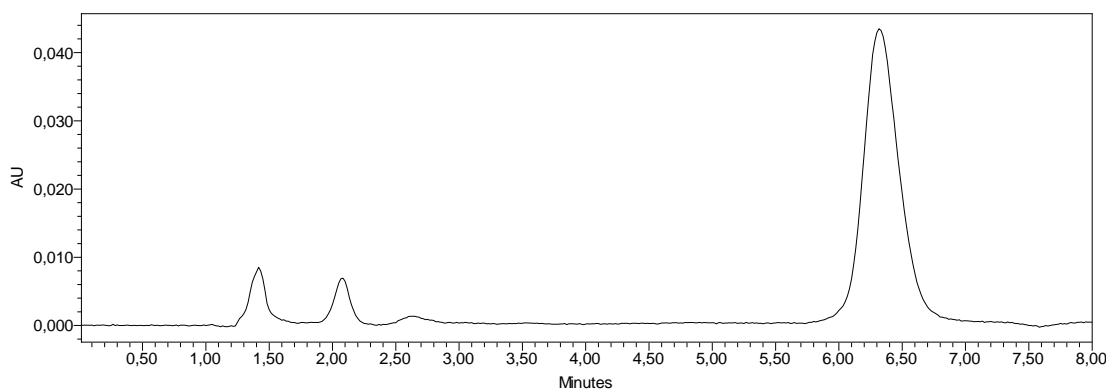
**Figura 9:** Imagens obtidas por MFA. (A) imagem de altura de nanocápsulas de PCL contendo arteméter (escala 5 µm x 5 µm). (B) imagem tridimensional de nanocápsulas de PLA-PEG contendo arteméter (escala 10 µm x 10 µm)

Diante dos resultados de tamanho e IP obtidos, formulação de PCL foi selecionada para a realização dos ensaios de doseamento. Além disso, nas nanocápsulas de PCL foi possível veicular maior quantidade de arteméter, o que acarreta menor volume de administração IV.

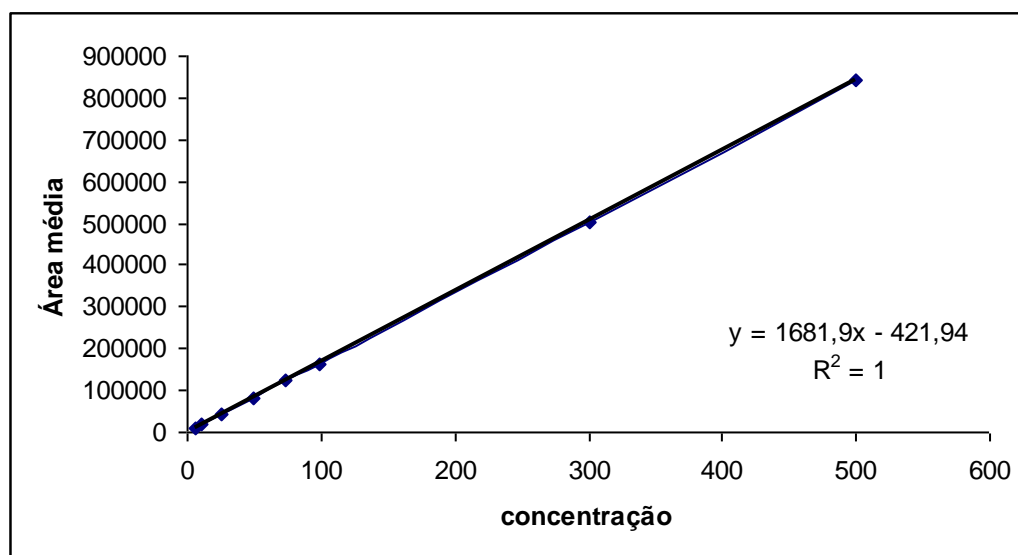
A quantificação do arteméter nas preparações de nanocápsulas foi realizada por CLAE, segundo metodologia descrita por César e Pianetti (2009). Foi utilizado tempo de corrida de 8 minutos, sendo verificada a retenção do arteméter em aproximadamente 6,5 minutos (figura 10), em concordância com os dados previamente validados (CÉSAR e PIANETTI, 2009). Foi construída uma curva de calibração a partir de diferentes concentrações (figura 11), com coeficiente de correlação ( $R^2=1$ ), o que demonstra que 100% dos dados estão inseridos na curva. Esses resultados permitiram utilizar a curva nos ensaios de determinação do teor de arteméter encapsulado.

No tempo de retenção de 1,0 a 2,5 minutos, foram detectados pequenos picos que podem se referir a produtos de degradação por uma eventual abertura do anel

endoperóxido do arteméter (figura 3), o que geraria compostos mais hidrofílicos e com menor tempo de retenção nas condições cromatográficas utilizadas. No entanto, o teor destes eventuais produtos não afetou significativamente as concentrações na amostra e nas curvas de calibração. Estudos posteriores a serem realizados utilizando o detector de arranjo de diodos (PDA) poderão esclarecer a natureza química destes picos.



**Figura 10:** Cromatograma na região do UV, mostrando o pico de arteméter em 6,5 minutos. Fase móvel: acetonitrila:água (70:30); Comprimento de onda: 216nm



**Figura 11:** Curva de Calibração do arteméter em acetonitrila: água (70:30) em comprimento de onda 216 nm;  $R^2$  = coeficiente de correlação.

A técnica utilizada para determinar o teor de encapsulação foi a CLAE, utilizando-se a ultrafiltração/centrifugação para separação das nanocápsulas da fase aquosa externa, que indicou uma taxa de associação do arteméter às nanocápsulas superior a 90% (tabela 6). De acordo com Mora-Huertas *et al.* (2012), características como natureza do fármaco, tipo e particularidades do polímero utilizado, tipo de óleo, pH do meio e tensoativo adotado podem influenciar a taxa de encapsulação do fármaco em carreadores nanométricos.

**Tabela 6:** Eficiência de encapsulação e rendimento de encapsulação de formulações de nanocápsulas de arteméter

Concentração	% encapsulação <sup>a#</sup>	Eficiência de encapsulação <sup>2*</sup>	% precipitado
2mg/ml	98,52 ± 0,03	91,81 ± 0,6	1,48
4mg/ml	93,91 ± 0,05	80,03 ± 0,7	5,15

Formulações de nanocápsulas constituídas por PCL (poly-ε-caprolactona). Resultados expressos em média ± EPM. <sup>a</sup> n = 3; \* refere-se ao total de fármaco adicionado à preparação (perdas no processo) # refere-se à formulação pronta.

Os resultados da tabela 6 mostram que o processo de encapsulamento do arteméter é efetivo nas concentrações de fármaco entre 2-4 mg/ml. A partir de 4 mg/ml, há uma supersaturação do sistema nanocarreador e começa a ocorrer precipitação significativa do arteméter na fase externa aquosa da suspensão coloidal, com conseqüente redução da eficiência do processo. Entretanto, na suspensão final observa-se uma grande porcentagem de associação do arteméter às nanocápsulas desenvolvidas, obtendo-se altos teores de encapsulação (93-98%).

As nanocápsulas de PCL, pela sua estabilidade, capacidade de encapsulação e carregamento do fármaco (*payload*) e baixo custo, foram selecionadas para a continuidade dos estudos de eficácia antimalárica e avaliação de cardio e neurotoxicidade, apresentados nos capítulos subsequentes. Ainda, tal polímero é encontrado em vários sistemas carreadores e implantes com uso aprovado pela agência reguladora norte-americana, *Food and Drug Administration* (FDA) (DASH e KONKIMALLA, 2012), possui alta biodegradabilidade e baixo custo e recentemente,

nanopartículas de PCL foram avaliadas quanto à toxicidade aguda e crônica, tendo sido demonstrada sua inocuidade *in vivo*. (BULCÃO *et al.*, 2013). Todos os fatores apresentados fazem do PCL o veículo ideal para a terapia IV da malária, proposta neste estudo.

## 5. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMALÁRICA DO ARTEMÉTER

### 5.1 Introdução

As nanocápsulas de PCL, por apresentarem parâmetros físico-químicos mais adequados em relação ao PLA-PEG, além de preencherem requisitos importantes para a terapia da malária, como previamente relatado, foram selecionadas para os estudos *in vivo*. Nesta seção são descritos os protocolos *in vivo* realizados para confirmação da eficácia antimalárica dos nanocarreadores desenvolvidos frente à malária causada por *P. berghei*.

### 5.2 Metodologia

*Os protocolos de métodos in vivo propostos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFOP, sob número 03/2011.*

Camundongos Swiss fêmeas, provenientes do Centro de Criação animal da UFOP com aproximadamente 30 dias e peso médio de 18+3g foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes grupos experimentais (n=6). Os animais foram infectados por via IV com  $10^6$  hemácias parasitadas pelo *Plasmodium berghei* NK 65, provenientes de camundongos doadores anteriormente infectados (com parasitemia aproximada de 20%) com esta cepa que é sensível à cloroquina. As hemácias parasitadas foram diluídas em solução salina 0,9% p/v para obtenção de um inóculo com volume constante de 200  $\mu$ l.

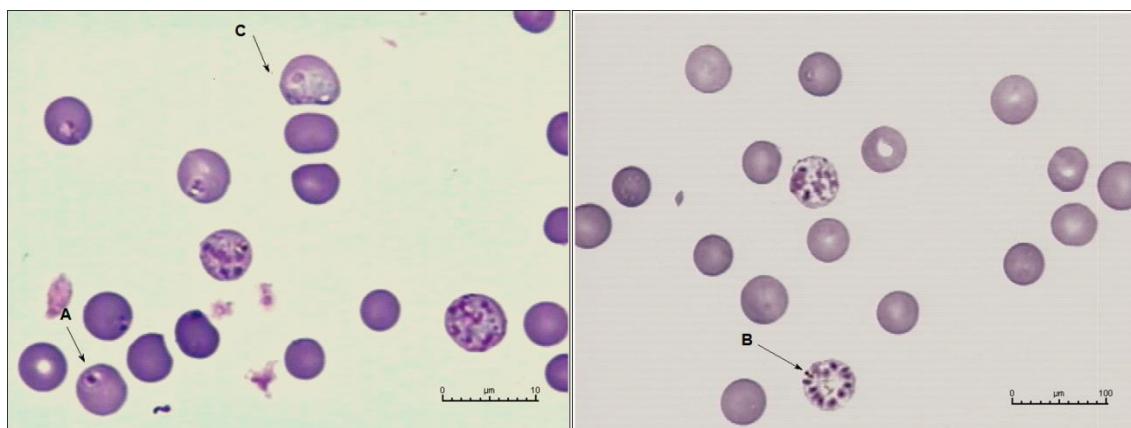
A eficácia antimalárica foi avaliada por dois protocolos. Primeiramente, foi adotado o protocolo experimental de quatro dias descrito por Peters *et al.* (1986), conhecido como "*four-day-test*". Duas horas após a infecção por via IV por inoculação de  $10^6$  hemácias parasitadas, o tratamento foi iniciado com a administração do arteméter nas formas livre ou vetorizado em nanocápsulas e repetido por mais três dias consecutivos contados a partir da indução da infecção (D0). Foram utilizadas as doses de 40 e 80 mg/kg de fármaco, administrado pelas vias IV, intraperitoneal (IP) e IM para as formulações de PCL. O fármaco livre foi solubilizado em uma solução de Tween 80®/PEG 300/etanol/glicose 5 % (p/v) (2:10:4:96). Todos os diluentes foram



utilizados em concentrações adequadas à administração parenteral (LI e ZHAO, 2007). Foram utilizados como controle grupos de animais não tratados, os quais receberam o veículo IV ou formulação de nanocápsulas brancas.

Após a avaliação dos resultados obtidos, com o intuito de se verificar o potencial da nova formulação sobre uma infecção já bem estabelecida (parasitemia média de 12%), foi utilizado um protocolo de administração de dose única da formulação de PCL, pela via IV, na dose de 20 mg/kg e pela via oral (VO) na dose de 40 mg/kg.

A parasitemia foi monitorada em ambos os protocolos através de esfregaços sanguíneos dos animais, confeccionados após retirada de amostra de sangue fresco coletado de uma incisão na extremidade caudal, nos dias 3, 5, 7, 9, 14, 25 e 60 após a infecção. A porcentagem de parasitemia (% de hemácias infectadas) foi determinada microscopicamente em aumento de 1000x pelo exame de pelo menos 3000 células das lâminas fixadas em metanol e coradas pelo Giemsa. As imagens dos campos foram obtidas em microscópio óptico acoplado a câmera (Opton, Brasil) e salvas em computador, para posterior contagem (figura 12).



**Figura 12:** Esfregaços sanguíneos de camundongos infectados pelo *P. berghei*. As setas mostram hemácias infectadas com o parasita em diferentes estágios de amadurecimento intraeritrocitário, que coexistem no sangue devido à assincronicidade desta cepa. Trofozoito jovem (A) e esquizonte maduro (B), que são as formas assexuadas do parasita, e gametócitos (C), a forma sexuada sanguínea do parasita.

Os dados foram analisados utilizando-se a área sob a curva (ASC) do percentual

de parasitemia versus tempo. Em alguns gráficos, foi feita também análise ponto a ponto, comparando os diferentes tratamentos nos dias de confecção do esfregaço (One-way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey). Foi utilizado o software GraphPadPrism® 5.0 (GraphPad Software, EUA) como ferramenta para as análises estatísticas. Os dados foram expressos como média + erro padrão da média (EPM), com intervalo de confiança de 95% e as diferenças consideradas significativas quando o valor de  $P$  foi menor ou igual a 0,05 ( $P < 0,05$ ).

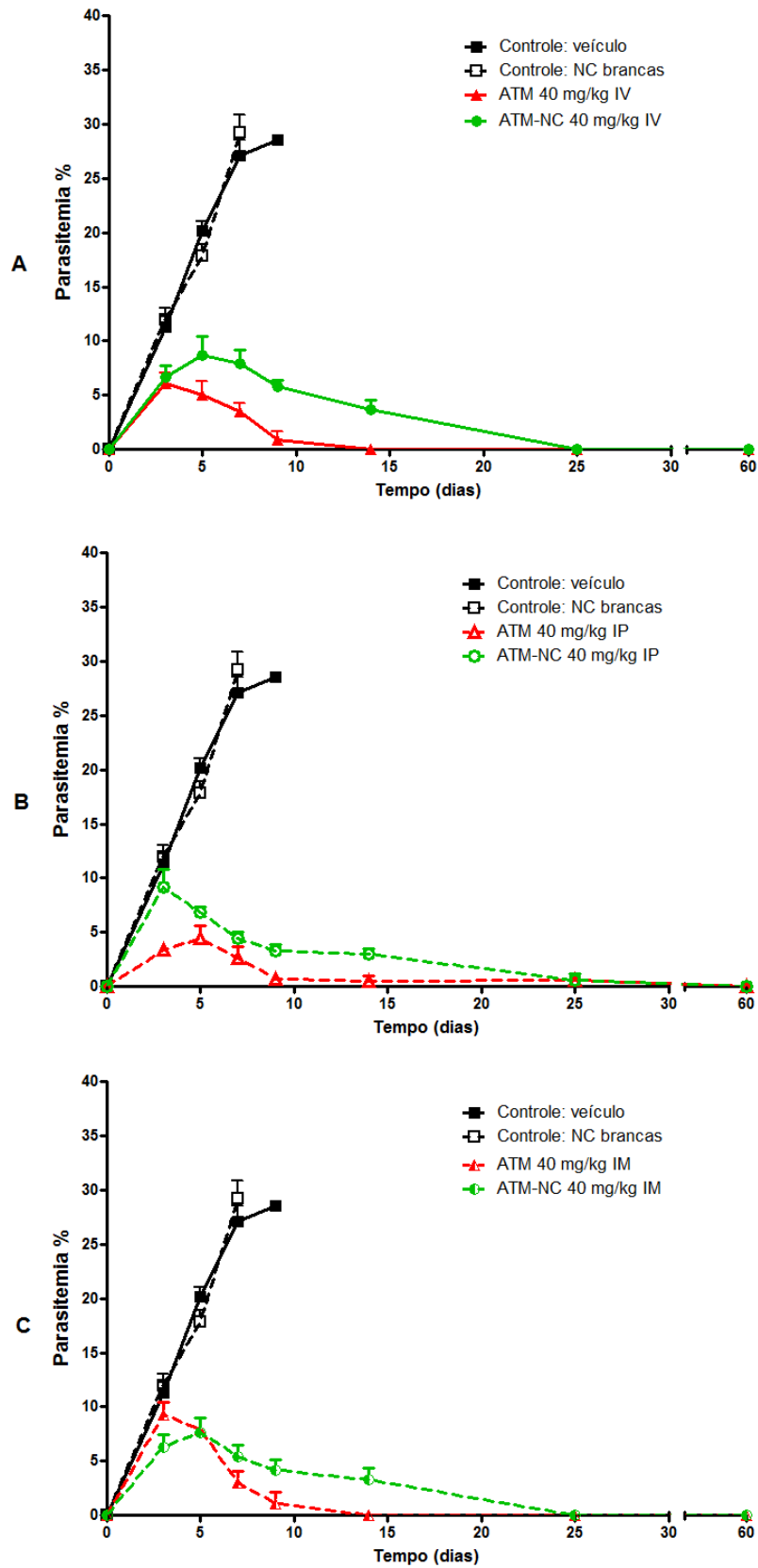
### 5.3 Resultados e Discussão

A eficácia das formulações de nanocápsulas de PCL contendo arteméter foi comprovada através do *four-day test*. Para os animais que receberam arteméter na forma livre e em nanocápsulas, foi observada remissão da parasitemia para todas as doses e vias avaliadas, desde o início do tratamento, quando comparado aos grupos controle, e ausência de recrudescência após o tratamento quando observados por um período de 60 dias, confirmando a eficácia do arteméter livre e também das formulações de nanocápsulas onde o arteméter foi encapsulado (figuras 13 e 14).

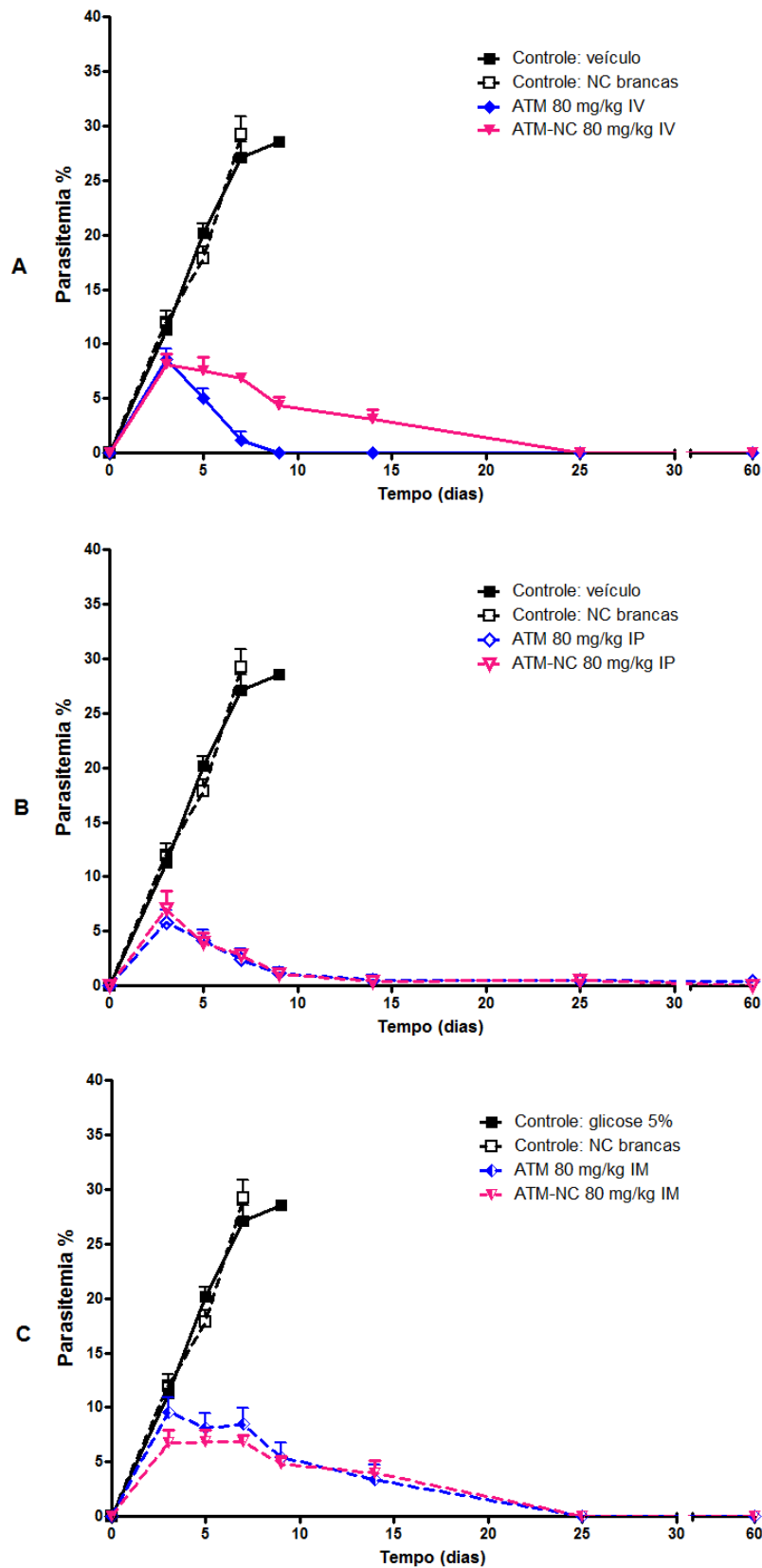
Nos animais que receberam nanocápsulas de PCL veiculando arteméter, foi observado um efeito de retardo na diminuição da parasitemia, para todas as doses e vias utilizadas (IV, IP, IM) em relação à administração do fármaco livre. Para a dose de 40 mg/kg, a supressão completa da parasitemia pelas nanocápsulas foi obtida em tempo superior à forma livre (figura 13). Já para a dose de 80 mg/kg, a curva de parasitemia para as vias IM e IP veiculando nanocápsulas foi semelhante à observada pela administração na forma livre (figura 14). Embora sejam necessários mais estudos, os resultados sugerem uma liberação mais lenta do fármaco associado às nanoestruturas após a administração, demonstrando uma alteração no perfil de liberação ou de distribuição do fármaco na circulação diferente da forma livre e, possivelmente, reduzindo a fração do fármaco disponível para exercer o efeito antimalárico no sangue num primeiro momento.

Em ambos os casos, livre ou em nanocápsulas, o arteméter induziu a cura de

todos os animais, mas observa-se uma diferença no perfil das curvas de parasitemia entre as vias de administração. É interessante notar que esta diferença no efeito é mais nítida pela via IV (40 e 80 mg/kg), observando-se um efeito de retardado das nanocápsulas sobre a redução da parasitemia, o que indica que efetivamente que as nanocápsulas, quando administradas na mesma dose, reduzem a liberação do arteméter *in vivo*, particularmente no sangue.



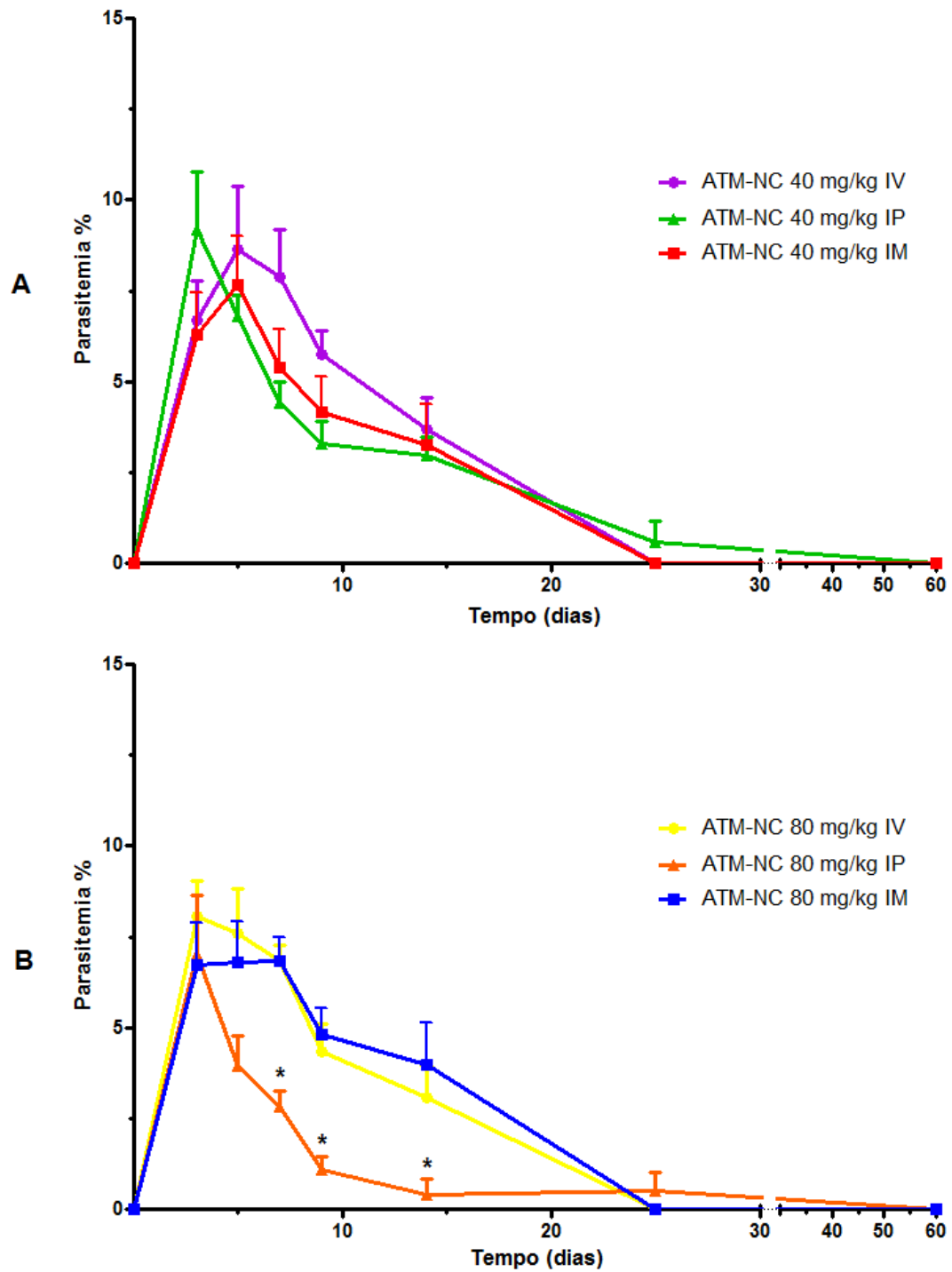
**Figura 13:** Curvas de parasitemia média de camundongos Swiss infectados pelo *P. berghei* tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL, pelas vias IV (A), IP (B) e IM (C), na dose de 40 mg/kg, utilizando o protocolo *four day-test* (n = 6).



**Figura 14:** Curvas de parasitemia média de camundongos Swiss infectados pelo *P. berghei* tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL, pelas vias IV (A), IP (B) e IM (C), na dose de 80 mg/kg, utilizando o protocolo *four day-test* (n = 6).

Na comparação do efeito das nanocápsulas entre vias de administração, observa-se um efeito mais rápido das nanocápsulas pela via IP em relação às vias IV e IM, particularmente na dose de 80 mg/kg, com diferenças significativas entre os dias 7 e 14 após o tratamento. Este efeito é interessante se for observado que, fisiologicamente, as nanocápsulas parecem ser capazes de liberar rapidamente o arteméter para o sangue a partir da via IP, com efeito mais rápido. Uma hipótese que não pode ser descartada, devido à natureza hidrofóbica das nanocápsulas de PCL, seria a rápida fagocitose das nanocápsulas por células do SFM (MOSQUEIRA *et al.*, 2001), após administração IV, com posterior liberação do conteúdo de fármaco na circulação, gerando retardo no efeito antimalárico. Segundo esta hipótese, ocorreria uma fagocitose mais efetiva das nanocápsulas no sangue e no tecido intramuscular do que no peritônio (figura 15). Após metabolização o arteméter é convertido em um metabólito também ativo que é a diidroartemisinina.

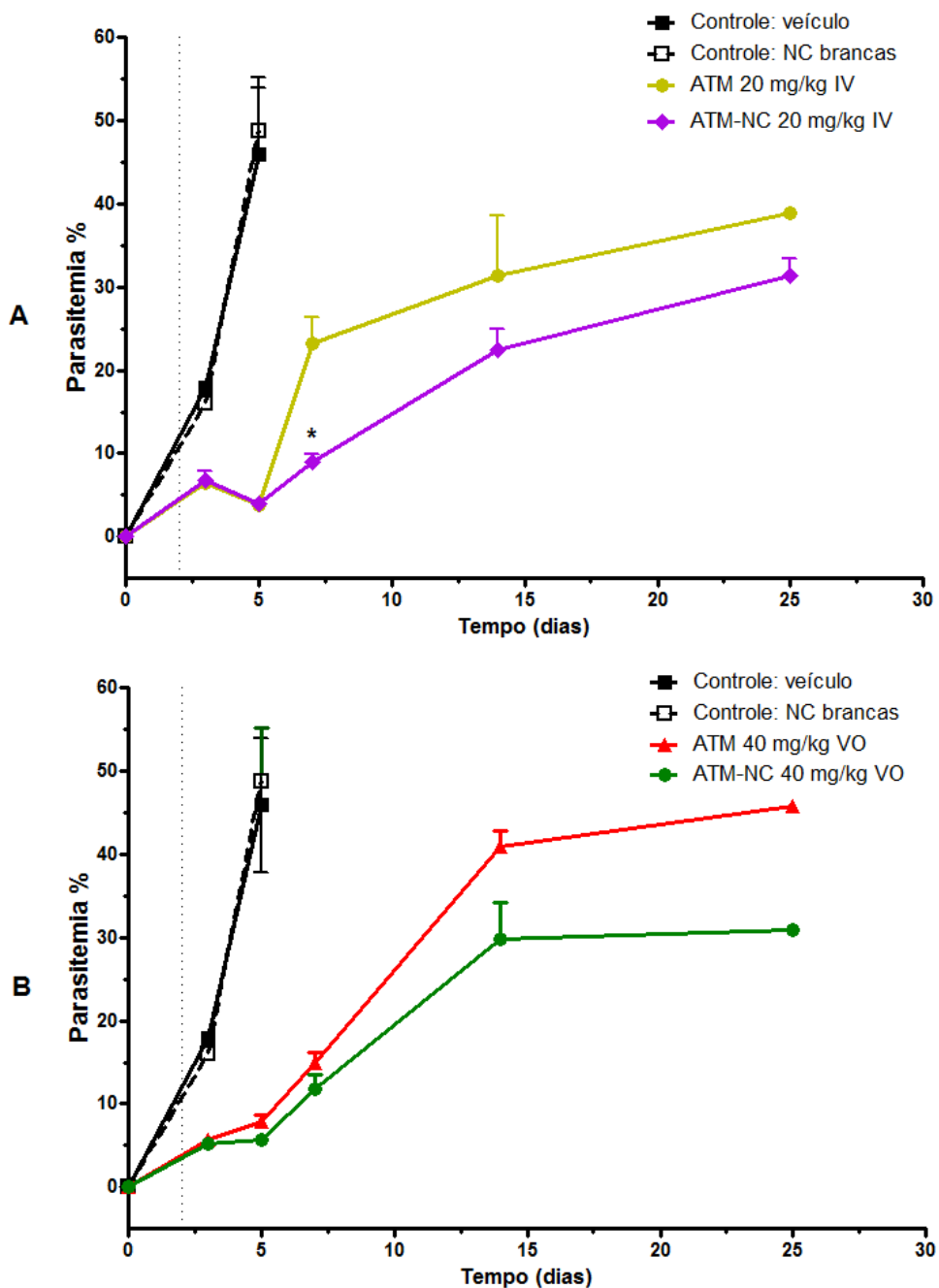
Tal prolongamento da liberação no sangue, observado através do seu efeito antimalárico retardado, pode ser terapêuticamente útil para reduzir o número de administrações de arteméter, que possui meia-vida plasmática curta, associando-se o fármaco livre e as nanocápsulas na mesma administração, para manter a ação por maior tempo. Esta estratégia poderia ser utilizada e contribuir para a maior eficácia do tratamento parenteral, com maior duração do efeito e, conseqüentemente, maior adesão dos pacientes (GERSTL *et al.*, 2010). Além disso, para as formas severas da doença, é desejável que o fármaco permaneça por maior tempo na circulação, de maneira a garantir a completa supressão do parasita e minimizar o aparecimento de recrudescência, conforme observado clinicamente em crianças tratadas com arteméter pela via intramuscular (OLUMESE *et al.*, 1999). Associado a isso, a aparente modificação da distribuição do arteméter no organismo após administração IV reduz a fração livre disponível, o que pode eventualmente reduzir os riscos de efeitos cardio e neurotóxicos já reportados para este fármaco em altas concentrações plasmáticas (MEDHI *et al.*, 2009).



**Figura 15:** Curvas de parasitemia média de camundongos Swiss infectados pelo *P. berghei* tratados com arteméter em nanocápsulas de PCL, nas doses de 40 (A) e 80 mg/kg, por diferentes vias, utilizando o protocolo *four day-test* (n = 6) P < 0,05 – ANOVA.

Como o *four day-test* apresenta algumas limitações, como baixa parasitemia dos animais devido ao tratamento precoce, foram feitos estudos por um protocolo de dose única, após infecção bem estabelecida. Neste protocolo, as nanopartículas de PCL exibiram excelente atividade antimalárica administradas em doses únicas de 20 e 40 mg/kg de arteméter, pela via IV e VO, respectivamente (figura 16). Este protocolo evidencia o efeito da formulação na redução da uma parasitemia já bem estabelecida e debilitante para o animal, de forma similar ao tratamento em humanos. Após a administração IV (figura 16 A), a parasitemia média foi significativamente menor em D7 para os grupos que receberam nanocápsulas, mostrando a eficiência da formulação no efeito antimalárico nos animais. Neste ponto, pode-se sugerir que houve metabolização e eliminação do fármaco livre, enquanto as nanocápsulas propiciaram sua manutenção no organismo. Para a via oral também foi observada diminuição da parasitemia em relação aos grupos controle, o que sugere a proteção da molécula do arteméter contra a degradação ácida, mediada pelas nanocápsulas (figura 16 B). Entretanto, tal efeito também foi observado para os animais que receberam arteméter solubilizado na solução de Tween 80<sup>®</sup>/PEG 300/etanol/glicose (veículo intravenoso), indicando que o veículo utilizado também modificou a absorção do fármaco ativo. De fato, podem ter sido originadas micelas com tal veículo que facilitaram a absorção do arteméter. Estudos pela via oral envolvendo a administração do arteméter na forma de suspensão devem ser realizados posteriormente para evidenciar as diferenças de efeito dos veículos na dissolução intestinal e na proteção contra a degradação do arteméter.

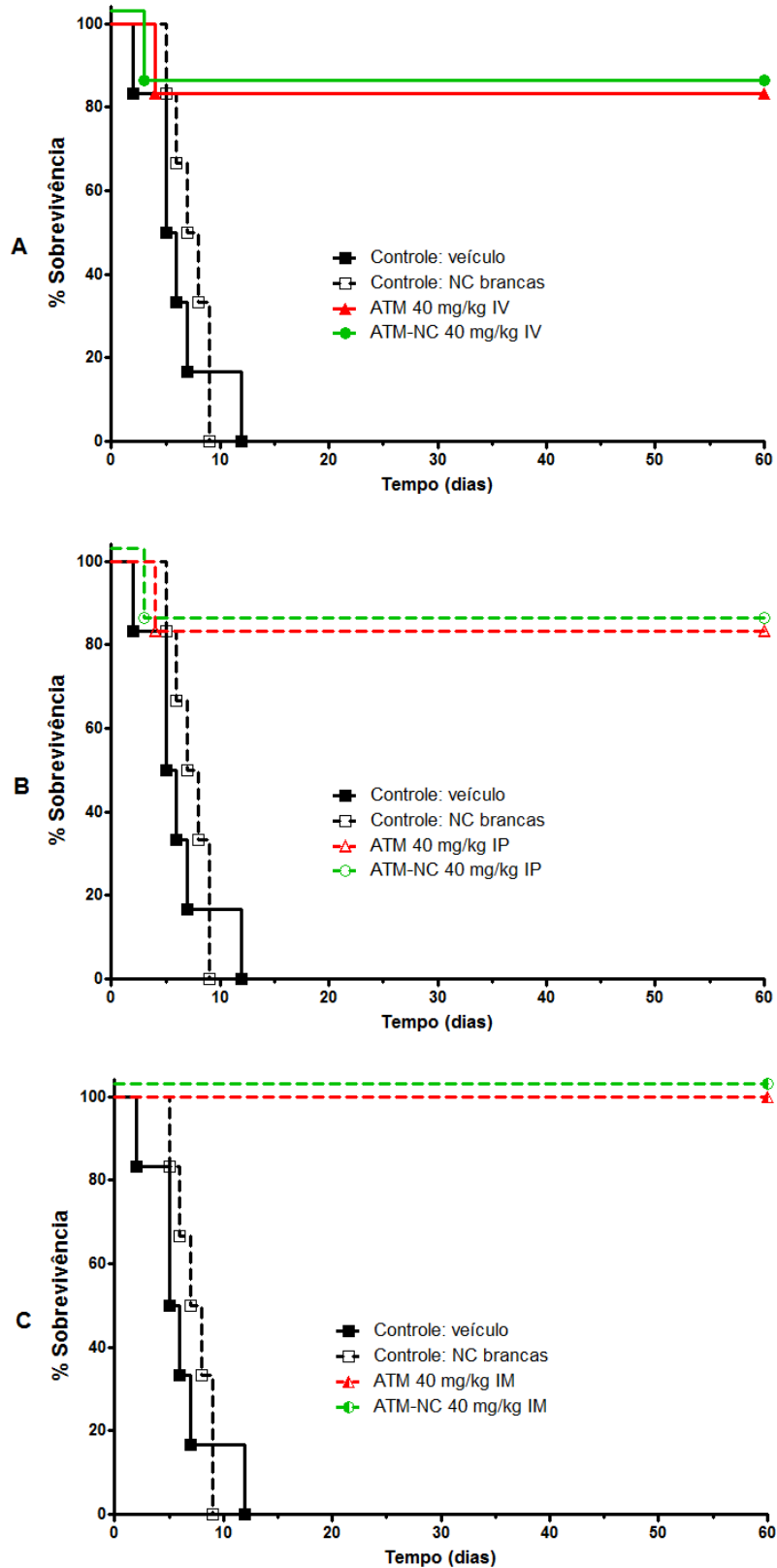




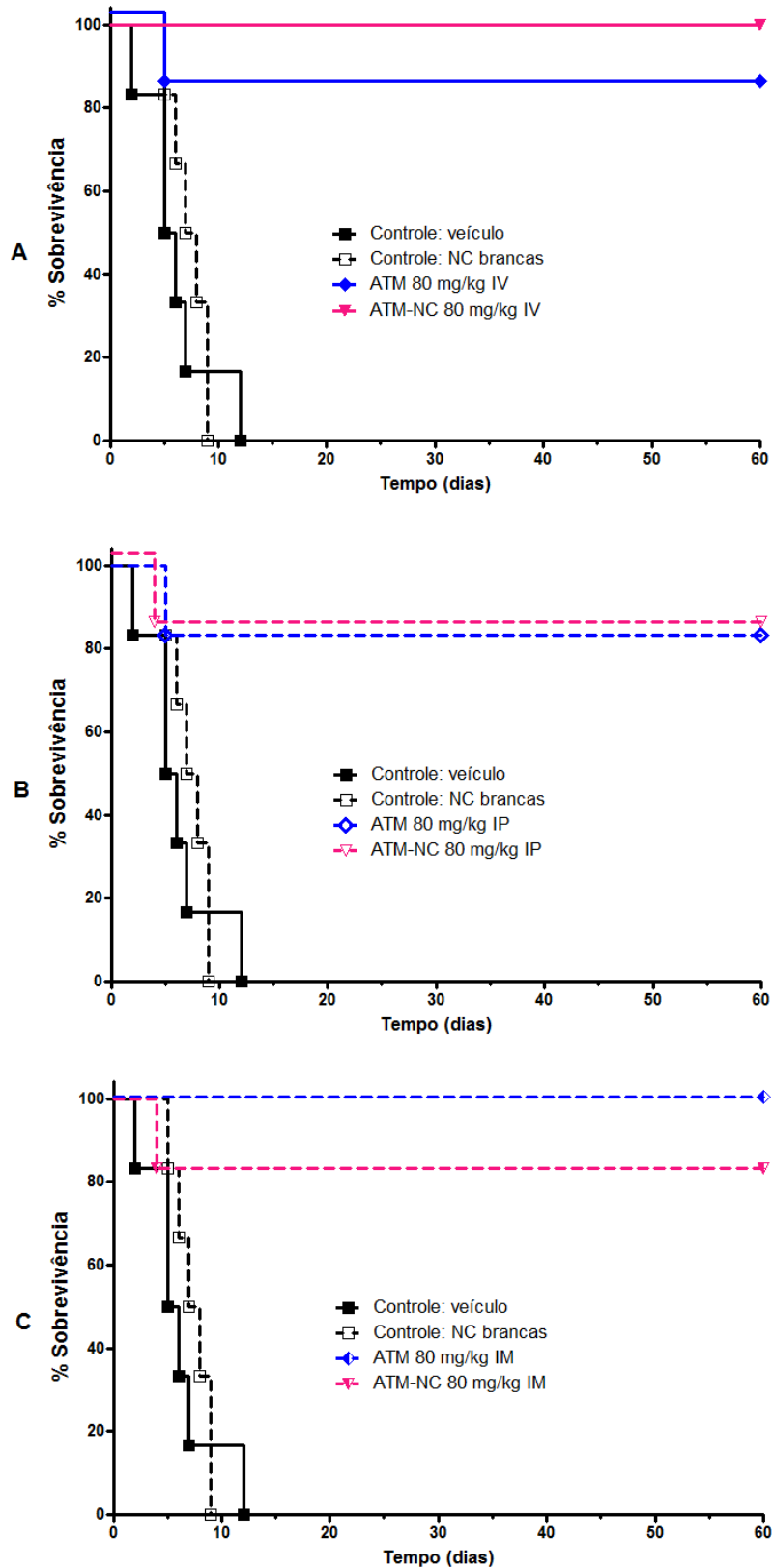
**Figura 16:** Curvas de parasitemia média de camundongos Swiss infectados pelo *P. berghei* tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL, pelas vias IV a 20 mg/kg (A) e oral a 40 mg/kg (B), utilizando o protocolo de dose única em D2 (n=6).

Nas figuras 17 e 18, é possível observar que o percentual de sobrevivência foi no *four day test* similar para todos os grupos tratados, nas diferentes formulações, doses e vias utilizadas, confirmando a eficácia antimalárica das nanocápsulas desenvolvidas. Os resultados são claros em relação ao aumento da sobrevivência dos animais tratados em relação aos grupos controle.

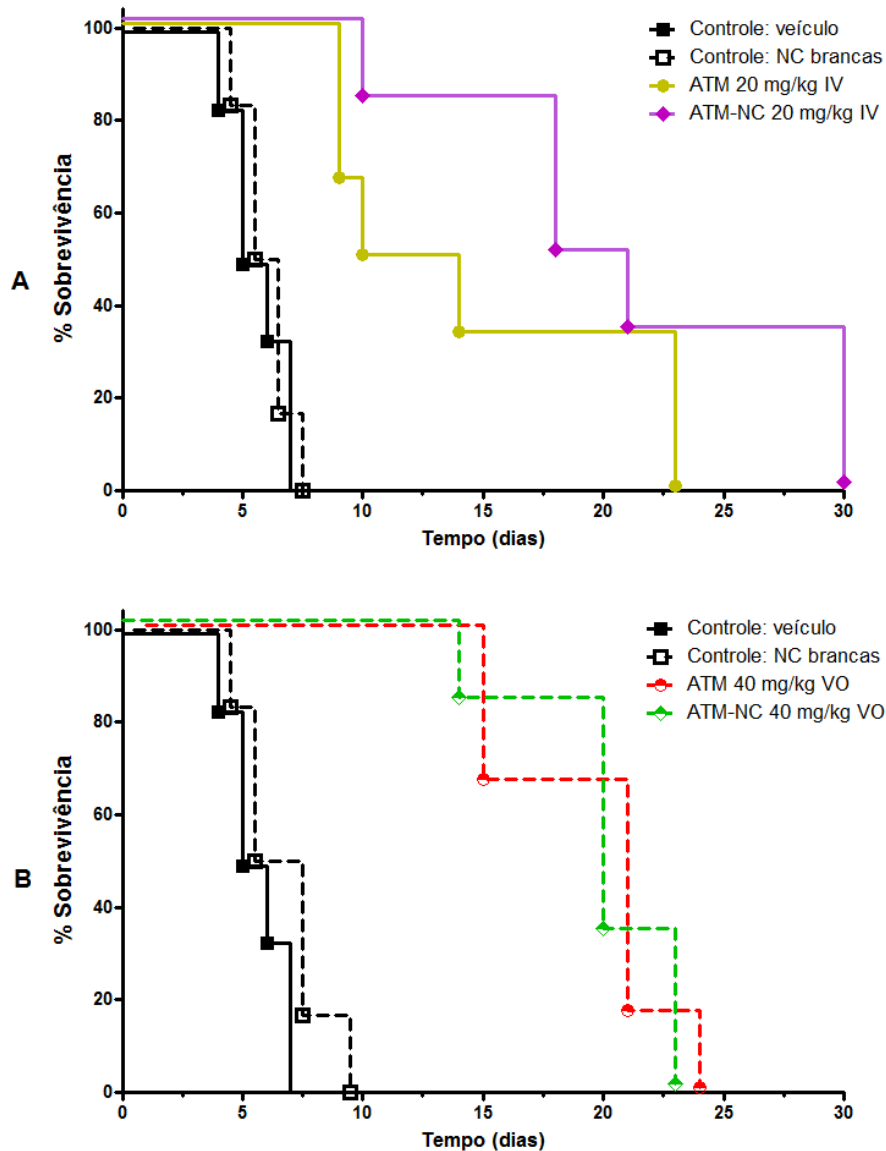
No protocolo de dose única após infecção bem estabelecida (figura 19), foi verificado aumento da sobrevivência de animais que receberam o arteméter em nanocápsulas, em relação à forma livre demonstrando, novamente, um prolongamento da ação do fármaco conferido pelas nanocápsulas. Para a VO, o aumento da sobrevivência foi observado tanto para os animais que receberam arteméter solubilizado em Tween 80®/PEG 300/etanol/glicose quanto para aqueles nos quais o fármaco foi encapsulado em nanopartículas de PCL (figura 19). Este efeito, discutido anteriormente, não pode ser devidamente analisado, pois houve provavelmente efeito do veículo do arteméter livre sobre a absorção intestinal.



**Figura 17:** Curva de sobrevivência de camundongos Swiss infectados pelo *P. berghei* tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL, pelas vias IV (A), IP (B) e IM (C), na dose de 40 mg/kg, utilizando o protocolo *four day-test* (n = 6).



**Figura 18:** Curva de sobrevivência de camundongos Swiss infectados pelo *P. berghei* tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL, pelas vias IV (A), IP (B) e IM (C), na dose de 80 mg/kg, utilizando o protocolo *four day-test* (n = 6).



**Figura 19:** Curva de sobrevivência de camundongos Swiss infectados pelo *P. berghei* tratados com arteméter livre e em nanocápsulas de PCL, pelas vias IV (A) a 20 mg/kg e VO (B) a 40 mg/kg, utilizando o protocolo de dose única (n = 6).

Os resultados encontrados neste estudo são comparáveis a outros relatos na literatura. Em estudos recentes, a cura de animais infectados pelo *P. berghei* também foi observada quando o arteméter foi associado a supositórios auto-emulsionáveis (GUGULOTHU *et al.*, 2010) ou nanopartículas lipídicas (JOSHI *et al.*, 2008; ADITYA *et al.*, 2010). Em todos os casos, a meia-vida do arteméter foi aumentada em relação à formulação parenteral disponível, corroborando os dados obtidos no presente estudo

em relação ao efeito anti-*P.berghei in vivo*. De maneira semelhante, Memvanga e Préat (2012) observaram uma melhora na atividade antimalárica do derivado da artemisinina  $\beta$ -arteéter associado a sistemas lipídicos auto-emulsionáveis para administração oral, em comparação com formulações orais e parenterais do fármaco. Chimanuka *et al.* (2002) desenvolveram lipossomas contendo  $\beta$ -arteméter e obtiveram 100% de cura em camundongos infectados pelo *P. chabaudi*, embora tal resultado seja controverso pelos relatos de cura espontânea em animais infectados por esta cepa (SILVA *et al.*, 2013).

A manutenção ou aumento da eficácia de outros antimaláricos associados a veiculadores manométricos também tem sido descrita. Leite *et al.* (2007) relataram a cura de camundongos infectados pelo *P. berghei* tratados com nanocápsulas de PCL e PLA-PEG contendo halofantrino. A nanoencapsulação da quinina aumentou sua interação com os eritrócitos e, conseqüentemente, melhorou sua atividade antimalárica (HAAS *et al.*, 2009). Em relação à cloroquina, os resultados *in vivo* foram promissores quanto à sua associação a nanopartículas de quitosana (TRIPATHY *et al.*, 2012). Igualmente, a eficácia antimalárica *in vivo* frente ao *P. berghei* de nanoemulsões de clotrimazol (BORHADE *et al.*, 2012) e nanopartículas lipídicas de arteméter-lumefantrino (PATIL *et al.*, 2013) foram recentemente demonstradas.

Pode-se concluir, portanto, que os nanocarreadores são úteis na manutenção ou aumento da eficácia antimalárica de fármacos, promovendo modificações na distribuição corporal dos mesmos, favorecendo sua aplicação por outras vias e provavelmente protegendo-os da degradação. Sendo assim, a toxicidade desses fármacos na forma livre e nanoencapsulada deve ser avaliada.

## 6. AVALIAÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE DO ARTEMÉTER

### 6.1 Introdução

A partir da observação de que o arteméter exibe cardiotoxicidade quando em altas concentrações plasmáticas (WHITE, 2007), associada à total biodisponibilidade do fármaco após a administração IV, proposta deste estudo, e à redução de efeitos cardiotóxicos associada à nanoencapsulação de fármacos (LEITE *et al.*, 2007; MACIEL *et al.*, 2010), os efeitos do arteméter livre e em nanocápsulas sobre o ECG e a PA foram avaliados *in vivo*, em protocolos de doses única e múltiplas.

### 6.2 Metodologia

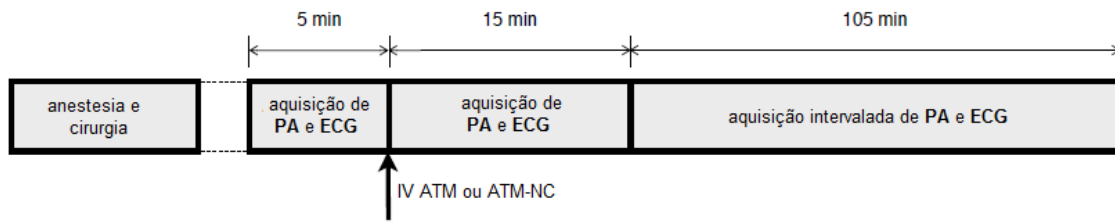
A toxicidade cardíaca do arteméter foi avaliada utilizando-se os sinais registrados de pressão arterial (PA) e ECG de ratos Wistar machos, com peso entre 220 e 250 g, os quais foram submetidos à administração IV do fármaco livre ou em nanocápsulas de PCL, em dois protocolos (figura 20):

**1.** Sinais de ECG e PA foram registrados continuamente durante 5 minutos antes e após administração única das formulações de arteméter IV nas doses de 40, 80 ou 120 mg/kg, ou soluções controle. A partir de então, registros de 30 segundos foram obtidos a cada 5 minutos até 30 minutos e na sequência a cada 15 minutos até 2 horas após a administração das diferentes formulações.

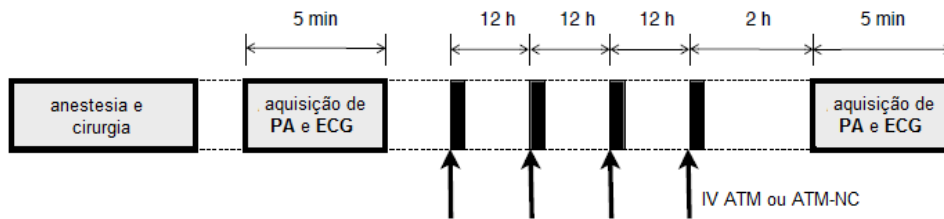
**2.** Sinais de ECG e PA foram registrados continuamente por 5 minutos como controles basais de cada animal. Em seguida, os animais receberam quatro doses IV de arteméter 20 mg/kg nas formas livre e encapsulada, ou soluções controle, a cada 12 horas, durante 48 horas. Decorridas 2 horas após a última administração, os sinais cardiovasculares foram registrados por 5 minutos.

Os volumes de administração máximos utilizados foram 4,4 ml para as soluções controle, 3,2 ml para o arteméter livre e 4,4 ml para o arteméter em nanocápsulas. A administração IV foi realizada de forma lenta, numa velocidade média de 0,5 ml/minuto.

**Protocolo 1**



**Protocolo 2**



**Figura 20:** Protocolos experimentais para avaliação da cardiotoxicidade

Os animais foram anestesiados por cetamina (100 mg/kg) e xilasina (14 mg/kg), por via IP e deixados sob respiração espontânea. Após a anestesia ter alcançado a profundidade necessária, foi realizada tricotomia e assepsia da região inguinal esquerda e pequena incisão para exposição do feixe femoral foi realizada. Para obtenção dos sinais da PA e para a administração IV das formulações, foram inseridos cateteres de polietileno na artéria e veia femorais, respectivamente. Os cateteres foram confeccionados unindo-se por aquecimento 5,0 cm de tubo de PE 10 a 15,0 cm de tubo de PE 50, preenchidos com solução salina e ocluídos por agulhas 25 x 7 cortadas. Após a cateterização, a extremidade PE 10 foi localizada na aorta abdominal, abaixo das artérias renais, para registro da pressão arterial, e veia cava inferior, para injeção das formulações. Nos animais do protocolo 2 as cânulas foram externalizadas no dorso e as incisões apropriadamente suturadas. Para aquisição dos sinais de PA, a extremidade PE 50 do cateter inserido na artéria femoral foi, então, acoplada a um transdutor de pressão TruWave® (Edwards Life Science, Canadá). Para possibilitar a medição da diferença de potencial relativa à derivação DII, agulhas hipodérmicas de aço inoxidável foram inseridas no tecido subcutâneo dos animais. Os sensores de ECG e transdutor de PA foram acoplados a um sistema condicionador que fornece sinais em



tempo real a uma frequência de 1200 Hz, processados por uma placa conversora analógico-digital (DaqBoard/2001, EUA) (VALE-CARDOSO e GUIMARÃES, 2010). Depois de conectados ao sistema, os animais foram deixados por 5 minutos para estabilização dos sinais antes do início dos registros e realização dos experimentos, nos dois protocolos adotados.

Ao final de cada experimento os registros digitais dos experimentos, obtidos em DaqBoard, foram convertidos pelo software Matlab 7.0 (MathWorks, EUA) e analisados por inspeção visual com o auxílio do software WinDaq (DATAQ Instruments, EUA). Foram selecionados segmentos de dois segundos de cada um dos registros, nos quais os seguintes parâmetros cardiovasculares foram extraídos: PA sistólica (PAS) e diastólica (PAD), e intervalos QT, RR, este para a obtenção da frequência cardíaca (FC), PR e complexo QRS do ECG e correção do intervalo QT pelo índice de Fridericia (1920):  $QTc = QT / (RR)^{1/3}$ .

Os dados foram analisados utilizando-se One-way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. Foi utilizado o software GraphPadPrism® 5.0 (GraphPad Software, EUA) como ferramenta para as análises estatísticas. Os dados foram expressos como média + erro padrão da média (EPM), com intervalo de confiança de 95% e as diferenças consideradas significativas quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 ( $P < 0,05$ ).

### **6.3 Resultados e discussão**

Para a avaliação da cardiotoxicidade do arteméter livre e associado às nanoestruturas, no protocolo de dose única foram utilizadas as doses de 40, 80 e 120 mg/kg IV. Como controle, os animais receberam veículo ou nanocápsulas brancas, que não induziram a alterações significativas nos parâmetros basais de PA e ECG dos animais (figura 21).

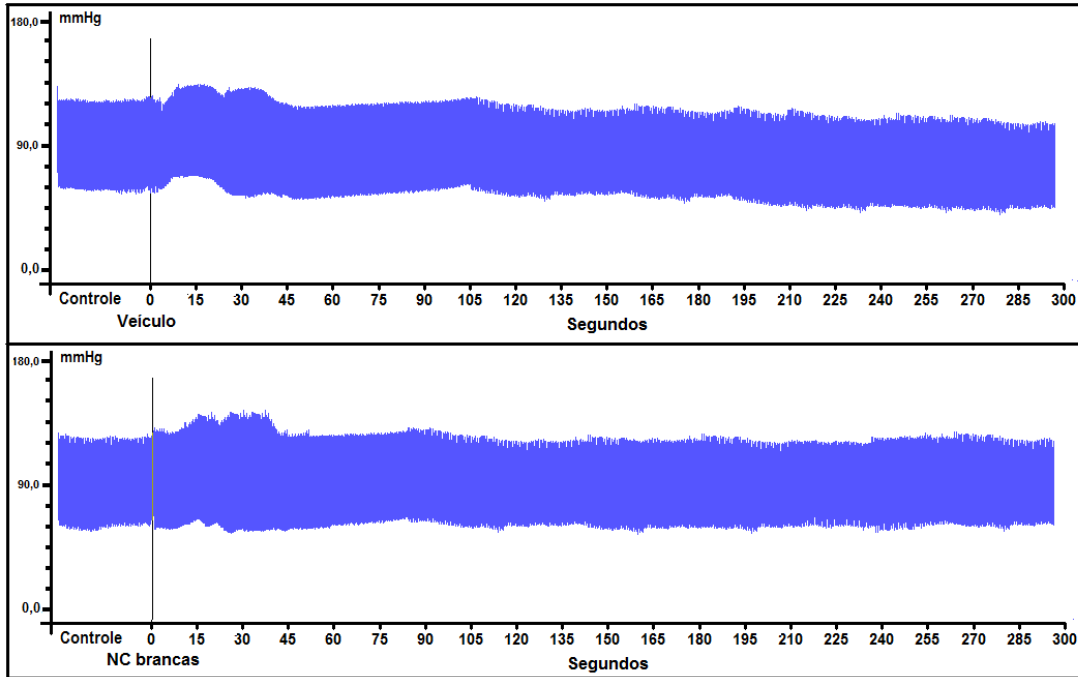
A administração IV de 120 mg/kg de solução de arteméter levou à morte dos animais por hipotensão severa e alterações significativas no ECG. A veiculação do arteméter em nanocápsulas, embora tenha sido eficaz em diminuir as alterações eletrocardiográficas em relação à forma livre na mesma dose, levou a alterações

importantes na PA dos animais associada, provavelmente, ao grande volume administrado (6,6 ml) (figura 22). Por esta razão, os experimentos com tal dose foram descontinuados.

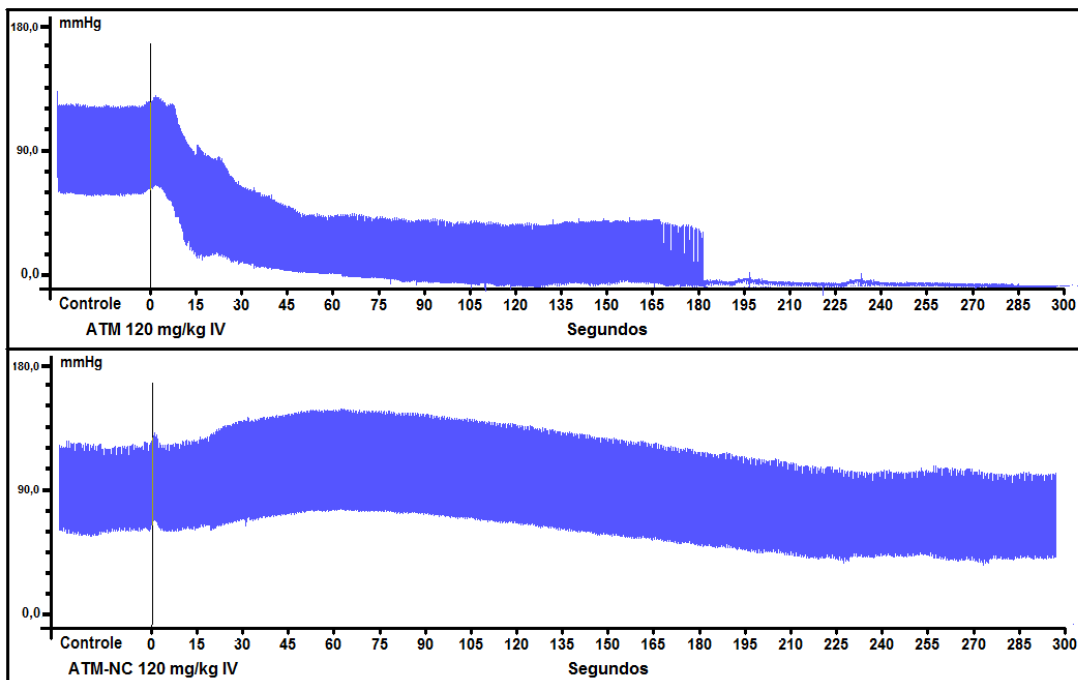
As figuras 23 a 34 apresentam as variações percentuais dos parâmetros do ECG – intervalo QT (figura 24), intervalo QTc (figura 25), intervalo PR (figura 26) e complexo QRS (figura 27) – em animais controle e tratados com dose única de arteméter nas formas livre ou encapsulada nas duas doses avaliadas. A figura 28 apresenta as variações percentuais da FC e nas figuras 29 a 30 são apresentadas as variações percentuais da pressão arterial – PAS e PAD, respectivamente, sendo os valores absolutos para estes parâmetros apresentados nas figuras 31 e 32. Nas figuras 33 e 34 são destacadas as principais alterações cardiovasculares observadas. As variações máximas dos intervalos QT e QTc são mostradas na figura 33 e os efeitos máximos das formulações sobre a PA e FC podem ser observados na figura 34.

A figura 35 apresenta as variações percentuais dos parâmetros do ECG – intervalos QT e QTc, em animais controle e tratados com dose múltiplas de arteméter IV 20 mg/kg nas formas livre ou encapsulada em diferentes doses. A figura 36 apresenta as variações percentuais de FC, PAS e PAD, enquanto os valores absolutos de PA estão representados na figura 37. Os valores absolutos dos parâmetros cardiovasculares obtidos encontram-se no Apêndice B – tabela 8.

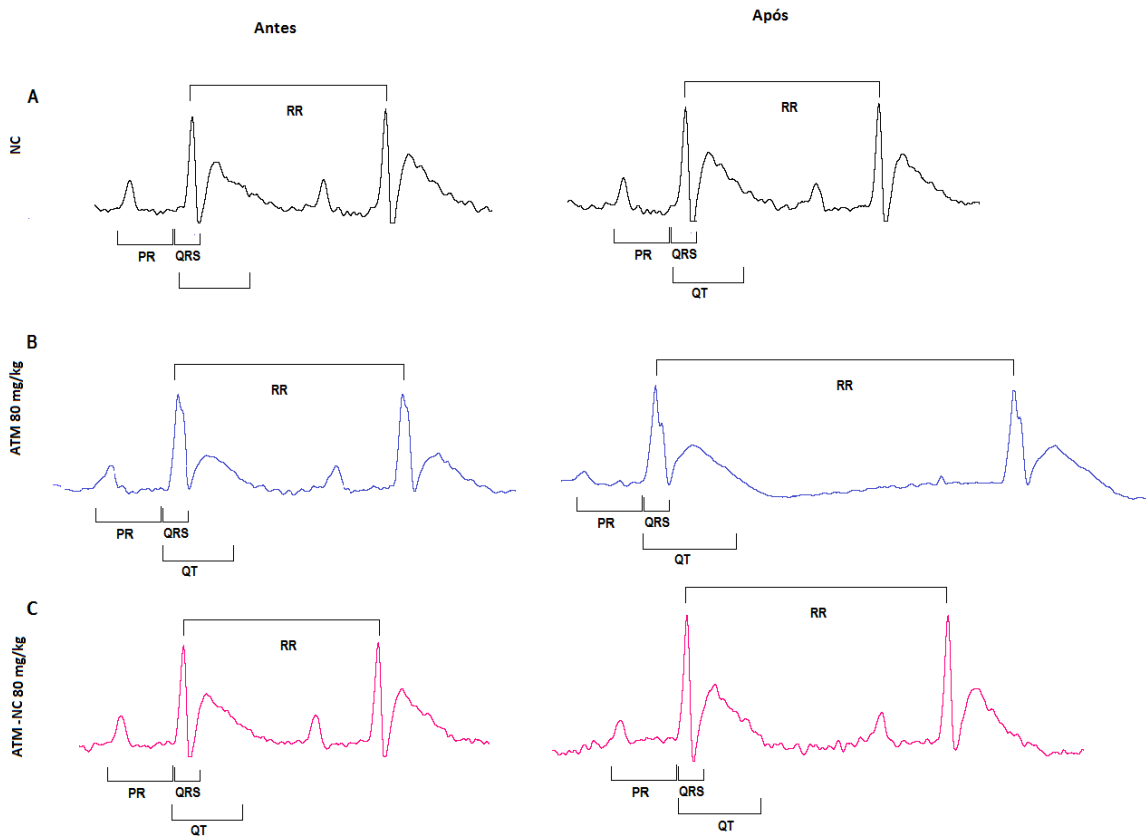
As principais alterações eletrocardiográficas decorrentes da administração IV de dose única de arteméter foram o prolongamento do intervalo QT e do intervalo RR, com conseqüente diminuição da FC (figura 23). A associação do fármaco a nanocápsulas foi capaz de minimizar tais alterações.



**Figura 21:** Exemplo de registro de sinal da PA ao longo do tempo após a administração IV de veículo (superior) ou nanocápsulas brancas. O sinal bruto de PA mostra a ausência de alterações após a administração (linha vertical preta).



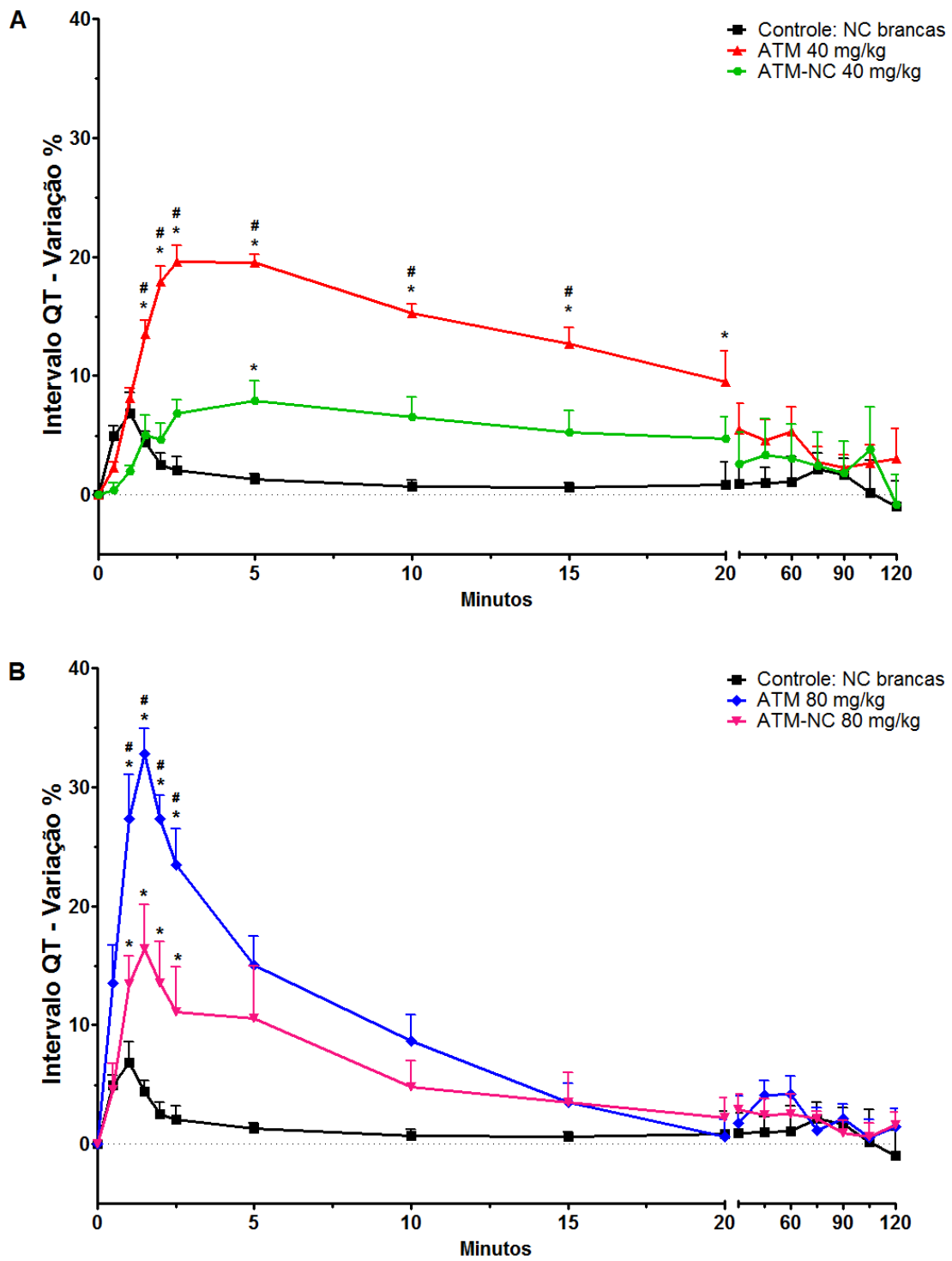
**Figura 22:** Exemplo de registro de sinal da PA ao longo do tempo após a administração IV de 120 mg/kg de arteméter livre (superior) ou em nanocápsulas. O sinal bruto de PA mostra a hipotensão severa logo após a administração (linha vertical preta) da forma livre levando à morte em torno de 3 minutos e uma breve e reversível alteração após a administração de arteméter em nanocápsulas, mantendo a normotensão em todo o tempo experimental.



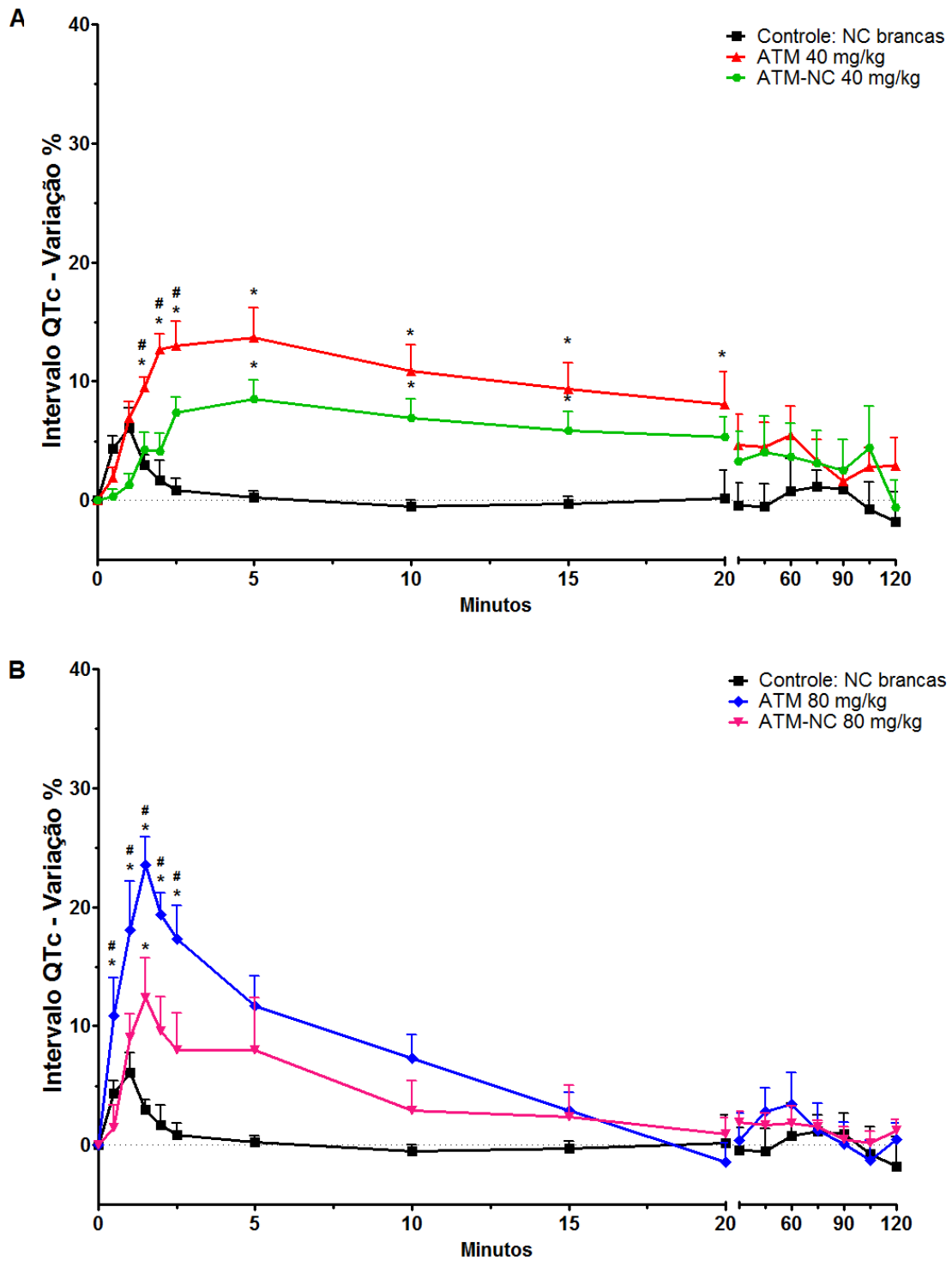
**Figura 23:** Parâmetros do ECG em animais antes e após a administração IV de nanocápsulas brancas (A), arteméter livre 80 mg/kg (B) e arteméter em nanocápsulas 80 mg/kg (C).

Os dados apresentados na figura 24 mostram que a administração IV de dose única de arteméter induziu a aumentos imediatos e significativos do intervalo QT. Nos animais que receberam arteméter livre (40 e 80 mg/kg), foram observadas variações máximas de 19,6 e 32,8% para este segmento, respectivamente, e os valores absolutos no prolongamento máximo observado foram 78,5 e 84,9 ms, respectivamente às doses. A associação do arteméter às nanocápsulas foi eficaz em reduzir significativamente este efeito, com aumentos máximos de 7,9 e 16,4% para as mesmas doses e os valores absolutos máximo observados foram 67,6 e 71 ms, respectivamente. A variação máxima do intervalo QT ocorreu entre 1,5 e 5 minutos após a administração de arteméter. Estas observações da capacidade das nanocápsulas em minimizar as alterações induzidas pelo arteméter indicam claramente sua capacidade de conferir cardioproteção. A administração do arteméter, em todas as doses e formas farmacêuticas avaliadas, não levou a alterações relevantes do intervalo PR, como mostrado na figura 26, assim como para o complexo QRS,

(figura 27). Na avaliação do índice QTc (figura 25), intervalo QT corrigido pela FC, foi observada uma tendência do arteméter em nanocápsulas em minimizar os aumentos observados para o arteméter livre em ambas as doses. Mesmo com o aumento de QTc ainda significativo em relação ao grupo controle, o aumento foi reduzido em cerca de 12% em relação ao arteméter livre no tempo 2,5 minutos após a administração, o que se traduz num valor absoluto máximo de 128 ms alcançado para o arteméter em nanocápsulas em relação a 144 ms para o arteméter livre, indicando a redução da toxicidade cardíaca. As variações percentuais máximas dos intervalos QT e QTc do ECG estão sumarizadas na figura 33.



**Figura 24:** Variação percentual do Intervalo QT após administração IV de dose única de arteméter 40 (A) ou 80 mg/kg (B) livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; # diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas \* P < 0,05 – ANOVA



**Figura 25:** Variação percentual do índice QTc após administração IV de dose única de arteméter 40 (A) e 80 mg/kg (B) livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; #diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA

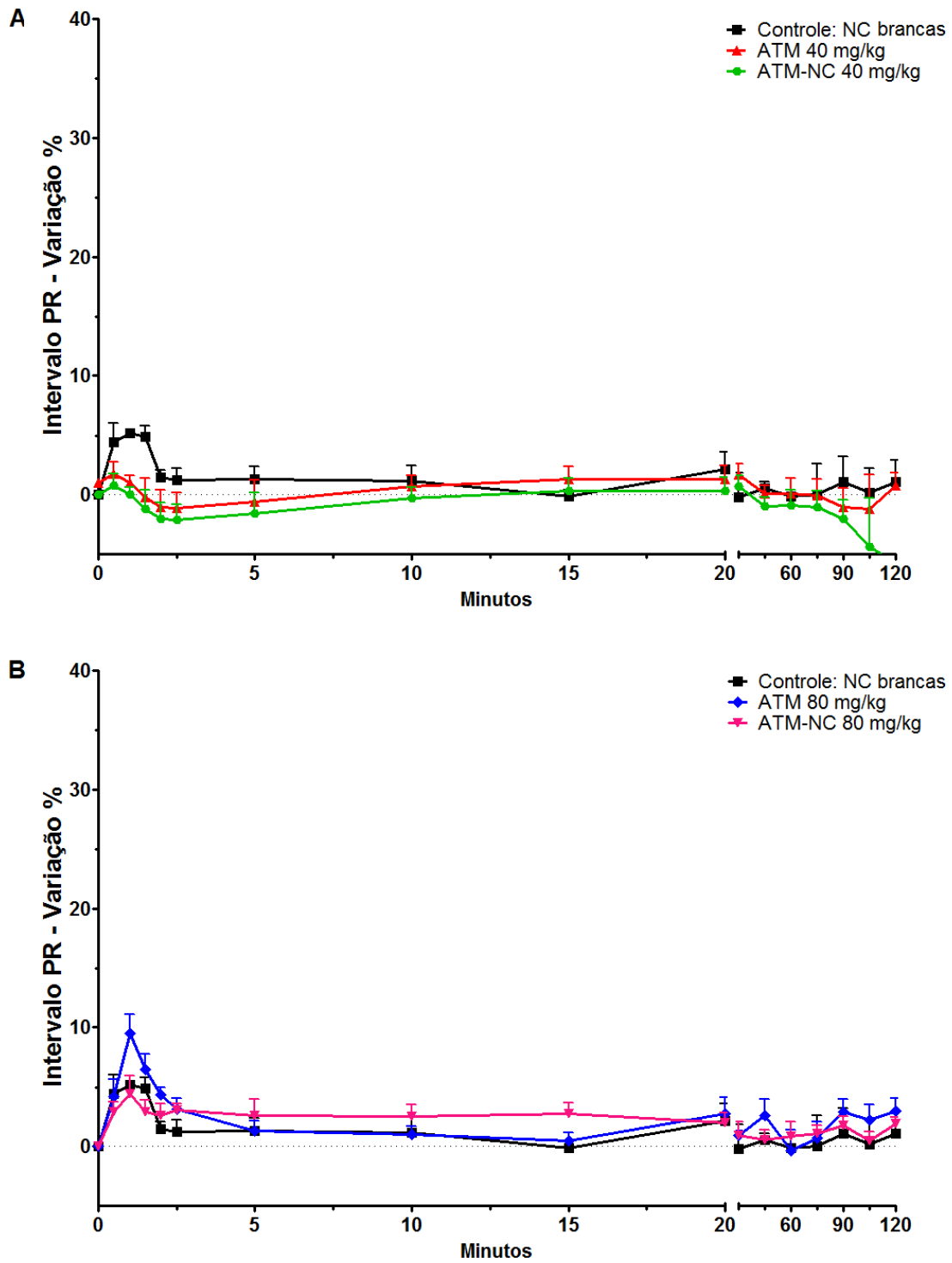


Figura 26: Variação percentual do Intervalo PR após administração IV de dose única de arteméter 40 (A) e 80 mg/kg (B) livre e em nanocápsulas.



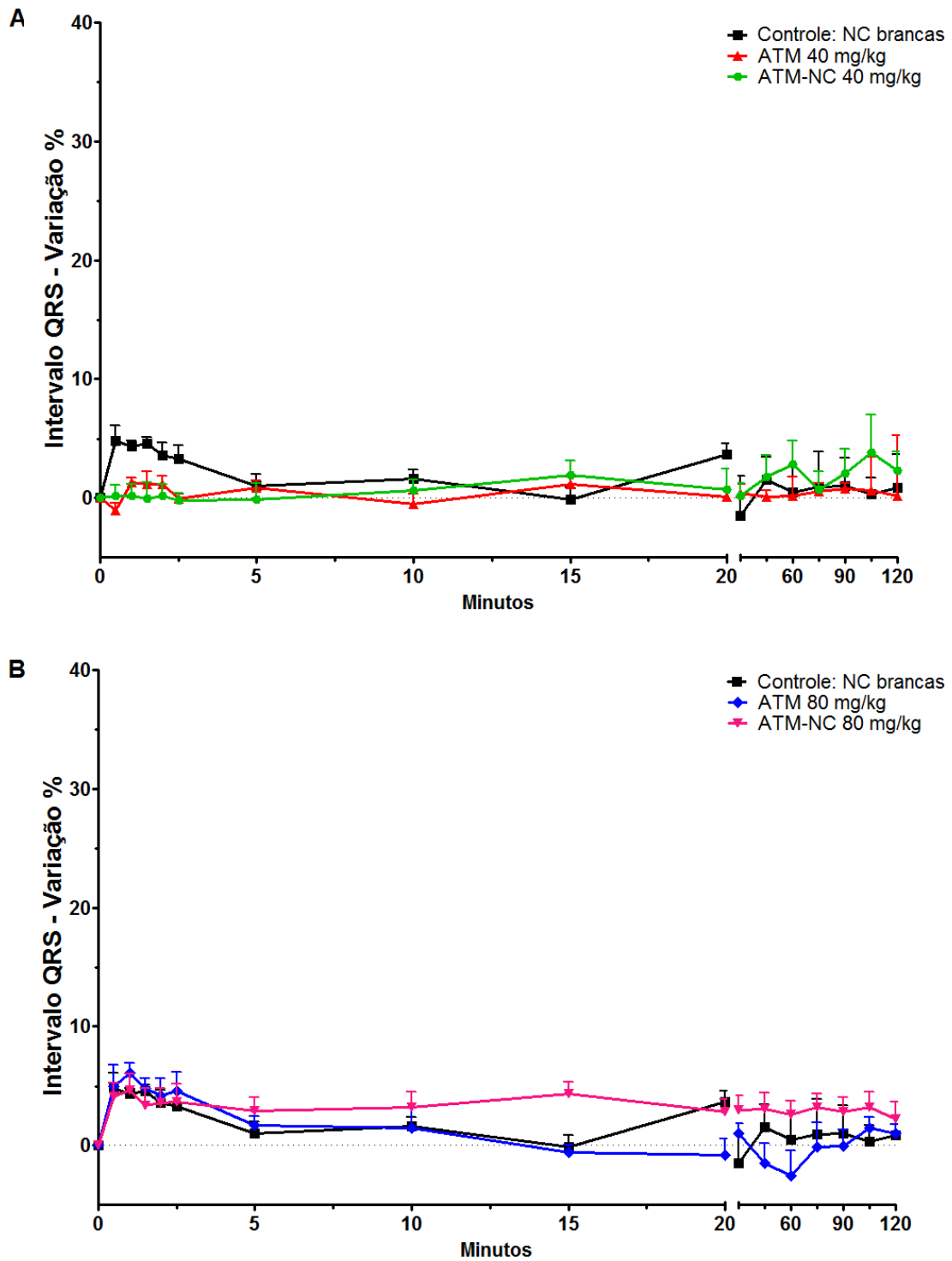
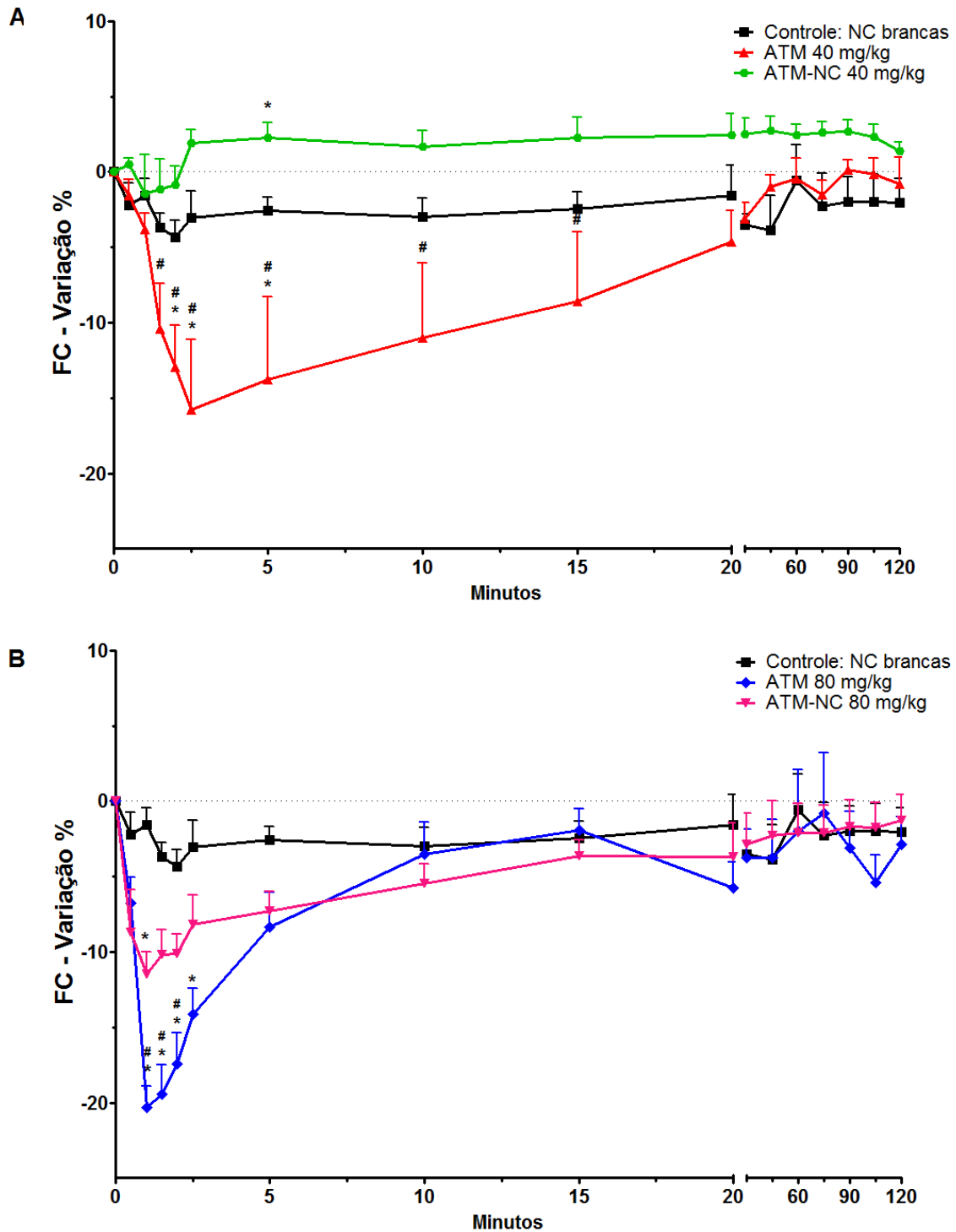
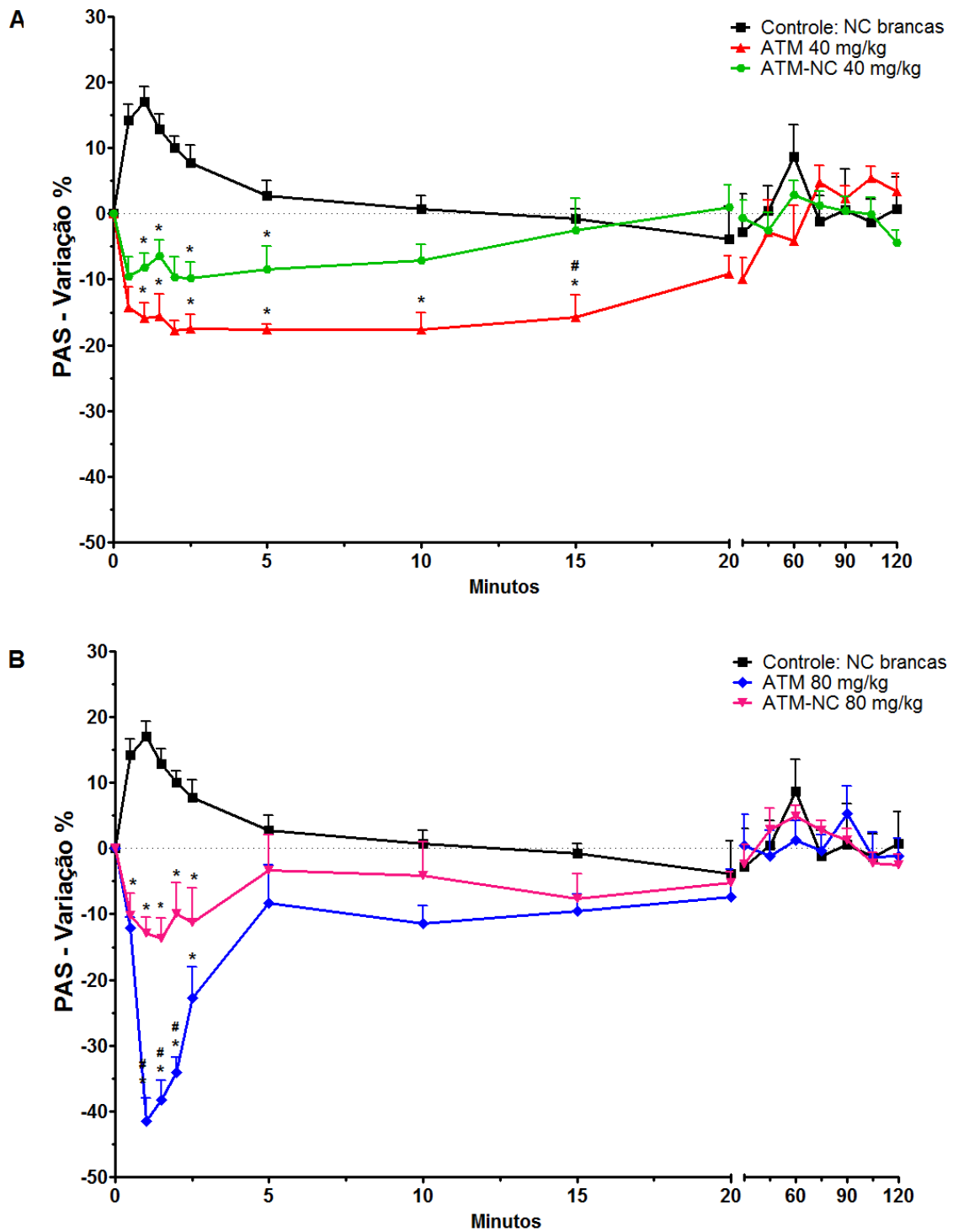


Figura 27: Variação percentual do complexo QRS após administração IV de dose única de arteméter 40 (A) e 80 mg/kg (B) livre e em nanocápsulas.

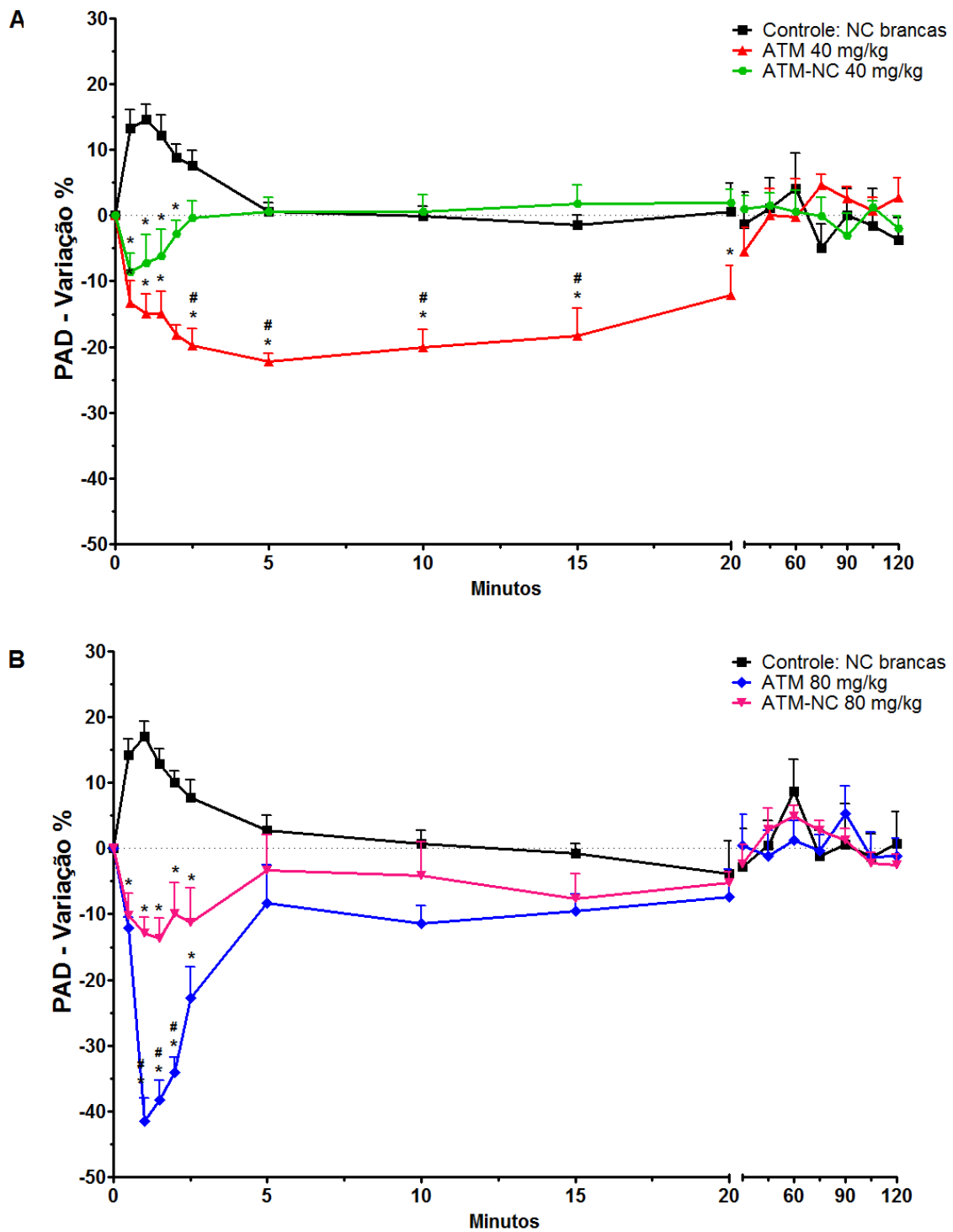
A administração de arteméter nas doses de 40 e 80 mg/kg levou à redução significativa da FC (figura 28) com reduções máximas de 15,8% e 20,3% em relação aos valores basais, e valores mínimos observados de 306 e 260 bpm, respectivamente, ou seja, bradicardia. Para a formulação de nanocápsulas, nas mesmas doses, as reduções máximas observadas foram de 1,4 e 9,4%, respectivamente às doses. Estas mesmas doses, na forma livre, também induziram queda marcante na PA. Para a PAS (figura 29), foram observadas diminuições máximas de 17,8 e 41,4% após a administração do fármaco livre nas doses de 40 e 80 mg/kg, respectivamente. As mesmas doses levaram a reduções da PAD da ordem de 22,2 e 49,9%, respectivamente (figura 30). Os valores absolutos mínimos alcançados após a administração de 80 mg/kg foram 75 e 50 mmHg para PAS e PAD respectivamente, mostrando claramente a ocorrência de hipotensão, que se manteve até 15 minutos após a administração (figuras 31 e 32). O tratamento com nanocápsulas como carreadoras para o arteméter foi capaz de impedir significativamente a redução da PA, minimizando a hipotensão, sendo observadas diminuições máximas de 9,8 e 16,4% para a PAS e 8,5 e 16,4% para a PAD após a administração IV nas doses de 40 e 80 mg/kg, respectivamente. As variações percentuais máximas de PA e FC estão sumarizadas na figura 34 para as doses de 40 (A) e 80 mg/kg (B).



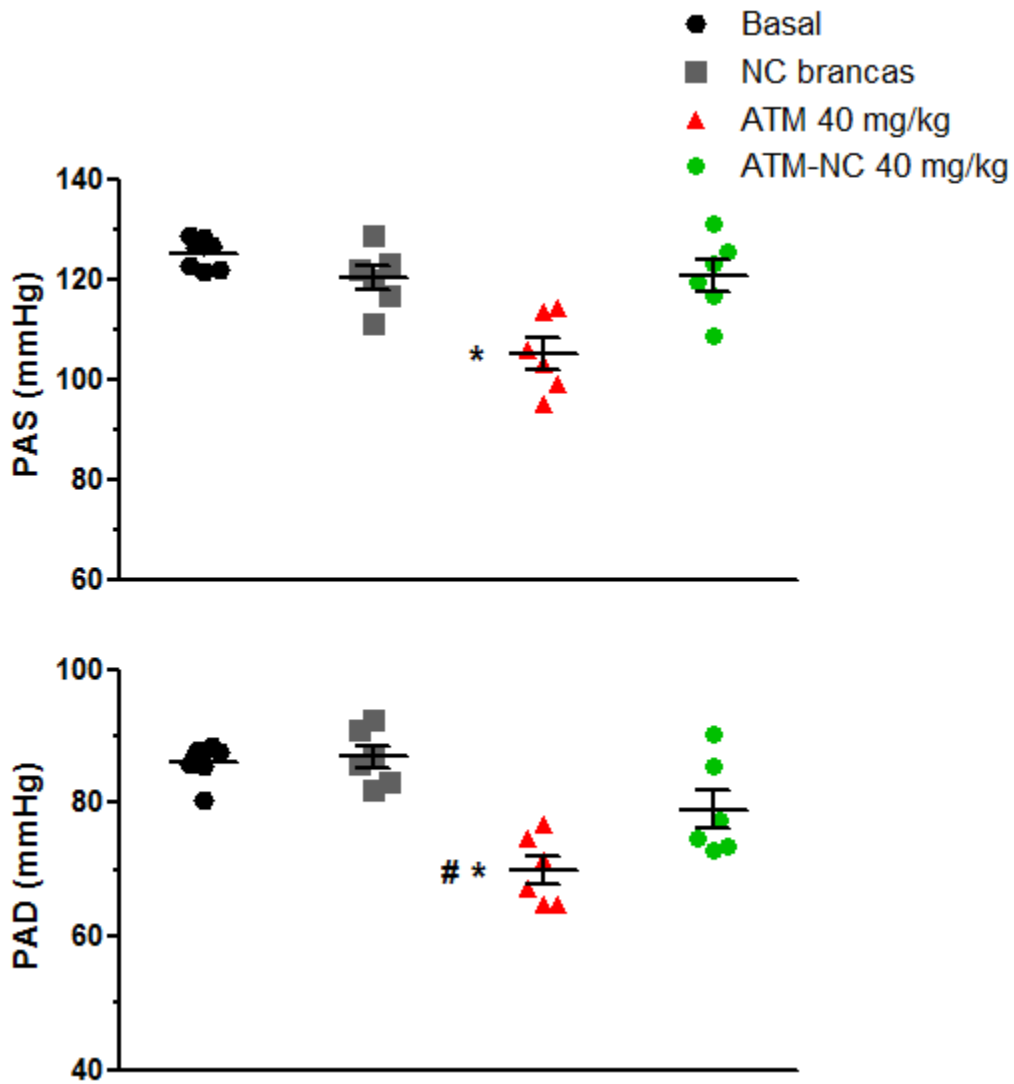
**Figura 28:** Variação percentual da frequência cardíaca após administração IV de dose única de arteméter 40 (A) e 80 mg/kg (B) livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; #diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA



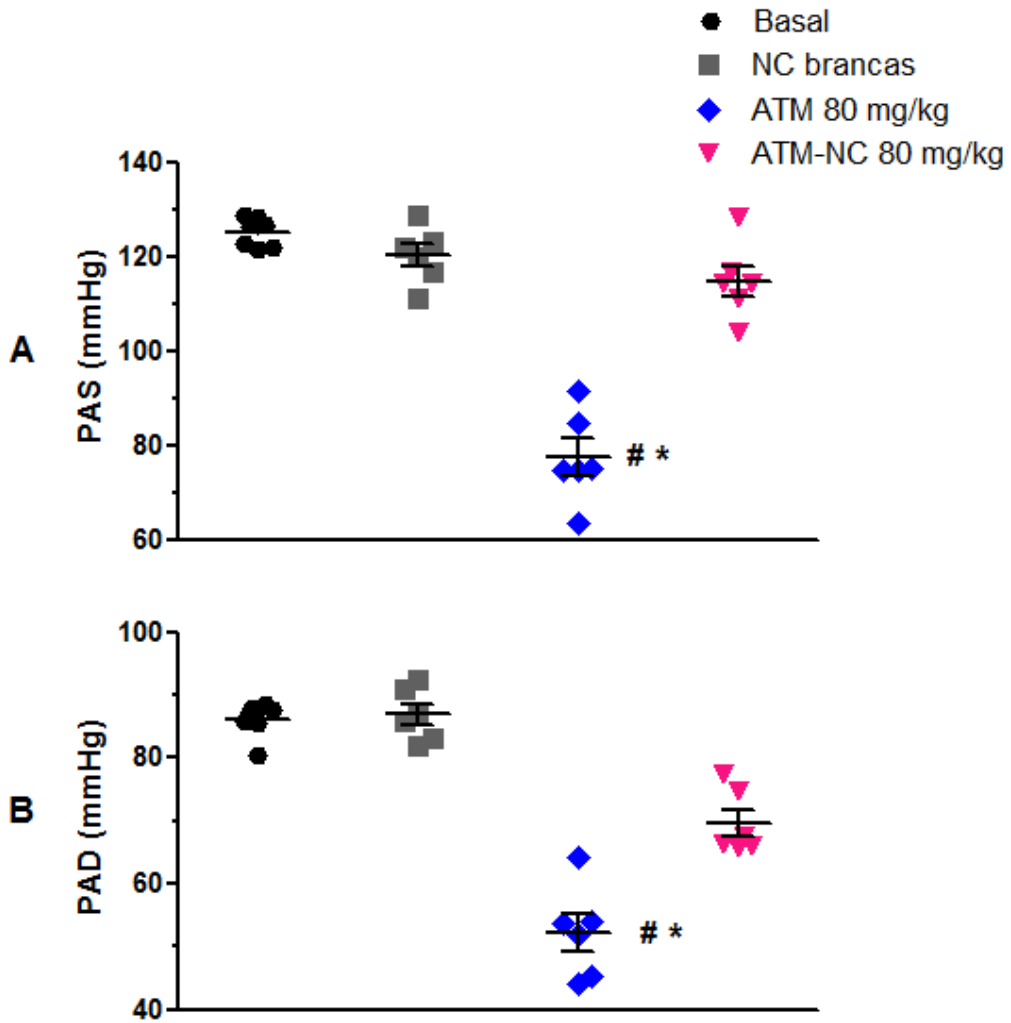
**Figura 29:** Variação percentual da pressão arterial sistólica após administração IV de dose única de arteméter 40 (A) e 80 mg/kg (B) livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; # diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA



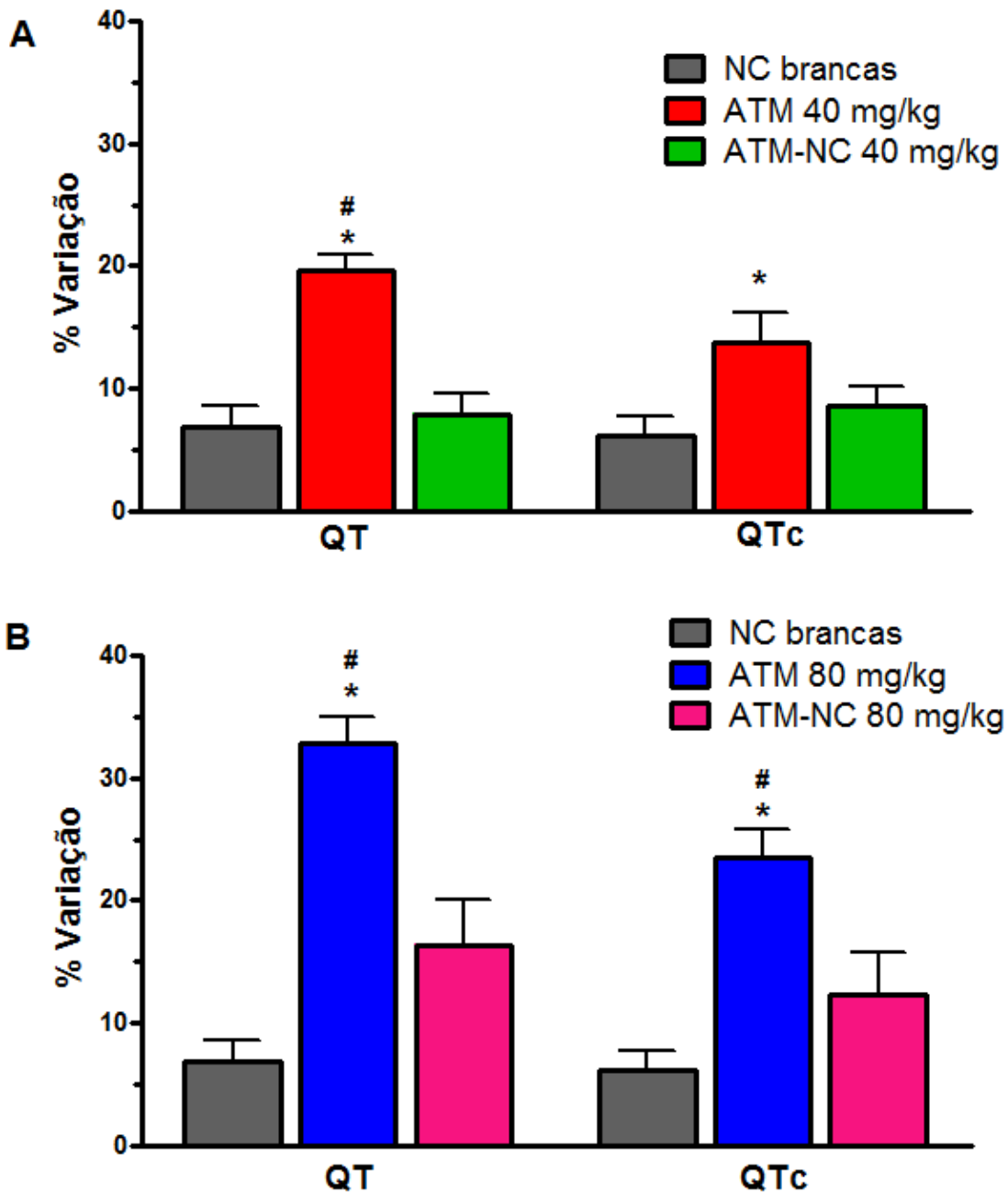
**Figura 30:** Variação percentual da pressão arterial diastólica após administração IV de dose única de arteméter 40 (A) e 80 mg/kg (B) livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; # diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas  $P < 0,05$  – ANOVA



**Figura 31:** Valores absolutos de PAS e PAD após administração IV de dose única de arteméter 40 mg/kg livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; #diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA

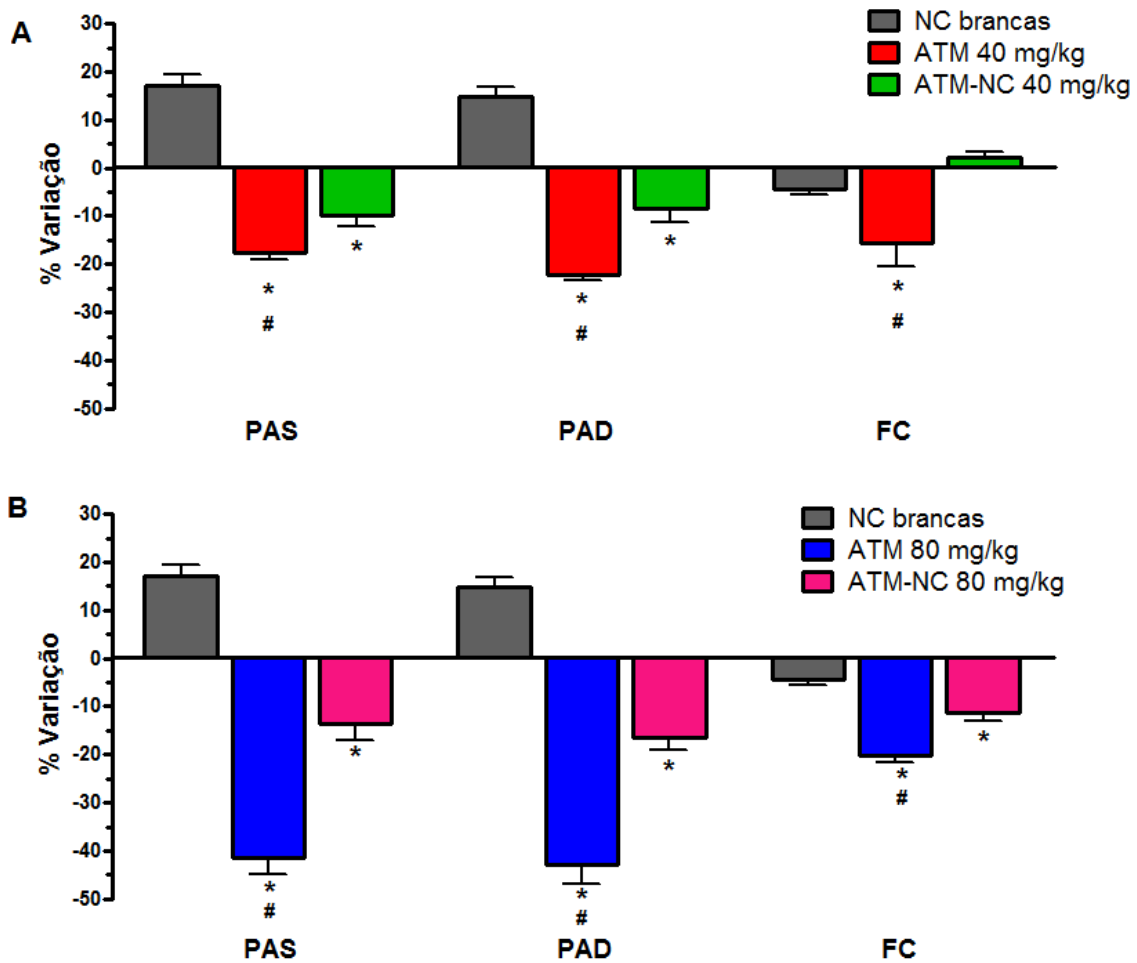


**Figura 32:** Valores absolutos de PAS e PAD após administração IV de dose única de arteméter 80 mg/kg livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; #diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA



**Figura 33:** Variação percentual máxima dos intervalos QT e QTc após administração IV de dose única de arteméter 40 (A) e 80 mg/kg (B) livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; #diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA

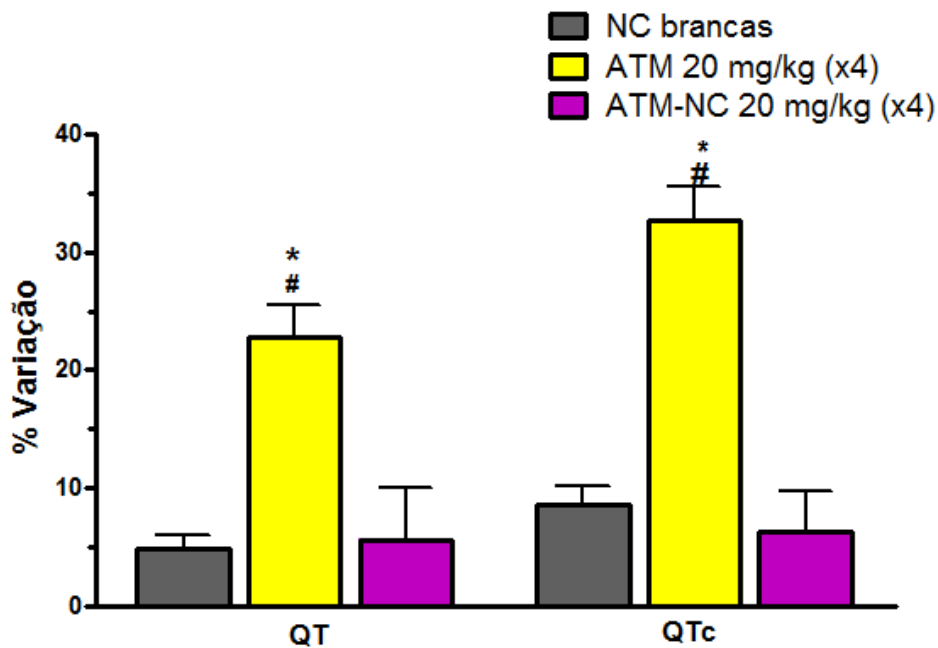




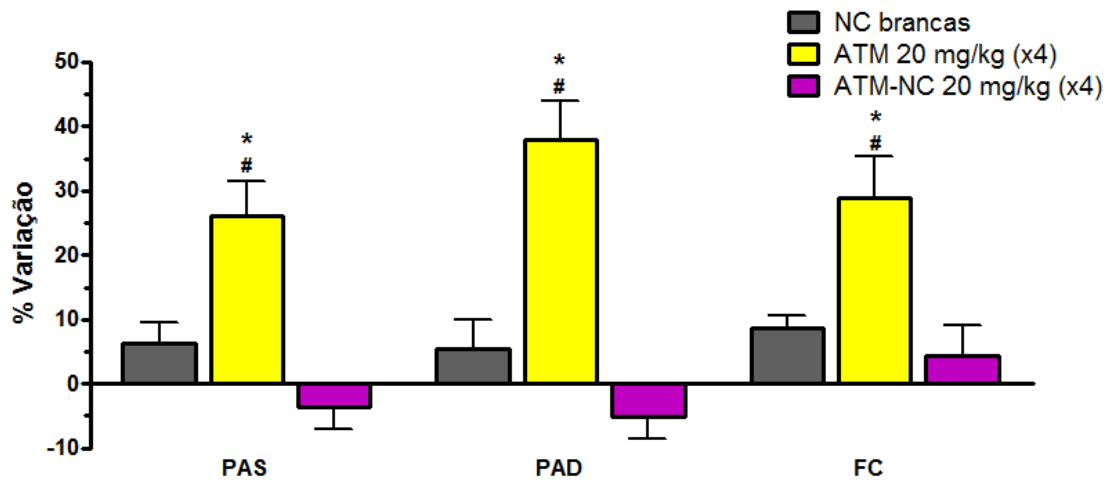
**Figura 34:** Variação percentual máxima de PA e FC após administração IV de dose única de arteméter 40 (A) e 80 mg/kg (B) livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; #diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA

De maneira semelhante ao protocolo de dose única, os dados apresentados na figura 35 mostram que a administração IV de quatro doses em 48 horas de 20 mg/kg de arteméter na forma livre induziu a aumentos significativos dos intervalos QT e QTc, da ordem de 22,7 e 32,6 %, respectivamente. A associação do arteméter às nanocápsulas foi eficaz em reduzir significativamente este efeito, com aumentos de 5,6 e 6,3 % de QT e QTc para o mesmo protocolo. A administração do arteméter, não levou a alterações relevantes do intervalo PR e do complexo QRS (Apêndice B – tabela 9). Após 2 horas da administração da última dose de arteméter 20 mg/kg, momento em que foram obtidos os sinais de PA e ECG após o tratamento, foram observados aumentos significativos de FC, PAS e PAD (figura 36), com variações

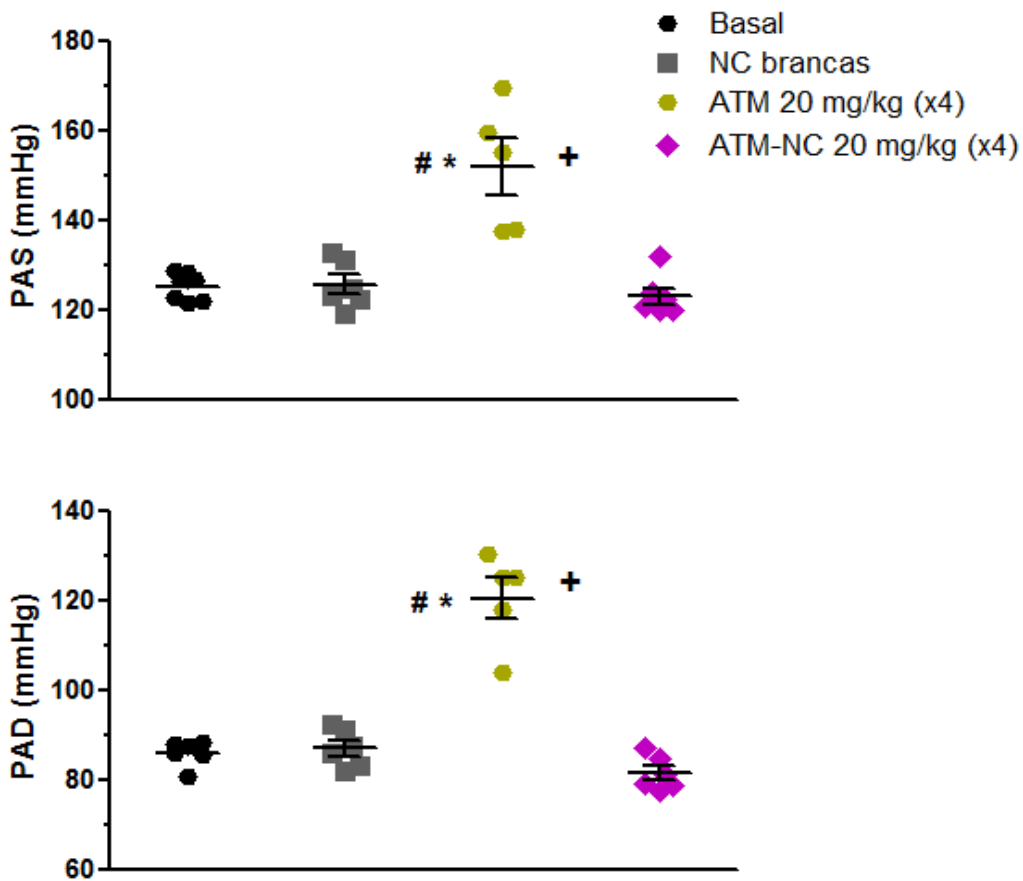
máximas de 29,9, 26,1 e 39,9 %, respectivamente, em relação aos valores basais, ou seja, hipertensão relevante. Para o grupo que recebeu nanocápsulas de arteméter, no mesmo protocolo, as variações máximas observadas foram aumento de 4,4 % para FC e reduções de 3,6 e 5,1 % de PAS e PAD, respectivamente, sendo mantidos valores absolutos de PA dentro da faixa de normalidade para o parâmetro. Os valores absolutos de PA basais e após a administração de arteméter nas diferentes formulações estão representados na figura 37.



**Figura 35:** Variação percentual dos intervalos QT e QTc após administração IV de quatro doses arteméter 20 mg/kg livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; #diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA



**Figura 36:** Variação percentual de PA e FC após administração IV de quatro doses de arteméter 20 mg/kg livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; #diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA



**Figura 37:** Valores absolutos de PAS e PAD após administração IV de quatro doses de arteméter 20 mg/kg livre e em nanocápsulas. \* diferença significativa em relação ao grupo controle; #diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA. + animal morto após a terceira dose.

De maneira geral, a administração IV de arteméter livre levou a alterações importantes nos parâmetros do ECG e PA, demonstrando sua cardiotoxicidade IV, tanto em dose única quanto em múltiplas doses. A alteração mais importante observada em ambos os protocolos foi o prolongamento do intervalo QT do ECG. Para o protocolo de dose única, foram verificadas reduções de FC, PAS e PAD, enquanto para o protocolo de múltiplas doses tais parâmetros foram significativamente aumentados. A veiculação do arteméter em nanocápsulas, proposta no presente trabalho, exerceu especial importância na diminuição dos seus efeitos tóxicos sobre o sistema cardiovascular, provavelmente por diminuir a quantidade de fármaco livre para associação ao tecido cardíaco.

O prolongamento do intervalo QT corresponde à principal alteração eletrocardiográfica indicativa de cardiotoxicidade de fármacos, devido à sua associação com a ocorrência de taquiarritmias ventriculares malignas e *torsades de pointes*, podendo levar à morte súbita por parada cardíaca (AHNVE, 1991; ANTZELEVITCH, 2007; MOSKOVITZ *et al.*, 2013). A cardiotoxicidade relacionada aos antimaláricos foi verificada após o relato de morte súbita de pacientes em tratamento com halofantrino, tendo sido verificado que um aumento dose-dependente do intervalo QT foi o responsável por tal intercorrência (NOSTEN *et al.*, 1993). Dois anos após, Monlun *et al.* (1995) observaram que os aumentos no intervalo QT poderiam ocorrer sem a apresentação de sintomas e em pacientes sem histórico de doenças cardíacas. A cardiotoxicidade relacionada ao arteméter foi primeiramente observada em cães por Brewer *et al.* (1994) e Classen *et al.* (1999). O primeiro grupo relatou um aumento do intervalo QT acompanhado de inversão da onda T após o tratamento intramuscular com 20 mg/kg do fármaco por duas semanas. Nos experimentos de Classen *et al.* (1999), o prolongamento do intervalo QT foi também observado, porém sem alterações na direção da onda T e na ausência de qualquer efeito no complexo QRS, de maneira semelhante ao verificado no presente estudo. Tal achado indica que o prolongamento do intervalo QT reflete um retardo na repolarização cardíaca. Efeitos similares são conhecidos para outros antimaláricos, tal como a quinina (BONINGTON *et al.*, 1996; HIEN *et al.*, 1996). Para este fármaco, um prolongamento do

intervalo QT de 25% foi associado ao risco de síncope ou morte súbita.

Os mecanismos que levam ao prolongamento do intervalo QT pelos antimaláricos estão, de maneira geral, ligados a alterações nos canais de potássio responsáveis pela repolarização cardíaca (TOUZE *et al.*, 2002; TRAEBERT e DUMOTIER, 2005; WHITE, 2007). Enquanto os efeitos cardiotoxicos do halofantrino estão relacionados ao bloqueio dos canais lentos de potássio voltagem-dependentes ( $K_v$ ), a cloroquina e a pirimetamina podem inibir as correntes do íon através da interação com os receptores muscarínicos de acetilcolina nos canais de potássio operados por ligantes (IK.Ach), importantes na repolarização do potencial de ação e na manutenção do potencial de repouso atrial, ao passo que primaquina e quinidina podem inibir a corrente pelo bloqueio competitivo dos receptores muscarínicos (HARA e KIZAKI, 2002). Embora os dados disponíveis não permitam chegar a um consenso sobre o mecanismo responsável por tal alteração do ECG decorrente da administração dos derivados da artemisinina, White (2007), após ampla revisão, sugere que o prolongamento de QT é subjacente às alterações neurológicas. Porém, a observação de que a administração oral de arteméter também pode causar alterações cardíacas, ao mesmo tempo em que parece estar isenta de neurotoxicidade, quando comparada à administração intramuscular (HIEN *et al.*, 1996; CLASSEN *et al.*, 1999), torna controversa tal afirmação. Independente do mecanismo de cardiotoxicidade, é fato que o prolongamento superior a 20% do intervalo QT e do índice QTc, tal como observado nos resultados anteriormente apresentados, está relacionado à maior ocorrência de arritmias ventriculares polimórficas e morte súbita por parada cardíaca (MOSKOVITZ *et al.*, 2013).

Reduções na FC e na PA, causas de bradicardia sinusal e hipotensão severa após a administração IV de fármacos, podem ser responsáveis pelo surgimento de síncope, diminuição da perfusão tecidual e morte súbita (TRAEBERT e DUMOTIER, 2005). Tais efeitos também são associadas à toxicidade de antimaláricos (WHITE, 2007). Nos resultados aqui apresentados, ambas as doses de arteméter livre utilizadas no protocolo de dose única levaram a reduções significativas em tais parâmetros. Os resultados foram semelhantes aos decorrentes da administração de halofantrino em

ratos (LEITE *et al.*, 2007). Em outro estudo, a administração IV de quinina e quinidina foram apresentadas como causa de hipotensão fatal, resultado da vasodilatação e inotropismo negativo decorrentes do bloqueio  $\alpha_1$ -adrenérgico por ambos os fármacos (SHIBATA *et al.*, 1998). Vasodilatação periférica e efeitos inotrópicos negativos também foram associados à cloroquina IV, e a ocorrência de morte súbita por choque hipotensivo após a administração do fármaco em crianças levou a OMS a desaconselhar seu uso parenteral (LOOAREESUWAN *et al.*, 1986). A hipertensão e taquicardia observadas após o protocolo de doses múltiplas podem ser atribuídas à ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina angiotensina como mecanismos regulatórios para recompor as sucessivas hipotensões e bradicardia decorrentes da administração aguda de arteméter livre, conforme observado por Luippold *et al.* (2003) na compensação da hipotensão induzida por quimpirola. A formulação de nanocápsulas, por inibir os efeitos hipotensores do arteméter, novamente foi eficaz em evitar tais alterações cardiovasculares, com os animais permanecendo normotensos após a administração das quatro doses.

Os benefícios da nanotecnologia na diminuição dos efeitos cardiotoxícos de fármacos têm sido demonstrados *in vivo* em vários estudos recentes. O tartarato emético para o tratamento da esquistossomose (MACIEL *et al.*, 2010) e o antitumoral doxorubicina (REYNOLDS *et al.*, 2012) estão entre os fármacos cardiotoxícos que tiveram suas propriedades melhoradas pela encapsulação. Leite *et al.* (2007) observaram atenuações no prolongamento do intervalo QT, na bradicardia e na hipotensão subjacentes à administração IV de halofantrino em altas doses, quando o fármaco foi associado a nanocápsulas de PCL, resultados similares aos aqui apresentados. Como a avaliação da cardiotoxicidade de arteméter veiculado em nanocápsulas constitui um trabalho inédito e não existem na literatura trabalhos abordando a avaliação dos efeitos cardiotoxícos de derivados da artemisinina veiculado em nanodispositivos, não foram possíveis maiores comparações. A redução das alterações cardiovasculares propiciada pela associação do arteméter às nanocápsulas em relação à administração do fármaco livre está, provavelmente, relacionada à habilidade do nanocarreador em modificar a distribuição do fármaco no

organismo, prolongando seu tempo de permanência no compartimento vascular como demonstrado por Mosqueira *et al.* (2004) para o antimalárico halofantrino. Desta maneira, a redução dos efeitos tóxicos poderia ser atribuída à menor fração de fármaco livre para a associação ao tecido cardíaco, se comparado à administração do fármaco em solução. Como demonstrado por Mosqueira *et al.* (2001), cinco minutos após a administração IV, as nanocápsulas poliméricas convencionais estão preferencialmente localizadas no fígado e baço. Desta maneira, pode-se sugerir que o arteméter seja gradativamente liberado a partir destes locais e convertido a dihidroartemisinina, um metabólito ativo, mas isento de cardiotoxicidade (WHITE, 2007), explicando a redução das alterações cardiovasculares observadas. Associado a isso, como os efeitos tóxicos dos derivados da artemisinina, incluindo cardio e neurotoxicidade, foram relacionados às altas concentrações do fármaco no sangue (MEDHI *et al.*, 2009), pode-se inferir que a incorporação do arteméter em nanocápsulas constitui uma alternativa para manter o fármaco ativo no organismo por mais tempo, ao mesmo tempo em que provê uma liberação diferenciada do mesmo, minimizando sua toxicidade.

## 7. AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE DO ARTEMÉTER

### 7.1 Introdução

A neurotoxicidade do arteméter, como já descrito anteriormente neste trabalho, é um dos aspectos que comprometem sua segurança terapêutica, descrita anteriormente em diversos modelos experimentais (BREWER *et al.*, 1994; CLASSEN *et al.*, 1999; NONTPRASERT *et al.*, 2000; AKINLOLU e SHOKUNBI, 2010). Assim, a avaliação da neurotoxicidade *in vivo* do arteméter e do mesmo veiculado em nanocápsulas é necessária para avaliar a hipótese de que a cardiotoxicidade possa ser decorrente da neurotoxicidade, e se a vetorização em nanocápsulas influencia esta potencial toxicidade. Os métodos experimentais aqui utilizados são considerados de triagem e indicam a toxicidade sobre o SNC, influenciando ações comportamentais. A hipótese de toxicidade sobre o sistema nervoso autônomo, a qual também pode influenciar a atividade cardiovascular, não foi avaliada no presente trabalho.

### 7.2 Metodologia

A avaliação da toxicidade do arteméter sobre o SNC foi realizada pela observação e quantificação das alterações comportamentais em camundongos adultos, induzidas pelo fármaco livre ou encapsulado, utilizando os métodos de campo aberto, labirinto em cruz elevado, haste girante e aparelho de tração, métodos já consolidados na literatura para tal objetivo (*Committee on Neurotoxicology and Models for Assessing Risk* (1992)). Camundongos Swiss fêmeas com peso entre 20 e 25 g foram aleatoriamente distribuídos nos diferentes grupos experimentais (n=6) e receberam 80 mg/kg IV de arteméter na forma livre ou encapsulada, divididos em quatro doses 20 mg/kg, administrados a cada 12 horas. Como controle, os animais receberam o volume correspondente (0,11 a 0,13 ml) de nanocápsulas brancas ou veículo. Todas as administrações foram feitas pela veia caudal lateral, com os animais adequadamente contidos em um cilindro de acrílico com fenda para exteriorização da cauda. Os animais foram submetidos às avaliações antes da administração, como registro basal dos comportamentos avaliados, e duas horas após receberem a última dose das formulações.



### **7.2.1 Método de campo aberto (*Open-field*)**

Foi utilizado o método proposto por Turner (1972), com modificações, com o objetivo de avaliar a locomoção espontânea e atividade exploratória do animal. O campo aberto (figura 38 A) (Insight Equipamentos Científicos) consiste em uma base de acrílico 100x80 cm, demarcada por 12 campos e cercada por parede transparente de acrílico de 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura. Os animais foram colocados individualmente em um dos quadrados próximos à parede por 2 minutos para ambientação e, em seguida, os comportamentos foram registrados com câmera filmadora por 5 minutos. Entre a exposição de um rato e outro foi feita a limpeza da arena com álcool. Na análise do comportamento foram observados:

- o número de campos invadidos;
- o número de vezes que o animal levantou apoiando-se nas patas posteriores, incluindo as vezes em que apoiou na parede lateral do campo aberto;
- movimento de limpar (*grooming*), considerado pelos movimentos dirigidos à cabeça, efetuados com as patas dianteiras;
- contagem dos bolos fecais.

### **7.2.2 Método de labirinto em cruz elevado**

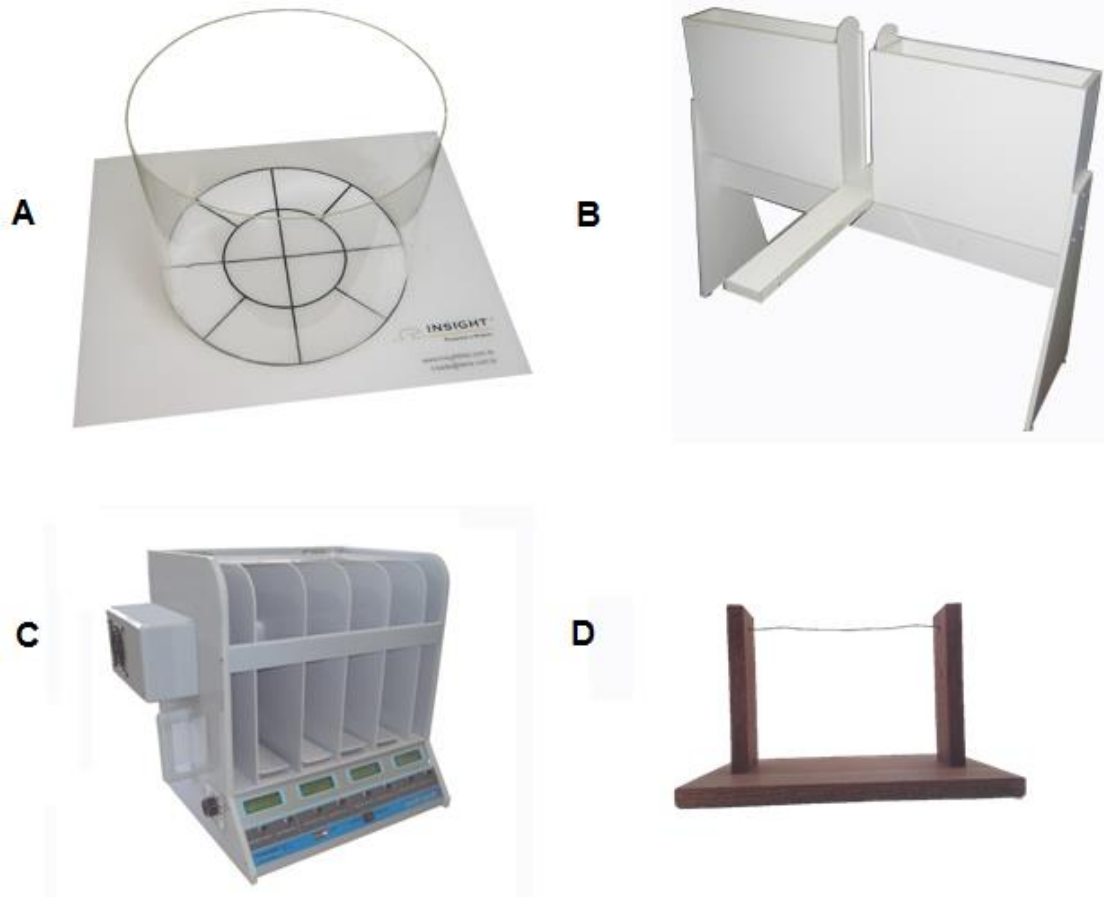
O método de labirinto em cruz elevado (figura 38 B), realizado utilizando o método descrito por Lister (1987), avalia o comportamento de ansiedade. O aparato (Insight Equipamentos Científicos) consiste em labirinto elevado a 40 cm do chão, com dois braços laterais fechados por paredes laterais, unidos perpendicularmente a dois braços abertos, sendo cada braço medindo 50 cm. O animal foi colocado no centro da cruz, com a cabeça voltada para o braço aberto, e os seus movimentos observados e filmados por um período de 5 minutos. O parâmetro avaliado foi a frequência de entradas nos braços abertos ou fechados, considerando a entrada em um dos braços como a retirada das quatro patas do centro da cruz (área neutra). Também foram contados os bolos fecais.

### **7.2.3 Método de haste girante (Rota road)**

O método da haste girante (figura 38 C) foi realizado utilizando o método descrito por Dunham e Miya (1957) com o objetivo de avaliar a coordenação motora e equilíbrio dos animais. A haste (Insight Equipamentos Científicos) consiste em uma barra giratória, dividida por discos intercalados em quatro setores de 10 cm. Os animais foram colocados individualmente num setor por 1 minuto para ambientação e, em seguida, foram colocados novamente por 2 minutos com aceleração progressiva de 5 a 20 rpm. Os experimentos foram filmados e o número e tempo de quedas no tempo experimental foram avaliados.

### **7.2.4 Método de tração**

O método de tração (figura 38 D) foi realizado de acordo com o método descrito por Rudziket *al.* (1973), com o objetivo de detectar alterações do tônus muscular. O aparelho de tração consiste em um fio metálico horizontal estendido a 30 cm de altura, sustentado por duas barras laterais. Foi avaliada a capacidade dos animais de se prender e sustentar no fio de metal com as patas anteriores e, quando livre, colocar uma das patas posteriores no fio em até 5 segundos. Cada animal foi colocado três vezes no aparelho no dia anterior para treinamento e por três vezes seguidas para a experimentação.



**Figura 38:** Métodos para avaliação de alterações comportamentais. A: campo aberto; B: haste girante; C: labirinto em cruz elevado; C: barra de tração.

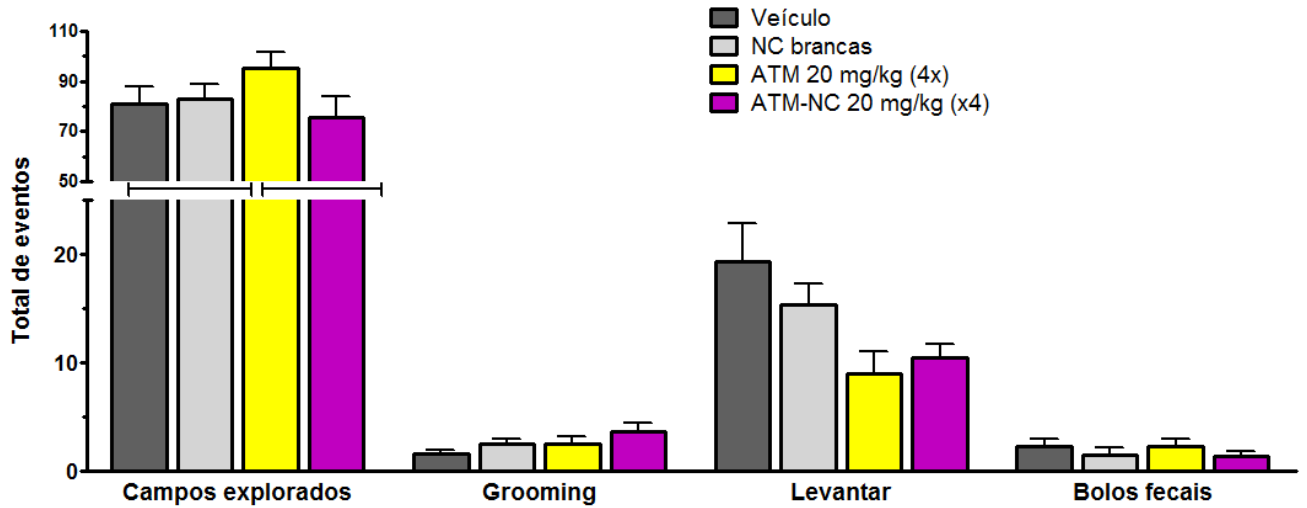
### 7.3 Resultados e Discussão

O método de campo aberto permite avaliar a locomoção de animais ou a reatividade emocional frente a diferentes substâncias. Em ambientes amplos, manifesta-se maior emocionalidade dos animais e os roedores, por instinto, se locomovem perto das paredes, onde se sentem mais protegidos. Agentes que interferem com a ansiedade podem aumentar ou diminuir o número de campos explorados, de *groomings*, além de alterar a defecação. Para os camundongos que receberam arteméter IV, o número de campos invadidos foi semelhante entre todos os grupos que receberam os diferentes tratamentos e analisados duas horas após a administração de 4 doses em 2 dias (figura 39) Os resultados também não foram diferentes dentro do mesmo grupo em relação aos resultados obtidos antes da

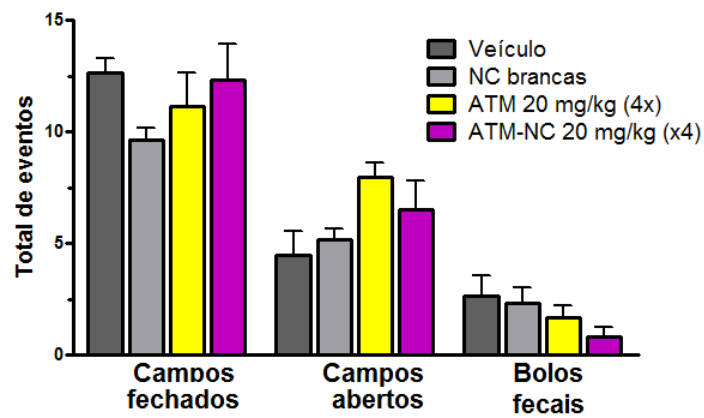
administração das formulações (dados não mostrados). O mesmo ocorreu para os comportamentos de movimentos de limpar, de levantar e também quanto à quantidade de bolos fecais contados durante os 5 minutos de experimentação.

O teste de labirinto em cruz elevado permite a observação do efeito das substâncias sobre o comportamento natural dos roedores que, frente às situações ameaçadoras representadas pela altura e pelo espaço aberto, exploram preferencialmente os braços fechados do equipamento. Neste teste, também não foram observadas alterações para um mesmo grupo comparando-se a observação basal (antes da administração das formulações – dados não mostrados) e após o tratamento para todos os grupos avaliados, assim como não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, sendo o número de vezes explorados pelos camundongos entre os braços abertos e braços fechados semelhante entre os grupos (figura 40).

Em relação à avaliação do equilíbrio e da força muscular (Tabela 8), também não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados. No teste da haste girante, indicativo do equilíbrio, todos os animais conseguiram permanecer na barra rotatória durante os dois minutos experimentais, exceto um animal do grupo que recebeu arteméter na forma livre, com uma queda após 37 segundos de experimentação. Já para o teste de força muscular, avaliada pelo método de tração, os animais de todos os grupos foram capazes de se manterem suspensos no fio metálico e de tocar o mesmo com as patas posteriores, não evidenciando alterações do arteméter sobre o tônus muscular.



**Figura 39:** Efeito do arteméter em doses múltiplas (4x 20 mg/kg IV) sobre a locomoção espontânea e atividade exploratória de camundongos, avaliadas pelo método de campo aberto. Os valores representam a média + EPM.



**Figura 40:** Efeito do arteméter em doses múltiplas (4x 20 mg/kg IV) sobre a capacidade exploratória de camundongos, avaliada pelo método de labirinto em cruz elevado. Os valores representam a média + EPM.

**Tabela 7:** Efeito das formulações de arteméter sobre o tempo de permanência na haste girante e sobre a força muscular dos animais na barra de tração

<b>Tratamento</b>	<b>Tempo médio de permanência na haste girante (s)</b>	<b>Percentual de animais que passaram no teste de tração</b>
<b>Veículo</b>	120 (120; 120)	100
<b>Nanocápsulas brancas</b>	120 (120; 120)	100
<b>ATM 20 mg/kg</b>	106,2 (37; 120)	100
<b>ATM-NC 20 mg/kg</b>	120 (120; 120)	100

Os resultados indicam ausência de efeitos da administração de quatro doses de 20 mg/kg de arteméter livre sobre os parâmetros comportamentais avaliados. Da mesma maneira, não foram demonstrados efeitos neurotóxicos para o fármaco encapsulado. Aparentemente não há envolvimento do sistema nervoso na gênese da cardiotoxicidade, pela não correlação dos dados obtidos. Contudo, como se tratam de testes de triagem, não se pode excluir por completo a neurotoxicidade para esta mesma dose e via, sendo necessários estudos futuros de avaliação histo-patológicas. Akinlolu e Shokunbi (2010), por exemplo, observaram alterações discretas de equilíbrio e coordenação em ratos submetidos à administração diária de 25 mg/kg de arteméter IM por 7 dias, enquanto os estudos histológicos evidenciaram danos significativos ao núcleo trapezoidal dos mesmos animais. Em estudos anteriores, Brewer *et al.* (1994) e Classen *et al.* (1999) também notaram discrepâncias entre as alterações comportamentais e os danos teciduais em ratos e cães, respectivamente. Classen *et al.* (1999) sugerem que esta aparente normalidade na função, a despeito da presença de dano neuronal, pode estar relacionada à capacidade neuronal de reserva, à capacidade de compensação do sistema nervoso frente à perda neuronal ou ao não envolvimento das áreas afetadas nas funções de coordenação motora, força e equilíbrio. Este mesmo autor destaca que esta ausência de sinais clínicos iniciais deveria servir de alerta à neurotoxicidade induzida pelo arteméter IM, devendo sua utilização ser avaliada com cautela.

A neurotoxicidade do arteméter parece estar relacionada à administração parenteral, na qual maiores concentrações plasmáticas do fármaco são alcançadas (MEDHI *et al.*, 2009). Alterações neurológicas e morte foram observadas em testes comportamentais que envolveram a administração diária IM de 30 a 100 mg/kg de arteméter por 28 dias em camundongos (NONTPRASERT *et al.*, 1998). Nos animais que receberam a menor dose ou uma dose intermediária (50 mg/kg), os distúrbios no equilíbrios e coordenação foram reversíveis, enquanto a maior dose levou à morte 22% dos animais e causou alterações irreversíveis à maioria dos sobreviventes. Este mesmos autores não verificaram efeitos neurotóxicos em experimentos envolvendo os mesmos esquemas de tratamento, porém por administração oral (NONTPRASERT *et al.*, 2000). Em estudo recente, Beckman *et al.* (2013), também não observaram alterações comportamentais em ratos jovens e adultos tratados com 30 ou 100 mg/kg de arteméter VO. Classen *et al.* (1999) acreditam que o mecanismo de neurotoxicidade do arteméter está relacionado aos mesmos efeitos oxidativos envolvidos no atividade antiparasitária, que poderiam resultar em dano neuronal e apoptose após exposição repetida. Estes efeitos, contudo, estariam restritos ao arteméter, não sendo observados para seu metabólito ativo dihidroartemisinina, conforme relatado anteriormente (BREWER *et al.*, 1994). Com base nestes dados, pode-se sugerir que a nanoencapsulação do arteméter também seria eficaz em reduzir sua neurotoxicidade, por promover alterações na biodistribuição deste fármaco, decorrente da captura preferencial por células do SFM no fígado e baço após administração IV (MOSQUEIRA *et al.*, 2001). Desta maneira, uma hipótese seria que sua posterior liberação na forma metabolizada resultaria em manutenção da eficácia terapêutica, com redução da neurotoxicidade.

## 8. DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo, as nanocápsulas foram preparadas pela técnica de deslocamento do solvente (FESSI *et al.*, 1989), a qual apresenta vantagens tais como homogeneidade de distribuição de tamanho das partículas produzidas, utilização de polímeros biodegradáveis bem estudados e seguros, tal como o PCL, uso de excipientes não tóxicos e facilmente removíveis e de solventes não clorados (BULCÃO *et al.*, 2013; RAO e GECKELER, 2011). As partículas de PCL apresentaram parâmetros físico-químicos melhores que as de PLA-PEG, além de veicular maior concentração de fármaco ativo (tabelas 4 e 5) e, por isso, foram selecionadas para a realização dos demais testes. As suspensões finais de nanocápsulas de PCL apresentaram elevada concentração de arteméter (2-4 mg/ml), que pode ser atribuída à sua alta solubilidade no núcleo oleoso das nanocápsulas. A localização do fármaco no núcleo oleoso foi confirmada pelo aumento significativo no tamanho das nanopartículas após a encapsulação do arteméter, variando de 35 a 45 nm (tabela 4). Os valores de potencial zêta das nanocápsulas de PCL variaram de -56,2 a -41,9 mV, sendo também influenciados pela associação de arteméter, o que indica que uma parte do fármaco pode estar localizada na superfície das partículas sem, contudo, impactar a estabilidade coloidal. As formulações de nanocápsulas foram fisicamente estáveis sob o período experimental (6 meses) e não se observaram quaisquer sinais de separação, agregação, floculação ou fase.

Através da técnica de MFA foi possível observar achatamento das nanocápsulas decorrente do contato com a sonda, representado pelo aumento do valor da relação diâmetro/altura (figura 8). Esta observação confirma a natureza maleável das nanoestruturas, contendo um núcleo oleoso envolvido por uma parede polimérica e gerando partículas de natureza vesicular (LEITE *et al.*, 2005). A distribuição de tamanho das partículas deve ser estritamente controlada em formulações destinadas à administração IV, a fim de evitar a oclusão dos capilares sanguíneos (DECUZZI *et al.*, 2010). A formulação de PCL como veiculadora de arteméter apresentou um índice médio de polidispersão adequado, indicando estreita distribuição de tamanho das partículas desenvolvidas.



A eficácia antimalárica das formulações de nanocápsulas contendo arteméter foi confirmada pelo *four day test*. A administração IV de arteméter livre e encapsulado nas doses de 40 e 80 mg/kg induziu remissão completa da parasitemia em comparação aos grupos controle e nenhuma recrudescência foi observada até 60 dias. Em estudos recentes, a eficácia do arteméter em animais infectados por *P. berghei* também foi observada quando o fármaco foi associado às nanopartículas lipídicas sólidas (ADITYA *et al.*, 2010). Esses estudos, à semelhança do aqui relatado, foram direcionados para resolver a principal limitação da terapia IV com arteméter: sua baixa solubilidade em água e meia-vida curta. A associação do arteméter com nanocarreadores é, portanto, uma ferramenta importante para viabilizar seu uso IV para o tratamento das formas graves de malária (SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010), quando a supressão rápida da parasitemia é requerida e os pacientes encontram-se hospitalizados (WHO, 2013). No entanto, nenhum dos trabalhos disponíveis avaliou a toxicidade cardiovascular dos nanocarreadores aos quais o arteméter foi associado. O halofantrino, um antimalárico reconhecidamente prolongador do intervalo QT do ECG foi associado às nanocápsulas (MOSQUEIRA *et al.*, 2004), as quais possibilitaram melhora da segurança do fármaco após a administração IV, com a redução de efeitos adversos cardiovasculares em ratos (LEITE *et al.*, 2007), tal como claramente observado neste estudo para o antimalárico arteméter.

Embora o arteméter esteja entre os derivados da artemisinina mais neurotóxicos (NONTPRASERT *et al.*, 1998), não foi possível confirmar tal efeito a partir dos testes comportamentais realizados. Conforme exposto, contudo, a aparente ausência de neurotoxicidade em tais testes não pode excluir a ausência de danos ao SNC, conforme observado por diferentes pesquisadores (BREWER *et al.*, 1994; CLASSEN *et al.*, 1999; AKINLOLU e SHOKUNBI, 2010). Independente dos resultados obtidos, no entanto, pode-se sugerir que as nanocápsulas não induzem neurotoxicidade *in vivo* nas doses, nos protocolos e nos modelos experimentais utilizados.

A cardiotoxicidade do arteméter foi avaliada neste trabalho através de um protocolo de administração de dose única de 40 ou 80 mg/kg e em quatro doses de

20 mg/kg IV (figura 20). Como controle, os animais receberam solução veículo ou nanocápsulas brancas IV, não sendo observadas alterações significativas nos parâmetros basais de ECG e PA dos animais. As principais alterações eletrocardiográficas decorrentes da administração IV de arteméter em ambos os protocolos foram o prolongamento dos intervalos QT e QTc em ratos Wistar. A associação do arteméter às nanocápsulas foi capaz de minimizar fortemente tais alterações (figuras 33 e 35). Pode-se sugerir uma modificação da biodistribuição do arteméter, uma vez que as nanocápsulas convencionais sofrem rápido acúmulo no SFM após a administração IV como previamente demonstrado para nanocápsulas de PLA *in vivo* num estudo farmacocinético em camundongos (MOSQUEIRA *et al.*, 2001).

A cardiotoxicidade induzida por muitos antimaláricos é caracterizada por distúrbios como prolongamento do intervalo QT, evidenciado pelas características do ECG conhecidas como "*torsade de pointes*" (TOUZE *et al.*, 2002; TRAEBERT e DUMOTIER, 2005). A determinação da toxicidade cardíaca induzida por fármacos não cardíacos que levam ao prolongamento do intervalo QT é obrigatória para a tomada de decisões durante o desenvolvimento de um medicamento (FERMINI e FOSSA, 2003; EMEA, 2005). Apesar de controvérsias acerca do mecanismo de cardiotoxicidade associado ao arteméter (CLASSEN *et al.*, 1999; WHITE, 2007), o prolongamento do intervalo QT superior a 20% em relação aos valores basais, como visto no presente estudo, está relacionado à maior incidência de arritmias ventriculares polimórficas e morte súbita por parada cardíaca (MOSKOVITZ *et al.*, 2013).

Diferentes antimaláricos estão associados a diminuições de FC e PA como causa da bradicardia sinusal e hipotensão fatais (TOUZE *et al.*, 2002; TRAEBERT e DUMOTIER, 2005). Nos resultados aqui apresentados, ambas as doses de arteméter livre administrado no protocolo de dose única IV levaram a reduções significativas nesses parâmetros, sendo tal efeito reduzido pela nanoencapsulação. Estes resultados são semelhantes aos decorrentes da administração IV de halofantrino livre em ratos, com a melhora de tais alterações propiciadas pela veiculação em nanocápsulas (LEITE *et al.*, 2007). Considerando a sintomatologia da malária grave envolve o colapso circulatório associado à hipotensão (WHO, 2010), a encapsulação do arteméter poderia tornar seu

uso mais seguro neste grupo de pacientes. No protocolo de doses múltiplas, o arteméter livre causou aumentos de FC e PA que levaram à hipertensão significativa, indicando a sua toxicidade. Pode-se supor que a diminuição da PA subjacente a cada dose pode levar à ativação do sistema nervoso simpático e sistema renina-angiotensina, mecanismos reguladores que levam à hipertensão final observada. Da mesma forma, o encapsulamento do arteméter foi eficaz em impedir tais alterações e, mesmo depois de quatro doses em 48 horas, os animais permaneceram normotensos.

Os principais resultados deste estudo mostram claramente que as nanocápsulas como carreadoras de arteméter mantêm a sua eficácia antimalárica e reduzem o perfil de cardiotoxicidade em relação à forma livre por via IV. A redução dos efeitos tóxicos cardíacos poderia ser atribuída a uma menor fração de fármaco disponível para associação ao tecido cardíaco, em comparação com a administração de fármaco livre em solução. Os efeitos tóxicos dos derivados de artemisinina foram relacionados a concentrações elevadas de fármaco no sangue (MEDHI *et al.*, 2009). Particularmente no caso do arteméter, as nanocápsulas e a via de administração influenciam na concentração do fármaco no plasma, em conformidade com estudos de outros autores que discutem o efeito das formulações e vias na toxicidade do arteméter (CLASSEN *et al.*, 1999; GENOVESE e NEWMAN, 2008). De fato, a análise dos resultados de eficácia indica uma redução mais lenta da parasitemia com o arteméter encapsulado em relação ao livre, o que corrobora a hipótese de redução da fração de arteméter livre disponível no plasma e, conseqüentemente, redução de toxicidade cardiovascular. Esse efeito deverá ser comprovado por estudo farmacocinético posterior. Também a lenta liberação do arteméter das nanocápsulas deve ser investigada em estudos futuros de liberação em plasma. Assim, pode-se concluir que a incorporação do arteméter em nanocápsulas poliméricas é uma alternativa para manter o medicamento ativo na circulação sanguínea, o que se verificou aqui pela manutenção da eficácia antimalárica, enquanto minimiza a toxicidade cardiovascular. Desta maneira, o uso de nanopartículas representa um interesse potencial na futura produção de tratamentos intravenosos mais seguros para uma grande variedade de substâncias cardiotóxicas.

## 9. CONCLUSÕES

Neste estudo a nanotecnologia foi aplicada à malária experimental. Foram selecionadas as nanocápsulas de PCL contendo arteméter por apresentarem características físico-químicas adequadas à sua utilização *in vivo*, as quais tiveram sua eficácia comprovada frente ao *Plasmodium berghei*, parasita que produz, nos roedores, malária de alta gravidade e fatal, semelhante àquela causada por *P. falciparum* em humanos. Através da avaliação das curvas de parasitemia, foi demonstrado um retardo no efeito farmacológico do arteméter em nanocápsulas frente à ação antiparasitária *in vivo*, sem redução de eficácia (cura), o que sugere concentrações plasmáticas menores do fármaco quando associado às nanoestruturas no início do tratamento. Em experimentos envolvendo a administração de dose única do fármaco livre ou encapsulado em animais com infecção bem estabelecida, foi confirmada a melhor atividade antimalárica na forma nanocarreada, que provavelmente altera o tempo de residência do arteméter no sangue e/ou aumenta a sua meia-vida. A meia vida intravenosa curta deste fármaco é uma importante limitação da utilização do mesmo na prática clínica, particularmente na malária complicada ou grave. Também foi demonstrada a potencialidade da formulação aqui desenvolvida na terapia oral com o arteméter, possivelmente melhorando sua biodisponibilidade.

Os dados de ECG e PA obtidos demonstraram claramente que o arteméter por via IV provoca um prolongamento do intervalo QT de ratos em ambos os protocolos estudados. Bradicardia e hipotensão importantes foram observadas quando o arteméter livre foi administrado em dose única, enquanto a administração de quatro doses foi acompanhada de hipertensão e taquicardia. Foi reportado que a formulação de nanocarreadores poliméricos do tipo nanocápsulas foi capaz de reduzir a toxicidade cardiovascular induzida pelo fármaco, mesmo em doses muito elevadas (120 mg/Kg) neste modelo animal. Esse fato foi atribuído à capacidade das nanocápsulas de restringirem a permeação do arteméter em tecidos de órgãos vitais, como o coração e cérebro, irrigados por vasos com endotélios contínuos e, portanto, pouco permeáveis a fármacos nanoparticulados. Este efeito causou uma proteção significativa desses

órgãos, evidenciada neste estudo, com redução dos efeitos cardiotoxícos e ausência de efeitos neurotóxicos. Os resultados apontam para uma potencial aplicação da formulação desenvolvida na terapia intravenosa da malária objetivando maior segurança terapêutica para o arteméter. Este potencial é também importante ao se considerar que este fármaco está sendo avaliado clinicamente no tratamento do câncer e não-clinicamente na terapia da esquistossomose.

## 10. PERSPECTIVAS

Este trabalho abre como perspectivas para estudos posteriores:

- Estudo da cinética de liberação do arteméter das nanocápsulas em presença de plasma;
- Estudo farmacocinético visando se estabelecer uma melhor correlação entre os níveis plasmáticos, cardiotoxicidade e neurotoxicidade do arteméter;
- Estudos de biodistribuição do arteméter nas nanocápsulas;
- Estudos de biodisponibilidade oral na forma de nanocápsulas;
- Estudos de toxicidade sobre o sistema nervoso autônomo;
- Comprovação da neurotoxicidade em protocolos com mais doses, acompanhados de estudos histológicos;
- Estudos de cardiotoxicidade após a administração de arteméter em nanocápsulas pela via oral.
- Estudos de cardiotoxicidade em animais infectados pelo *Plasmodium*.

---

## 11. REFERÊNCIAS

ADITYA N; PATANKAR S; MADHUSUDHAN B; MURTHY RS; SOUTO EB. Artemeter-loaded lipid nanoparticles produced by modified thin-film hydration: Pharmacokinetics toxicological and *in vivo* anti-malarial activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 40:448–455, 2010.

AHNVE S. Is QT interval prolongation a strong or weak predictor for cardiac death? **Circulation** 84:1862-1865, 1991.

AKINLOLU A; SHOKUNBI M. Neurotoxic effects of 25mg/kg/body weight of artemether on the histology of the trapezoid nuclei and behavioural functions in adult male Wistar rats. **Acta histochemica** 112:193–198, 2010.

ANTZELEVITCH C. Ionic molecular and cellular bases of QT-interval prolongation and torsade. **The European Journal of Pacing Arrhythmias and Cardiac** 10:12-23, 2007.

ARNOLD J; ALVING S; CLAYMAN C. Induced primaquine resistance in *vivax* malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 55(4):345-350, 1961.

BECKMAN D; YOURENEFF M; BUTT M. Neurotoxicity Assessment of Artemether in Juvenile Rats. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology** 98(2):183-199, 2013.

BOARETO A; MÜLLER J; ARAUJO S; LOURENÇO AC; LOURENÇO EL; GOMES C; MINATOVICZ B; LOMBARDI N; PAUMGARTTEN FR; DALSENTER PR. Study on the developmental toxicity of combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rats. **Reproductive Toxicology** 34:658-664, 2012.

BONINGTON A; DAVIDSON R; WINSTANLEY P; PASVOL G. Fatal quinine cardiotoxicity in the treatment of *falciparum* malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 90:305-307, 1996.

BORHADE V; PATHAK S; SHARMA S; PATRAVALE V. Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part II: Stability assessment *in vivo* pharmacodynamic evaluations and toxicological studies. **International Journal of Pharmaceutics** 431:149– 160, 2012.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da malária. **Boletim Epidemiológico** 44, 2013.

- BRAZ R; DUARTE E; TAUIL P. Caracterização das epidemias de malária nos municípios da Amazônia Brasileira em 2010. **Cadernos de Saúde Pública** Rio de Janeiro 29:935-944, 2013.
- BREWER T; PEGGINS J; RALE SJ; PETRAS JM; LEVINE BS; WEINA PJ; SWEARENGEN J; HEIFFER MH; SCHUSTER BG Neurotoxicity in animals due to arteether and artemether. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 88:S33-S36, 1994.
- BULCÃO R; DE FREITAS F; VENTURINI C; DALLEGRAVE E; DURGANTE J; GÖETHEL G; CERSKI CT; ZIELINSKY P; POHLMANN AR; GUTERRES SS; GARCIA SC. Acute and Subchronic Toxicity Evaluation of Poly(epsilon-caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules in Rats. **Toxicological Sciences** 132(1):162-176, 2013.
- CASTELLI F; TOMASONI L; MATTEELLI A. Advances in the treatment of malaria. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases** 4(1):e201-206, 2012.
- CÉSAR I; PIANETTI G. Quantitation of artemether in pharmaceutical raw material and injections by high performance liquid chromatography. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** 45(4):737-742, 2009.
- CHENG Q; KYLE D; GATTON M. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*: A process linked to dormancy? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance** 2:249-255, 2012.
- CHIMANUKA B; GABRIËLS M; DETAEVERNIER M; PLAIZIER-VERCAMMEN J. Preparation of b-artemether liposomes their HPLC–UV evaluation and relevance for clearing recrudescent parasitaemia in *Plasmodium chabaudi* malaria-infected mice. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 28:13–22, 2002.
- CHORNY M; FISHBEIN I; DANENBERG H; GOLOMB G. Study of the drug release mechanism from tyrophostin AG-1295-loaded nanospheres by in situ and external sink methods. **Journal of Controlled Release** 83:401–414, 2002.
- CLARCK R. Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. **Reproductive Toxicology** 28:285–296, 2009
- CLASSEN W; ALTMANN B; GREENER P; SOUPPART C; SKELTON-STROUD P; KRINKE G. Differential effects of orally versus parenterally administered qinghaosu derivative artemether in dogs. **Experimental and Toxicologic Pathology** 51:507-516, 1999.
- COTTRELL J. E; ILLNER P; KITTAY M; STEELE J; LOWENSTEIN J; TURNDORF H. Rebound hypertension after sodium nitroprusside-induced hypotension. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 27:32-36, 1980.



- CRAWLEY J; CHU C; MTOVE G; NOSTE F.. Malaria in children **The Lancet** 375:1468-1481, 2010.
- CUNNINGTON A; BRETSCHER M; NOGARO S; RILEY EM WALTHER M. Comparison of parasite sequestration in uncomplicated and severe childhood *Plasmodium falciparum* malaria. **Journal of Infection** 67(3):220-230, 2013.
- DANESHVAR C; DAVIS T; COX-SINGH J; RAFA'EE M; ZAKARIA S; DIVIS P; SINGH B. Clinical and Laboratory Features of Infection Human *Plasmodium knowlesi*. **Clinical Infectious Diseases** 496:852-860, 2009.
- DASH T; KONKIMALLA V. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release** 158:15–33, 2012.
- DE MORAIS J; DOS SANTOS O; DELICATO T; GONÇALVES RA; ROCHA-FILHO PA. Physicochemical Characterization of Canola Oil/Water Nano-emulsions Obtained by Determination of Required HLB Number and Emulsion Phase Inversion Methods. **Journal of Dispersion Science and Technology** 27(1):115-120, 2006.
- DECUZZI P; GODIN B; TANAKA T; LEE S.-Y; CHIAPPINI C; LIU X; FERRARI M. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. **Journal of Controlled Release** 141:320-327, 2010.
- DONDORP A; DAY N. The treatment of severe malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 101:633-634, 2007.
- DONDORP A; FANELLO C; HENDRIKSEN I; GOMES E; DAY NP; WHITE NJ. Artesunate versus quinine in the treatment of severe *falciparum* malaria in African children (AQUAMAT): an open-label randomised trial. **The Lancet** 376:1647–1657, 2010.
- DONDORP A; KAGER P; VREEKEN J; WHITE NJ. Abnormal Blood Flow and Red Blood Cell. deformability in severe malaria **Parasitology Today** 106(6):229-232, 2000.
- DUNHAM M; MIYA T. A note of a simple apparatus detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of American Pharmaceutical Science** 46:208-109, 1957.
- EL-DAKDOKY M. H. Evaluation of the developmental toxicity of artemether during different phases of rat pregnancy. **Food and Chemical Toxicology** 47:1437–1441, 2009.
- EMA. **ICH Topic E14: note for guidance on the clinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential for non-antiarrhythmic drugs (CHMP/ICH/2/04)**. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. [S.l.]. 2005.

- ERICKSON R; DEFENSOR E; FAIRCHILD D; MIRSALIS JC; STEINMETZ KL. Neurological assessments after treatment with the antimalarial b-arteether in neonatal and adult rats. **NeuroToxicology** 32:432-440, 2011.
- FERMINI B; FOSSA A. The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. **Nature Reiewes Drug Discovery** 2:439-447, 2003.
- FESSI H; PUISIEUX F; DEVISSAGUET J; AMOOURY M; BENITA S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics** 55:R1-R4, 1989.
- FOLARIN O; BUSTAMANTE C; GBOTOSHO G; SOWUNMI A; ZALIS MG; ODUOLA AM; HAPPI CT. In vitro amodiaquine resistance and its association with mutations in pfprt and pfmdr1 genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Nigeria. **Acta Tropica** 120:224-230, 2011.
- FRIDERICIA L. Die Systolendauer im elektrokardiogramm bei normalen menschen und bei herzkrankte **Acta Medica Scandinavica** 53:489, 1920.
- GAY F; ZOUGBÉDÉ S; DILIMABAKA N; REBOLLO A MAZIER D; MORENO A. Cerebral malaria: What is known and what is on research. **Revue Neurologic** 168:239-256, 2012.
- GENOVESE R; NEWMAN D. Understanding artemisinin-induced brainstem neurotoxicity. **Archives of Toxicology** 82:379–385, 2008.
- GERSTL; DUNKLEY S; MUKHTAR; BAKER S; MAIKERE J. Successful introduction of artesunate combination therapy is not enough to fight malaria: results from an adherence study in Sierra Leone. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 104:328-335, 2010.
- GRAF R; MINAMITAKE Y; PERACCHIAM; TORCHILIN V; LANGER R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. **Science**263(5153):1600-1603, 1994.
- GUGULOTHU D; PATHAK S; SURYAVANSHI S; SHARMA S; PATRAVALE V. Self-Microemulsifying Suppository Formulation of  $\beta$ -Artemether. **American Association of Pharmaceutical Scientists** 2010.
- HAAS S; BETTONI C; DE OLIVEIRA L; GUTERRES SS; DALLA COSTA T. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* *in vivo*. **International Journal of Antimicrobial Agents** 34:156–161, 2009.
- HARA Y; KIZAKI K. Antimalarial Drugs Inhibit the Acetylcholine-Receptor-Operated Potassium Current in Atrial Myocytes. **Heart Lung and Circulation** 11:112-116, 2002.

HASTINGS I. How artemisinin-containing combination therapies slow the spread of antimalarial drug resistance. **Trends in Parasitology** 272:67-72, 2011.

HIEN T; DAVIS T; CHUONG L; ILLET KF; SIHN DXT; FARRAR J. Comparative Pharmacokinetics of Intramuscular Artesunate and Artemether in Patients with Severe *Falciparum* Malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48(11):4234–4239, 2004.

HIEN T; DAY N; NGUYEN HP; NGUYEN TH; TRAN TH; PHAM PL; DINH XS; LY VC; HA V; WALLER D; PETO TE; WHITE NJ. A controlled trial of artemether or quinine in Vietnamese adults with severe *falciparum* malaria. **The New England Journal of Medicine** 335(2):76-83, 1996.

HORTELANO M; PÉREZ V; TOMÉ M. Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la malaria. **Anales de Pediatría (Barcelona)** 782(124):e1.e8, 2013.

IDRO R; JENKIS N; NEWTON C. Pathogenesis clinical features and neurological outcome of cerebral malaria. **Lancet Neurol** 4:827-840, 2005.

ISHIHARA T; TAKAHASHI M; HIGAKI M; HIGAKI M; MIZUSHIMA Y; MIZUSHIMA T. Preparation and characterization of a nanoparticulate formulation composed of PEG-PLA and PLA as anti-inflammatory agents. **International Journal of Pharmaceutics** 385:170–175, 2010.

ITALIA J; KUMAR M; CARTER K. Evaluating the potential of polyester nanoparticles for per oral delivery of amphotericin B in treating visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedical Nanotechnology** 84:695-702, 2012.

JALLOW; CASALS-PASCUAL C; ACKERMAN H; (...); KWIATKOWSKI D . Clinical Features of Severe Malaria Associated with Death: A 13-Year Observational Study in The Gambia. **PLOS One** 79:e45-65, 2012.

JOSHI M; PATHAKB S; SHARMAB S; PATRAVALE V. Design and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: Nanoject. **International Journal of Pharmaceutics** 364:119–126,2008.

KHATTAB A; KREMSNER P; MERI S. Complement activation in primiparous women from a malaria endemic area is associated with reduced birthweight. **Placenta** 34:162-167, 2013.

KRISHNAA S; UHLEMANN A; HAYNES R. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. **Drug Resistance Updates** 7:233–244, 2004.

KRUNGKRAI S; YUTHAVONG Y. The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 815:710-714, 1987.

KYOSIIMIRE-LUGEMWA J; NALUNKUMA-KAZIBWE A; MUJUZI G. The Lys-76-Thr mutation in WC/Wand chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene** 96:91-95, 2002.

LALLOO D; SHINGADIA D; PASVOL,. UK malaria treatment guidelines. **Journal of Infection** 54:111-121, 2007.

LEGRAND P; BARRATT G; MOSQUEIRA V; FESSI H; DEVISSAGUET J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. **Pharma Sciences**95:411-418 1999.

LEHANE A; MCDEVITT C; KIRK K; FIDOCK DA. Degrees of chloroquine resistance in *Plasmodium* – Is the redox system involved? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance** 2:47-57, 2012.

LEITE E. A; VILELA J. C; MOSQUEIRA V. C; ANDRADE M. S. Poly-caprolactone nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. **Microscopy and Microanalysis**11:48-51 2005.

LEITE E; GRABE-GUIMARÃES A; GUIMARÃES H; MACHADO-COELHO GL; BARRATT G; MOSQUEIRA VC. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. **Life Sciences** 80:1327–1334, 2007.

LI P; ZHAO L. Developing early formulations: Practice and perspective. **International Journal of Pharmaceutics** 341:1-19, 2007.

LI Q; HICKMAN M. Toxicokinetic and toxicodynamic (TK/TD) evaluation to determine and predict the neurotoxicity of artemisinins. **Toxicology** 279:1-9, 2011.

LIKWELAA J; D’ALESSANDRO U; DONNEN P; WILMET DRAMAIX M.. Clinical aspects and outcome of suspected severe pediatric malaria. **Médecine et maladies infectieuses** 42:315-320, 2012.

LISTER R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology** 92:180-185, 1987.

LIU L; JOHNSON H; COUSENS S; CIBULSKIS R; LI M; MATHERS C; BLACK RE. Global regional and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet** 379:2151-2161, 2012.

LONGO M; ZANONCELLI S; BRUGHERA M; COLOMBO P; WITTLIN S; VENNERSTROM JL; MOEHRLE J; CRAFT JC . Comparative embryotoxicity of different antimalarial peroxides: In vitro study using the rat whole embryo culture model (WEC). **Reproductive Toxicology** 30:583-590, 2010.

LOOAREESUWAN S; WHITE N; CHANTAVANICH P; EDWARDS G; NICHOLL DD; BUNCH C; WARRELL DA. Cardiovascular toxicity and distribution kinetics of intravenous chloroquine. **British Journal of Clinical Pharmacology** 21:31-36, 1986.

LOURENCO C; TEIXEIRA M; SIMÕES S; GASPAR R. Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties. **International Journal of Pharmaceutics** 138:1-12, 1996.

LUIPPOLD G; MAX A; ALBINUS M; OSSWALD H; MÜHLBAUER B. Role of the renin-angiotensin system in the compensation of quinpirole-induced blood pressure decrease. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 367:427-433, 2003.

MACIEL N; REIS P; KATO K; VIDAL A; GUIMARÃES H; FRÉZARD F; SILVA-BARCELLOS N; GRABE-GUIMARÃES A. Reduced cardiovascular alterations of tartar emetic administered in long-circulating liposomes in rats. **Toxicology Letters** 199:234–238, 2010.

MADAN J; PANDEY R; JAIN V; KATARE OP; CHANDRA R; KATYAL A. Poly (ethylene)-glycol conjugated solid lipid nanoparticles of noscapine improve biological half-life brain delivery and efficacy in glioblastoma cells. **Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine** 9:492-503, 2013.

MAITLAND K; MARSH K. Pathophysiology of severe malaria in children **Acta Tropica** 90:131-140, 2004.

MAUDE R; PLEWES K; FAIZ M; LINDEGARDH N; DAY NP; WHITE NJ; DONDORP AM. Does Artesunate Prolong the Electrocardiograph QT Interval in Patients with Severe Malaria? **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene** 80:126–132, 2009.

MAYA S; INDULEKHA S; SUKHITHASRI V; SMITHA KT; NAIR SV; JAYAKUMAR R; BISWAS R. Efficacy of tetracycline encapsulated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles against intracellular infections of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Biological Macromolecules** 51:392–399, 2012.

MCDONALD C; ELPHINSTONE R; KAIN K. The impact of placental malaria on neurodevelopment of exposed infants: a role for the complement system? **Trends in Parasitology** 29:213-219, 2013.

MCGREADY R; LEE S; WILADPHAINGERN J; WHITE NJ; HOSTEN FH. Adverse effects of *falciparum* and *vivax* malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: a population-based study. **Lancet Infectious Diseases** 12:388-396, 2012.

MEDHI B; PATYAR S; RAO R; BYRAV D S P; PRAKASH A . Pharmacokinetic and Toxicological Profile of Artemisinin Compounds: An Update. **Pharmacology** 84:323–332, 2009.

MEMVANGA P; PRÉAT V. Formulation design and *in vivo* antimalarial evaluation of lipid-based drug delivery systems for oral delivery of b-arteether. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 82:112–119, 2012.

MÉNARD D; ANDRIANTSOANIRINA V; KHIMN; DURAND R. Global analysis of *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup> H<sup>+</sup> polymorphism and its usefulness as a marker of *in vitro* resistance to quinine. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance** 3:8-19, 2013.

MESHNICK S. Artemisinin: mechanisms of action resistance and toxicity. **International Journal for Parasitology** 32:1655–1660, 2002.

MESHNICK S; YANG Y; LIMA V; KUYPERS F; KAMCHONWONGPAISAN S; YUTHAVONG Y. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). **Antimicrobial agents and chemotherapy** 375:1108-1114, 1993.

MHARAKURWA; THUMA P; NORRIS D; CHALWE V; CHIPETA J; MUNYATI S; MUTAMBU S; MASON PR. Malaria epidemiology and control in Southern Africa 121:201-206, 2012.

MICHALAKIS Y; RENAUD F. Malaria: Evolution in vector control. **Nature** 462:298-300, 2009.

MILNER JR D; MONTGOMERY J; SEYDEL K. Severe malaria in children and pregnancy: an update and perspective. **Trends in Parasitology** 241(2):590-595, 2008.

MONLUN E; METAYER P; SZWANDT S; NEAU D; LONGY-BOURSIER M; HORTON J; LE BRAS M. Cardiac complications of halofantrine: a prospective study of 20 patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 89:430-433, 1995.

MORA-HUERTAS C; GARRIGUES O; FESSI H; ELAISSARI A. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification–diffusion methods: Comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 80:235–239, 2012.

MORITZ M; GESZKE-MORITZ M. The newest achievements in synthesis immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. **Chemical Engineering Journal** 228:596–613, 2013.

MOSKOVITZ J; HAYES B; MARTINEZ J; MATTU A BRADY WJ. Electrocardiographic implications of the prolonged QT interval. **American Journal of Emergency Medicine** 31:866–871, 2013.

MOSQUEIRA V. C; 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** 222:2967–2979, 2001.

MOSQUEIRA V; LEGRAND P; MORGAT J; VERT M; MYSIKINE E; GREF R; DEVISSAGET J; BARRAT G.. Biodistribution of Long-Circulating PEG-Grafted Nanocapsules in Mice: Effects of PEG Chain Length and Density. **Pharmaceutical Research** 1810:1411-1419, 2001.

MOSQUEIRA V; LEGRAND P; PINTO-ALPHANDARY H; PUISIEUX F; BARRAT G. Poly (D,L-lactide) nanocapsules prepared by solvent displacement process: influence of composition on physico-chemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences** 895:614-626, 2000.

MOSQUEIRA V; LOISEAU P; BORIES C; LEGRAND P; DEVISSAGUET J; BARRAT G. Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in *Plasmodium berghei*-infected mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 484:1222-1228, 2004.

MUSSET L; BOUCHAUD O; MATHERON S; MASSIAS L; LE BRASJ. Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome b codon 268 mutations. **Microbes and Infection** 8:2599-2604, 2006.

NA-BANGCHANG K; BRAY P; WARD S. Study on the biochemical basis of mefloquine resistant *Plasmodium falciparum*. **Experimental Parasitology** 117:141-148, 2007.

NADJM; BEHRENS R. Malaria: An Update. **Infectious Disease Clinics of North America** 26:243-259, 2012.

NICHOLS J; BAE Y. Odyssey of a cancer nanoparticle: From injection site to site of action. **Nano Today** 76:606–618, 2012.

NONTPRASERT A; NOSTEN-BERTRAND M; PUKRITTAYAKAMEE S; VANIJANONTA S; ANGUS BJ; WHITE NJ. . Assessment of the neurotoxicity of parenteral artemisinin derivatives in mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 594:519-522, 1998.

NONTPRASERT A; PUKRITTAYAKAMEE S; NOSTEN-BERTRAND M; VANIJANONTA S; WHITE NJ. Studies of the neurotoxicity of oral artemisinin derivatives in mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 623:409–412, 2000.

NOSTEN F; KUILE F; LUXEMBURGER C; WOODROW C; KYLE DE; CHONGSUPHAJAISIDDHI T; WHITE NJ. . Cardiac effects of antimalarial treatment with halofantrine. **The Lancet** 341:1054-1056, 1993.

NZILA A; CHILENGI,. Modulators of the efficacy and toxicity of drugs in malaria treatment. **Trends in Pharmacological Sciences** 316:277-283, 2010.

OLUMESE P; BJÖRKMAN A; GBADEGESIN R; ADEYEMO A; WALKER O. Comparative efficacy of intramuscular artemether and intravenous quinine in Nigerian children with cerebral malaria. **Acta Tropica** 73:231–236, 1999.

OSONUGA OA; OSOUGA AA; OSOUGA IO; OSOUGA A; DERKYI KWARTENG L . Prevalence of hypoglycemia among severe malaria children in a rural African populatio **Asian Pacific Journal of Tropical Disease** 84:192-194, 2011.

PATIL S; SURYAVANSHI S; PATHAK S; SHARMA S; PATRAVALE V. Evaluation of novel lipid based formulation of b-Artemether and Lumefantrine in murine malaria model. **International Journal of Pharmaceutics** 455(1-2):229-234, 2013.

PAULIS L; GEELEN T; KUHLMANN M; COOLEN BF; SCHÄFERS M; NICOLAY K; STRIJKERS GJ. Distribution of lipid-based nanoparticles to infarcted myocardium with potential application for MRI-monitored drug delivery. **Journal of Controlled Release** 162:276–285, 2012.

PEREIRA M; MOSQUEIRA V; CARMO V; FERRARI C; REIS E; RAMALDES G; CARDOSO V. Biodistribution study and identification of inflammatory sites using nanocapsules labeled with 99mTc HMPAO. **Nuclear Medicine Communications** 30:749-755,2009.

PETERS W; LI Z. L; ROBINSON B; WARHURST D. C. The chemotherapy of rodent malaria 80:483-489, 1986.

PODDUTURI V; MAGAÑA I; O'NEAL D; DEROSA PA. Simulation of transport and extravasation of nanoparticles in tumors which exhibit enhanced permeability and retention effect. **Computer Methods and Programs in Biomedicine** 2013.

RAO J; GECKELER K. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science** 36:887–913, 2011.



- REIS C; NEUFELD R; RIBEIRO A; VEIGA F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine** 2:8-21, 2006.
- REYBURN H; MBATIA R; DRAKELEY C; BRUCE J; CARNEIRO I; OLOMI R; COX J; NKYA WM; LEMNGE M; GREENWOOD BM; RILEY EM. Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe *Plasmodium falciparum* Malaria. **Journal of American Medical Association** 293(12):1461-1470, 2005.
- REYNOLDS J; GERETTI E; HENDRIKS B; LEE H; NIYIKIZA C; AGRESTA SV; WICKHAM TJ. HER2-targeted liposomal doxorubicin displays enhanced anti-tumorigenic effects without associated cardiotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology** 212:1-10. 2012.
- CONAMFA. **Board on Environmental Studies and Toxicology Environmental Neurotoxicology**. The National Academies Press. [S.l.]:Disponível em: <http://www.nap.edu/openbook/0309045312/>. 1992.
- RUDZIK A; HESTER J; TANG A; STAW R; FRIIS W. **The Benzodiazepines**. New York: Raven Press 285-297,. 1973.
- SANTOS-MAGALHÃES N; MOSQUEIRA V. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews** 62:560-575, 2010.
- SCHAFFAZICK S. R; GUTERRES S. S; FREITAS L. L; POHLMANN A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova** 265:726-737, 2003.
- SHIBATA K; HIRASAWA A; FOGLAR R; OGAWA S; TSUJIMOTO G. Effects of Quinidine and Verapamil on Human Cardiovascular  $\alpha$ 1-Adrenoceptors. **Circulation** 97:1227-1230, 1998.
- SILVAH; SALLES E; PANATIERI R; BOSCARDIN S; RODRÍGUEZ-MÁLAGA S; ALVAREZJ; D'IMPÉRIO LIMA M. IFN- $\gamma$ -induced priming maintains long-term strain-transcending immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. **Journal of Immunology** 191(10):5160-5169, 2013.
- SINHA B; MUKHERJEE B; PATNAIK G. Poly-lactide-co-glycolide nanoparticles containing voriconazole for pulmonary delivery: in vitro and *in vivo* study. **Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine** 9:94-104, 2013.
- SOSNIK A; AMIJI M. Nanotechnology solutions for infectious diseases in developing nations. **Advanced Drug Delivery Reviews** 62:375-377, 2010.

SUN G; LIN X; HONG Y; FENG Y; RUAN K; XU D . PEGylation for drug delivery to ischemic myocardium: Pharmacokinetics and cardiac distribution of poly(ethylene glycol)s in mice with normal and ischemic myocardium. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 46:545–552, 2012.

TOOVEY S. Mefloquine neurotoxicity: A literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease** 7:2-6, 2007.

TOUZE J; HENO P; FOURCADE F; DEHARO J; THOMAS G; BOHAN S; PAULE P; RIVIERE P; KOUASSI E; BUGUET A. The effects of antimalarial drugs on ventricular repolarization. **The American journal of tropical medicine and hygiene** 67:54-60, 2002.

TRAEBERT M; DUMOTIER B. Antimalarial drugs: QT prolongation and cardiac arrhythmias. **Expert Opinion on Drug Safety** 43:421-431, 2005.

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

TURNER R. **Screening procedures in pharmacology**. New York: Academic Press 99 p. 1972.

ULBRICH W; LAMPRECHT A. Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. **Journal of The Royal Society Interface** 7:S55–S66, 2010.

VALE-CARDOSO A. S; GUIMARÃES H. N. The effect of 50/60 Hz notch filter application on human and rat ECG recordings. **Physiological Measurement** 31:45-58, 2010.

VAN AGTMAEL M; CHENG-QI S; QING J; MULL R; VAN BOXTEL CJ. Multiple dose pharmacokinetics of artemether in Chinese patients with uncomplicated *falciparum* malaria. **International Journal of Antimicrobial Agents** 12:151–158, 1999.

VAN DEN STEEN P; DEROOST K; DECKERS J; VAN HERCK E; STRUYF S; OPDENAKKER G . Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Trends in Parasitology** 29:346-358, 2013.

VIDAL AT; GUIMARÃES HN; DE PAULA DCC; FREZARD F; SILVA-BARCELLOS NM; GRABE-GUIMARÃES A. Prolonged cardioprotective effect of pyridostigmine encapsulated in liposomes. **Life Sciences** 86(2):17-23, 2010.

WANG G; YU B; WU Y; HUANG B; YUAN Y; LIU CS. Controlled preparation and antitumor efficacy of vitamin E TPGS-functionalized PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel. **International Journal of Pharmaceutics** 446:24-33, 2013.

WHITE N. Cardiotoxicity of antimalarial drugs. **The Lancet Infectious Disease** 7:549-558, 2007.

WHITE N; PUKRITTAYAKAMEE S; HIEN T; FAIZ M; MOKUOLU O; DONDORP A. Malaria. **The Lancet** 383:723–735, 2014.

WILSON C; VOLKMAN S; THAITHONG S; MARTIN RK; KYLE DE; MILHOUS WK; WIRTH DF. Amplification of *pfmdrl* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. **Molecular and Biochemical Parasitology** 57:151-160, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of malaria**. Geneva. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2012**. [S.l.]:195. 2012. [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/report/en/index.html](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.html).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Management of severe malaria – A practical handbook**. Geneva 83p. 2013.

ZAKERI S; FARAHANI M; AFSHARPAD M; SALEHI M; RAEISI A; DJADID ND. High prevalence of the 437G mutation associated with sulfadoxine resistance among *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Iran three years after the introduction of sulfadoxine–pyrimethamine. **International Journal of Infectious Disease** 14S:e123–e128, 2010.

## 12. APÊNDICES

### APÊNDICE A

#### Publicações relacionadas ao trabalho

##### Artigo submetido

Polymeric nanocarrier reduces *in vivo* cardiovascular toxicity of artemether and maintains its antimalarial efficacy. Revista *Nanotoxicology*.

##### Artigo em preparação

Manuscrito abordando a caracterização físico-química das partículas e atividade antimalárica *in vivo*, por diferentes vias e doses e neurotoxicidade.

#### Resumos apresentados em eventos científicos

**VIDAL-DINIZ, A.T.**, GUIMARAES, H. N., GRABE-GUIMARAES, A., MOSQUEIRA, V. C. F. *ANTIMALARIAL ACTIVITY AND CARDIOTOXICITY REDUCTION INDUCED BY ARTHEMETER ENTRAPPED IN NANOCAPSULES DEVICES* In: I Simpósio do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFOP, 2013, Ouro Preto.

**VIDAL-DINIZ, A.T.**, GUIMARAES, H. N., GRABE-GUIMARAES, A., MOSQUEIRA, V. C. F. *CARDIOTOXICITY REDUCTION INDUCED BY ARTHEMETER ENTRAPPED IN NANOCAPSULES DEVICES* In: 9th International Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP, 2013, Ribeirão Preto.

**VIDAL-DINIZ, A.T.**, BORGES, R. P., GUIMARAES, H. N., GRABE-GUIMARAES, A., MOSQUEIRA, V. C. F. *NANOENCAPSULAÇÃO E REDUÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE DO ARTEMÉTER* In: XXI Seminário de Iniciação Científica e Científica da UFOP, 2013, Ouro Preto.

**VIDAL-DINIZ, A.T.**, Guimarães, Homero N., GRABE-GUIMARAES, A., MOSQUEIRA, V. *REDUCED CARDIOVASCULAR ALTERATIONS OF ARTHEMETER LOADED IN PCL NANOCAPSULES* In: 44th Brazilian Congress Of Pharmacology And Experimental Therapeutics, 2011

## Apêndice B

**Tabela 8:** Valores absolutos dos parâmetros do ECG e de PA antes e após administração IV de dose única de arteméter

Parâmetro	Tempo (min)	Arteméter 40 mg/kg			Arteméter 80 mg/kg	
		Controle	Livre	Nanocápsulas	Livre	Nanocápsulas
<b>QT (ms)</b>	0	67,3 ± 0,87	65,7 ± 2,17	62,7 ± 2,06	66,7 ± 2,45	62,6 ± 0,97
	1	71,8 ± 0,86	71,1 ± 2,85	64,0 ± 1,99	84,8 ± 3,43*#	71,0 ± 1,08
	5	68,1 ± 0,85	78,5 ± 2,66*#	67,6 ± 1,71	76,7 ± 3,32*#	69,2 ± 2,56
	10	67,7 ± 0,57	75,7 ± 2,79*#	66,7 ± 1,87	72,5 ± 3,03*#	65,6 ± 1,73
	15	67,7 ± 0,79	74,1 ± 3,29*#	65,9 ± 1,60	69,1 ± 2,84	64,8 ± 1,91
	30	67,9 ± 1,55	69,5 ± 3,76	64,3 ± 2,34	67,8 ± 2,49	64,4 ± 1,72
	60	68,0 ± 1,69	69,4 ± 3,52	63,8 ± 2,45	69,5 ± 2,77	64,2 ± 1,95
	90	68,4 ± 1,27	67,3 ± 2,79	62,1 ± 1,98	68,2 ± 2,69	63,2 ± 1,36
	120	66,6 ± 1,64	67,8 ± 3,33	62,7 ± 2,06	67,5 ± 1,98	63,6 ± 1,51
<b>PR (ms)</b>	0	47,7 ± 1,37	47,8 ± 1,12	54,5 ± 1,94	45,7 ± 2,23	45,2 ± 1,73
	1	50,1 ± 1,52	48,1 ± 1,06	54,5 ± 1,82	50,1 ± 2,60	47,3 ± 2,30
	5	48,3 ± 1,55	48,0 ± 0,89	53,7 ± 2,22	46,3 ± 2,16	46,4 ± 1,94
	10	48,2 ± 1,58	48,5 ± 0,78	54,4 ± 2,13	46,2 ± 2,07	46,4 ± 1,86
	15	47,6 ± 1,32	48,3 ± 0,99	54,7 ± 2,17	45,9 ± 1,99	46,5 ± 1,86
	30	47,6 ± 1,66	40,4 ± 8,13	54,9 ± 1,72	39,7 ± 8,15	45,7 ± 1,80
	60	47,5 ± 1,01	47,4 ± 1,11	53,3 ± 1,39	45,5 ± 2,15	45,6 ± 1,72
	90	48,1 ± 1,04	48,0 ± 1,18	51,3 ± 2,59	47,0 ± 2,12	46,1 ± 1,95
	120	48,1 ± 1,36	48,8 ± 1,69	54,5 ± 1,94	47,0 ± 2,02	46,1 ± 1,79

<b>QRS (ms)</b>	0	23,2 ± 1,12	21,6 ± 0,36	24,7 ± 0,76	22,1 ± 0,54	20,6 ± 1,04
	1	24,2 ± 1,25	21,9 ± 0,31	24,7 ± 0,52	23,4 ± 0,48	21,6 ± 1,02
	5	23,4 ± 1,23	21,8 ± 0,28	24,6 ± 0,43	22,5 ± 0,53	21,2 ± 1,00
	10	23,6 ± 1,18	21,5 ± 0,27	24,9 ± 0,62	22,4 ± 0,49	21,3 ± 0,95
	15	23,2 ± 1,17	21,8 ± 0,24	25,1 ± 0,51	22,0 ± 0,51	21,5 ± 0,96
	30	22,8 ± 1,27	21,7 ± 0,34	24,7 ± 0,55	22,3 ± 0,49	21,2 ± 0,94
	60	23,4 ± 1,46	21,6 ± 0,35	25,2 ± 0,53	21,6 ± 0,77	21,1 ± 1,00
	90	23,4 ± 1,34	21,8 ± 0,31	25,6 ± 0,93	22,1 ± 0,68	21,2 ± 0,96
	120	23,3 ± 1,01	21,7 ± 1,33	24,7 ± 0,76	22,3 ± 0,60	21,0 ± 0,93
<b>PAS (mmHg)</b>	0	127,1 ± 2,44	127,4 ± 2,68	129,1 ± 2,56	128,9 ± 1,85	129,8 ± 2,01
	1	138,7 ± 3,64	107,2 ± 3,68*#	118,5 ± 3,88	75,7 ± 5,24*#	114,7 ± 3,25*
	5	130,4 ± 2,41	105,1 ± 3,16*#	118,0 ± 4,14	98,5 ± 9,00*#	127,4 ± 6,95*
	10	128,1 ± 3,43	105,0 ± 3,99*#	119,7 ± 2,24	94,1 ± 2,52*#	126,2 ± 6,41
	15	126,1 ± 2,66	107,3 ± 4,64*#	125,3 ± 3,94	96,6 ± 3,24*#	121,7 ± 4,38
	30	123,3 ± 7,08	114,7 ± 4,00	128,2 ± 3,81	129,2 ± 5,03	128,6 ± 3,48
	60	138,1 ± 6,58	122,2 ± 7,75	129,5 ± 1,86	130,4 ± 2,54	138,2 ± 3,11
	90	127,9 ± 8,40	130,3 ± 3,69	123,3 ± 2,35	135,5 ± 4,25	133,4 ± 1,90
	120	127,9 ± 5,81	131,7 ± 4,34	129,1 ± 2,56	127,5 ± 3,96	128,4 ± 1,45

<b>PAD (mmHg)</b>	0	87,1 ± 1,66	87,4 ± 2,40	85,6 ± 2,75	88,3 ± 1,48	83,4 ± 1,41
	1	92,8 ± 2,26	74,3 ± 3,09	79,0 ± 2,96	50,6 ± 4,10*#	75,5 ± 2,53*
	5	87,7 ± 2,36	67,9 ± 1,65*#	86,0 ± 2,83	55,1 ± 8,25*#	79,6 ± 4,33*
	10	87,1 ± 2,32	70,0 ± 3,45*#	85,9 ± 2,77	60,0 ± 2,12*#	78,4 ± 4,15*
	15	85,8 ± 1,68	71,3 ± 3,79	86,8 ± 2,18	60,7 ± 2,31*#	78,8 ± 2,16
	30	85,9 ± 3,83	82,5 ± 3,70	86,5 ± 3,57	85,8 ± 3,52	83,1 ± 1,40
	60	88,4 ± 3,92	87,1 ± 5,28	82,8 ± 3,27	88,6 ± 2,25	86,5 ± 2,47
	90	87,2 ± 3,88	89,6 ± 2,40	83,9 ± 3,35	88,2 ± 1,55	88,0 ± 1,74
	120	84,0 ± 3,99	89,5 ± 1,65	85,6 ± 2,75	86,2 ± 2,14	82,7 ± 1,47
<b>FC</b>	0	384,9 ± 15,6	352,8 ± 11,30	360,3 ± 21,77	374,3 ± 10,65	392,1 ± 7,53
	1	378,9 ± 16,4	338,9 ± 8,76*#	376,1 ± 24,17*	298,2 ± 10,08*#	353,9 ± 5,61
	5	375,4 ± 17,3	306,3 ± 26,28*#	376,4 ± 19,26*	262,4 ± 8,88*#	371,3 ± 10,54
	10	373,5 ± 16,2	314,4 ± 21,51*#	374,5 ± 19,17	260,3 ± 8,14*#	378,6 ± 11,56
	15	375,8 ± 16,7	323,1 ± 21,11	376,0 ± 18,27	296,7 ± 8,91*#	385,6 ± 8,72
	30	371,3 ± 14,6	341,7 ± 11,13	357,2 ± 19,22	359,6 ± 8,64	389,1 ± 13,82
	60	382,8 ± 18,1	351,1 ± 11,51	358,1 ± 20,19	365,5 ± 12,19	392,0 ± 12,91
	90	377,5 ± 17,4	353,4 ± 12,06	354,7 ± 22,34	361,8 ± 8,18	393,5 ± 11,93
	120	377,2 ± 17,4	350,1 ± 13,27	360,3 ± 21,77	362,9 ± 8,24	395,1 ± 11,59

<b>QTc (ms)</b>	0	125,8 ± 2,50	118,0 ± 3,08	119,3 ± 3,03	122,5 ± 3,89	117,6 ± 1,80
	1	132,3 ± 1,17	126,4 ± 4,43	120,8 ± 3,70	144,3 ± 4,81	128,1 ± 1,56
	5	125,6 ± 2,57	134,1 ± 4,28	118,5 ± 2,71	137,0 ± 5,74	126,9 ± 4,78
	10	124,6 ± 2,51	131,0 ± 4,81	116,8 ± 2,93	131,5 ± 4,78	121,1 ± 3,34
	15	124,8 ± 2,60	129,3 ± 5,36	115,6 ± 2,50	126,1 ± 4,46	120,4 ± 3,45
	30	126,5 ± 4,52	123,8 ± 5,98	112,7 ± 3,26	122,9 ± 3,70	120,0 ± 2,50
	60	126,5 ± 4,33	124,8 ± 5,85	112,0 ± 3,47	126,7 ± 4,76	119,9 ± 3,01
	90	127,5 ± 4,77	120,0 ± 3,97	118,4 ± 2,21	122,5 ± 3,67	118,2 ± 2,15
	120	125,3 ± 3,20	121,6 ± 4,72	119,3 ± 3,03	122,9 ± 2,97	119,2 ± 2,42

Os valores representam a média ± EPM. (n = 6/grupo). \* diferença significativa em relação ao grupo controle; #diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA



**Tabela 9:** Valores absolutos dos parâmetros do ECG e de PA antes e após administração IV de quatro doses de arteméter

Parâmetro	Tempo (min)	Arteméter 20 mg/kg		
		Controle	Livre	Nanocápsulas
QT (ms)	0	60,3 ± 1,68	66,6 ± 0,92	67,9 ± 1,25
	48h	63,6 ± 1,95	81,6 ± 1,07*#	71,9 ± 3,89
PR (ms)	0	49,9 ± 2,04	49,8 ± 1,05	51,7 ± 1,63
	48h	47,4 ± 1,36	49,2 ± 0,46	48,2 ± 1,78
QRS (ms)	0	20,6 ± 0,28	21,8 ± 0,59	21,5 ± 0,29
	48h	20,4 ± 0,25	23,1 ± 0,59	22,1 ± 0,35
PAS (mmHg)	0	124,3 ± 2,10	119,9 ± 4,14	128,4 ± 3,07
	48h	130,0 ± 4,49	151,7 ± 6,41*#	123,3 ± 2,17
PAD (mmHg)	0	86,5 ± 2,44	87,5 ± 2,05	87,6 ± 1,98
	48h	90,8 ± 2,97	120,4 ± 4,19*#	83,0 ± 3,02
FC (bpm)	0	334,2 ± 27,19	346,2 ± 25,53	334,3 ± 24,15
	48h	363,6 ± 31,19	441,8 ± 24,07*#	339,9 ± 16,79
QTc (ms)	0	106,8 ± 3,23	112,8 ± 1,65	120,3 ± 4,86
	48h	115,9 ± 3,52	149,6 ± 3,87*#	127,6 ± 5,51

Os valores representam a média ± EPM. (n = 6/grupo). \* diferença significativa em relação ao grupo controle; # diferença significativa em relação ao grupo nanocápsulas P < 0,05 – ANOVA

