

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Alessandra Melise Golke

**ANÁLISE DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE**  
**ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR TRATADOS COM**  
**NANOCÁPSULAS CONTENDO QUININA**

**Dissertação de Mestrado**

**URUGUAIANA**

**2015**

**ALESSANDRA MELISE GOLKE**

**ANÁLISE DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E  
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR TRATADOS COM  
NANOCÁPSULAS CONTENDO QUININA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Fundação Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanusa Manfredini

**Uruguaiiana  
2015**

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

G626a Golke, Alessandra Melise  
ANÁLISE DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE  
ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR TRATADOS COM NANOCÁPSULAS  
CONTENDO QUININA / Alessandra Melise Golke.  
68 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2015.

"Orientação: Vanusa Manfredini".

1. Malária . 2. Quinina. 3. Nanocápsulas. 4. Estresse  
oxidativo. 5. Parâmetros bioquímicos e hematológicos. I.  
Título.

**ALESSANDRA MELISE GOLKE**

**ANÁLISE DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR TRATADOS COM NANOCÁPSULAS CONTENDO QUININA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Fundação Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanusa Manfredini

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 27 de julho de 2015.

Banca examinadora:



---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Vanusa Manfredini

Orientador

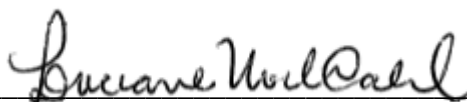
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UNIPAMPA



---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UNIPAMPA



---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Luciane Noal Calil

Faculdade de Farmácia - UFRGS

Aos meus pais, Didmar e Irene, por todo incentivo e apoio permanente, pelo amor incondicional que é a fonte da minha energia e dedicação.

## AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus, acredito que Ele escreva nossa história, com altos e baixos, que nos fazem chegar ao ponto onde estamos. Agradeço por Ele ser meu suporte em todas as horas, por guiar a mim e aos que eu amo e por nos enviar forças nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, pois sem eles eu não estaria aqui. Muito obrigada por todo amor que sempre recebi, pelo constante incentivo em continuar estudando, por serem minha fortaleza! Muito obrigada pelo apoio, por me passarem tranquilidade, pelas visitas, pelos abraços. A vocês, minha gratidão por tudo que fizeram por mim e pela mana! “Quem dera que por um descuido Deus os fizessem eternos...” AMO VOCÊS!

Aos meus avós, meus segundos pais, de uma forma especial àquele que lutou pela vida e nos deixou no decorrer desta caminhada, agradeço pelo incentivo em buscar mais conhecimento e por compreenderem a ausência dessa “netinha” em tantos momentos. Aos meus tios e primos, pelo carinho e apoio que sempre recebi. Dankeschön!!

A minha irmã Ciovana, que sempre esteve do meu lado, incentivando, e também estava perto daqueles que amo, quando estes precisavam e eu estava longe. Te amo!

Ao meu noivo, namorado e amigo Tiones por todo incentivo, carinho e amor. Obrigada pela compreensão nos meus momentos de ausência, por ficar do meu lado e fazer companhia enquanto eu dissertava, muitas vezes tomando um mate. Agradeço profundamente tua paciência com as minhas crises de ansiedade, por me acalmar e incentivar, principalmente nas tantas vezes que eu duvidava que chegaria aqui. Te amo!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanusa Manfredini, minha orientadora, por todo o apoio e dedicação, bem como pela confiança na realização deste trabalho. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e pela amizade!

As colegas do Grupo de Estudos em Estresse Oxidativo (GESTOX) pela ajuda durante a realização dos experimentos bem como por todo apoio durante esta caminhada. Obrigada a Patrícia de Oliveira, colega de mestrado, pela parceria nos experimentos. Agradeço também a amizade construída no decorrer desse período!

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Haas, a Luana Michels e ao Grupo de Pesquisa em Nanobiotecnologia e Nanotoxicologia pela colaboração na realização deste projeto.

Aos amigos, de perto ou de longe, pelo incentivo e apoio! De forma especial, agradeço a Angélica Güllich e Denise Feksa, fiéis amigas e suportes de tantas horas. À você, Guega, muito obrigada por tantas vezes ser “minha mão”, por tua paciência com minhas nóias e

crises, por tua sinceridade, por tua disponibilidade, por tuas correções e por sempre dizer “vai dar tudo certo”. Obrigada por tudo, do fundo do meu coração! Seguimos em frente!

Aos professores do PPGBIOQ pelos ensinamentos.

Aos membros da banca, as Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cheila Denise Ottonelli Stopiglia e Luciane Noal Calil, pela disponibilidade e contribuição científica na avaliação deste trabalho.

À Fundação Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBIOQ) pela oportunidade.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído com sucesso, os meus sinceros agradecimentos.

*“Sua vida é mais importante do que todo o ouro do mundo. Mais bela que as estrelas: obra-prima do Autor da vida. Apesar dos seus defeitos, você não é um número na multidão. Ninguém é igual a você no palco da vida. Você é um ser humano insubstituível. Jamais desista das pessoas que ama. Jamais desista de ser feliz. Lute sempre pelos seus sonhos. Seja profundamente apaixonado pela vida. Pois a vida é um espetáculo imperdível.”*

Augusto Cury



## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Fundação Universidade Federal do Pampa

### **ANÁLISE DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR TRATADOS COM NANOCÁPSULAS CONTENDO QUININA**

Autora: Alessandra Melise Golke  
Orientadora: Vanusa Manfredini  
Local e Data da Defesa: Uruguaiana, 27 de julho de 2015.

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo que o *P. falciparum* é responsável pela maioria das mortes. O quadro clínico dessa parasitose inclui febre, calafrios, cefaleia, vômito, diarreia, anemia, coma e morte. O mais antigo antimalárico é a quinina, um alcaloide obtido a partir da casca da árvore de espécies de *Cinchona*. Devido a sua toxicidade e ao surgimento de novos fármacos, seu uso foi limitado, porém voltou a ter maior importância em virtude da resistência do plasmódio a outros medicamentos. Uma alternativa para minimizar a toxicidade é o desenvolvimento de uma forma farmacêutica capaz de tornar esse fármaco menos tóxico, como os sistemas nanoencapsulados. O presente trabalho teve como objetivo verificar parâmetros hematológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo em ratos Wistar tratados com nanocápsulas contendo quinina. Os animais foram divididos em quatro grupos, os quais receberam os seguintes tratamentos: controle (solução salina - NaCl 0,9%); quinina livre (75mg/Kg/dia); nanocápsulas brancas; nanocápsulas contendo quinina (75mg/Kg/dia). As formulações foram administradas três vezes ao dia por via intraperitoneal durante sete dias consecutivos. No oitavo dia os ratos foram eutanasiados e o sangue venoso foi coletado para análises posteriores. O tratamento com nanocápsulas contendo quinina foi capaz de manter os níveis hematológicos dentro dos limites normais. Os marcadores das funções cardíaca, hepática e renal apresentaram níveis sanguíneos significativamente diminuídos no grupo tratado com nanocápsulas contendo quinina em relação ao grupo tratado com quinina livre. As enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase apresentaram uma atividade significativamente mais elevada no grupo tratado com nanocápsulas contendo quinina comparado ao grupo quinina livre, assim como o nível de glutathione reduzida. A quinina foi capaz de induzir dano lipídico, proteico e genético, e sua nanoencapsulação atenuou o dano. Assim, estes resultados demonstraram que a nanoencapsulação pode ser eficaz na redução dos efeitos adversos causados pela quinina, tornando este medicamento mais seguro para o tratamento da malária.

**Palavras-chave:** malária, quinina, nanocápsulas, hematologia, bioquímica, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Program of Post-Graduation in Biochemistry  
Federal University of Pampa

### **ANALYSIS OF HEMATOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN RATS WISTAR TREATED WITH NANOCAPSULES COINTAINING QUININE**

Author: Alessandra Melise Golke

Advisor: Vanusa Manfredini

Date and Place of Defense: Uruguaiana, July 27, 2015.

Malaria is caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, which *P. falciparum* is responsible for the most deaths. The clinical picture this parasitosis include fever, chills, headache, vomit, diarrhea, anaemia, coma and death. The oldest antimalarial is quinine, an alkaloid obtained bark species *Cinchona*. Due to their toxicity and the appearance of new drugs, its use was limited, but again had greater importance because to *Plasmodium* resistance to other drugs. An alternative to minimize toxicity is the development of a pharmaceutical form capable of less toxic drug, as nanoencapsulated systems. This present work had objective to verify hematological, biochemical and oxidative stress parameters in rats Wistar treated with nanocapsules containing quinine. The animals were divided into four groups which received the following treatments: control (solution saline - 0.9% NaCl); free quinine (75mg/kg/day); blank nanocapsules; quinine-loaded nanocapsules (75 mg/kg/day). The formulations were administered three times a day intraperitoneally during seven consecutive days. On the eighth day the rats were euthanized and venous blood was collected for followed analysis. Treatment with quinine-loaded nanocapsules was able to maintain the blood levels with normal limits. The markers of cardiac, hepatic and renal function showed blood levels significantly decreased in the group treated with quinine-loaded nanocapsules compared to the group treated with free quinine. The antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase were significantly higher activity in the group treated with quinine-loaded nanocapsules compared to free quinine group, as well as the level of reduced glutathione. Quinine was able to induce lipid, protein and genetic damage, and its nanoencapsulation attenuate the damage. Then, these results demonstrate that nanoencapsulation can be effective in reducing the adverse effects caused by quinine, making this a safer medicament for treatment malaria.

**Keywords:** malaria, quinine, nanocapsules, hematology, biochemistry, oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - População (%) em área de risco em 2013.....	18
<b>Figura 2</b> - Número de casos de malária registrados no Brasil.....	19
<b>Figura 3</b> - Ciclo de vida do parasita da malária.....	21
<b>Figura 4</b> - Estrutura química da quinina.....	26
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	28
<b>Figura 6</b> - Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.....	32

## MANUSCRITO

<b>Figure 1</b> - Biochemical parameters in Wistar rats treated with nanocapsules containing quinine.....	44
<b>Figure 2</b> - Antioxidant defenses in Wistar rats treated with nanocapsules containing quinine.....	45
<b>Figure 3</b> - Markers of oxidative damage in Wistar rats treated with nanocapsules containing quinine.....	46

**LISTA DE TABELAS**

## MANUSCRITO

<b>Table 1</b> - Physico-chemical characterization of nanocapsules.....	42
<b>Table 2</b> - Hematological parameters in Wistar rats treated with nanocapsules containing quinine.....	42

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

<b><math>^1\text{O}_2</math></b>	-	Oxigênio Singleto
<b>CAT</b>	-	Catalase
<b>CDC</b>	-	Centers for Disease Control and Prevention
<b>DNA</b>	-	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EO</b>	-	Estresse Oxidativo
<b>ER</b>	-	Espécies Reativas
<b>ERN</b>	-	Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>ERO</b>	-	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>GPx</b>	-	Glutaciona Peroxidase
<b>GR</b>	-	Glutaciona Redutase
<b>GSH</b>	-	Glutaciona Reduzida
<b>GSSG</b>	-	Glutaciona Oxidada
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	-	Peróxido de Hidrogênio
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	-	Interferon gama
<b>MC</b>	-	Malária Cerebral
<b>MDA</b>	-	Malondialdeído
<b>NC</b>	-	Nanocápsulas
<b>NO<math>\cdot</math></b>	-	Radical Óxido Nítrico
<b>NP</b>	-	Nanopartículas
<b>O<sub>3</sub></b>	-	Ozônio
<b>O<sub>2</sub><math>\cdot^-</math></b>	-	Radical Ânion Superóxido
<b>OH<math>\cdot</math></b>	-	Radical Hidroxila
<b>ONOO<math>^-</math></b>	-	Ânion Peroxinitrito
<b>RL</b>	-	Radical Livre
<b>RO<sub>2</sub><math>\cdot</math></b>	-	Radical Peroxila
<b>SOD</b>	-	Superóxido Dismutase
<b>TBA</b>	-	Ácido Tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	-	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	-	Terapias Combinadas à base de Artemisinina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	Fator de necrose tumoral alfa

**WHO** - World Health Organization

## SUMÁRIO

PARTE I .....	15
1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 Malária .....	17
2.1.1 Epidemiologia .....	18
2.1.2 Agente Etiológico e Vetor .....	19
2.1.3 Ciclo do Parasita .....	20
2.1.4 Sintomatologia .....	22
2.1.5 Diagnóstico .....	23
2.1.6 Profilaxia e Tratamento .....	24
2.1.6.1 Quinina .....	25
2.2 Sistemas Carreadores de Fármacos .....	28
2.2.1 Sistemas Nanoparticulados Contendo Fármacos Antimaláricos.....	29
2.3 Estresse Oxidativo .....	30
2.3.1 Radical Livre e Espécies Reativas .....	30
2.3.2 Dano Oxidativo.....	31
2.3.3 Defesas Antioxidantes.....	32
2.3.4 Malária e Estresse Oxidativo.....	33
3 OBJETIVOS .....	34
3.1 Objetivo geral .....	34
3.2 Objetivos específicos .....	34
PARTE II .....	35
MANUSCRITO .....	35
Abstract .....	37
1 Introduction .....	38
2 Material and methods .....	39
3 Results .....	41
4 Discussion .....	47
5 Conclusion .....	50
Conflicts of interest statement .....	51

References .....	51
PARTE III .....	57
4 CONCLUSÃO .....	57
5 PERSPECTIVAS .....	58
REFERÊNCIAS .....	59
ANEXOS .....	68
Anexo A - Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA .....	68



## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi dividida em três partes principais. Na **parte I** encontram-se a **INTRODUÇÃO**, a **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e os **OBJETIVOS**. Os resultados que fazem parte desta dissertação, assim como as seções materiais e métodos, resultados, discussão e referências, estão apresentados sob a forma de manuscrito, no item **MANUSCRITO**, que está na **parte II** deste trabalho. O item **CONCLUSÃO**, que apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados mostrados nos manuscritos deste trabalho, encontra-se na **parte III** desta dissertação, assim como o item **PERSPECTIVAS**, onde estão expostos os possíveis estudos para dar continuidade a este trabalho, e o item **REFERÊNCIAS**, que se refere somente às citações que aparecem nos itens introdução e revisão bibliográfica desta dissertação.

## PARTE I

### 1 INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias são doenças infecciosas que atingem parte da população mundial. Elas estão entre as principais causas de morte e podem limitar o desenvolvimento de muitos países (FRANÇA et al., 2008).

A malária é uma das principais parasitoses, e a maioria dos casos e mortes ocorre na África, principalmente em crianças. Protozoários do gênero *Plasmodium* são os responsáveis por causar esta enfermidade e cinco espécies infectam os seres humanos, sendo elas o *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium falciparum* e, descoberto recentemente, o *Plasmodium knowlesi*. A transmissão do parasita ocorre pela picada da fêmea infectada do mosquito *Anopheles*, ainda que raramente possa ocorrer por outros meios, como na transfusão de sangue ou utilização de agulhas contaminadas (DANESHVAR et al., 2009; BRASIL, 2010b; SADANAND, 2010; WHITE et al., 2014).

O ciclo de vida do plasmódio é complexo e é dividido em duas etapas, sendo uma no mosquito e outra no homem. Neste, ocorre inicialmente uma fase no fígado, seguida de um estágio no eritrócito, o qual é responsável pelo surgimento dos sintomas clínicos e patológicos da malária (GARCIA, 2010; MANDAL, 2014).

As manifestações iniciais da malária incluem febre, mal-estar, dor de cabeça, dor muscular, fadiga, sendo que o paciente pode apresentar náuseas e vômitos. O quadro pode evoluir e causar a disfunção de algum órgão, podendo ocorrer anemia, hipoglicemia, edema pulmonar, coma, entre outros (SADANAND, 2010; WHO, 2013b; WHITE et al., 2014).

Entre os fatores que contribuem para combater a malária está o controle do vetor e o uso de inseticidas, bem como um cuidado com a higiene da localidade. Além disso, existem vários fármacos antimaláricos disponíveis e a aplicação correta da terapia, que atualmente envolve as terapias combinadas à base de artemisinina (TCA), proporciona um tratamento mais eficaz (DONDORP et al., 2011; ADITYA et al., 2013; WHO, 2014).

A quinina, por sua vez, era o principal medicamento existente para tratamento da malária. Devido ao surgimento de novos fármacos e, principalmente, sua elevada toxicidade, seu uso foi limitado. A quinina está relacionada a uma tríade de toxicidade que envolve

hipoglicemia, hipotensão e cinchonismo, além de ser responsável pelo surgimento de outros efeitos adversos. Atualmente, em virtude da limitada disponibilidade de TCA e do surgimento da resistência a outros antimaláricos, o emprego da quinina para tratamento da malária tem sido revisto (FRANÇA et al., 2008; ACHAN et al., 2011).

Além disso, a malária está relacionada com a indução do estresse oxidativo, o qual está envolvido na progressão de inúmeras doenças. Muitos dos medicamentos antimaláricos, dentre eles a quinina, podem aumentar a produção de espécies reativas (ER) ou até inibir a ação de enzimas antioxidantes, rompendo o equilíbrio do parasita e ocasionando sua morte, já que o plasmódio é sensível aos oxidantes; em contrapartida, também podem causar danos ao hospedeiro (PERCÁRIO et al., 2012; DURAN-BEDOLLA et al., 2013). Camundongos tratados com quinina apresentaram aumento no nível de malondialdeído no miocárdio, evidenciando que o fármaco é capaz de ocasionar lesão peroxidativa (OFUSORI et al., 2008).

A fim de garantir a segurança do tratamento da malária, a toxicidade induzida pela quinina deve ser minimizada. Neste contexto, o emprego da nanotecnologia no tratamento e diagnóstico de inúmeras patologias tem atraído à atenção de pesquisadores. Uma nova forma farmacêutica, como os sistemas nanoencapsulados, que podem direcionar o fármaco ao local de ação bem como melhorar seu perfil farmacocinético, seriam uma alternativa promissora para contornar as limitações do tratamento com a quinina (HANS; LOWMAN, 2002; PIMENTEL et al., 2007; SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010).

Até o momento, pouco se sabe sobre a segurança dos sistemas nanoencapsulados, assim como estudos relacionados ao efeito do tratamento com quinina livre e com nanocápsulas contendo quinina sobre parâmetros hematológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo em ratos Wistar.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Malária

Doenças parasitárias são doenças infecciosas causadas por um parasito protozoário ou metazoário. Atualmente elas afetam grande parte da população mundial, estando entre as principais causas de morte, muitas vezes limitando o desenvolvimento de muitos países, bem como a qualidade de vida dos mesmos (FRANÇA et al., 2008).

Essas patologias podem ocorrer em regiões tropicais e subtropicais, bem como em climas temperados (CDC, 2014). Estimativas apontam que em cada dez pessoas no mundo, uma delas sofre de infecção por um ou mais parasitas (REY, 2011).

Entre as principais parasitoses está a malária, também chamada de paludismo. Ela é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo que em humanos as espécies infectantes são o *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium falciparum*. Estudos recentes também relatam casos de infecção por *Plasmodium knowlesi*. A transmissão no ser humano ocorre pela picada da fêmea infectada do mosquito *Anopheles* (FRANÇA et al., 2008; WHITE, 2008; DANESHVAR et al., 2009; BRASIL, 2010b; SADANAND, 2010).

A maioria dos casos de malária no Brasil e no mundo é causada pelo *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo este o mais perigoso e a causa da maioria das mortes. O maior número de casos e mortes devido a esta infecção ocorre na África, sendo a maioria em crianças (PIMENTEL et al., 2007; WHITE et al., 2014).

Essa enfermidade pode levar à deficiências cognitivas em crianças e também reduzir o desempenho escolar (FERNANDO et al., 2003; KIHARA; CARTER; NEWTON, 2006; VITOR-SILVA et al., 2009). Pacientes maláricos podem ter a produtividade no trabalho diminuída, bem como o desenvolvimento intelectual prejudicado (GREENWOOD et al., 2005).

### 2.1.1 Epidemiologia

A malária é a mais importante e prevalente doença parasitária, e continua sendo um problema mundial de saúde pública (SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; MANDAL, 2014; WHITE et al., 2014). Os casos de malária ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais, entretanto, há um aumento mundial nos casos de malária dos viajantes e de imigrantes vindos de países endêmicos (GARCIA, 2010; WELLEMNS; MILLER, 2014).

Estima-se que em seu ápice ocorreram, anualmente, cerca de 300-350 milhões de casos de malária no mundo. Após campanhas para combater essa infecção, sua prevalência diminuiu chegando a 400 mil casos em 1971, voltando a aumentar no final da década de 1970, quando o número de casos chegou a 16 milhões (REY, 2011). Em 2012 ocorreram 207 milhões de casos de malária e cerca de 627 mil mortes, sendo que 90% delas ocorreram na África (WHO, 2013a). Houve uma redução nos números da malária em 2013, sendo registrados 198 milhões de casos e 584 mil mortes (WHO, 2014). No mundo, 97 países são considerados endêmicos e cerca de 3,3 bilhões de pessoas têm risco de contrair a malária (Figura 1), mas muitos países estão alcançando as metas estabelecidas para reverter a incidência de malária (WHO, 2014).

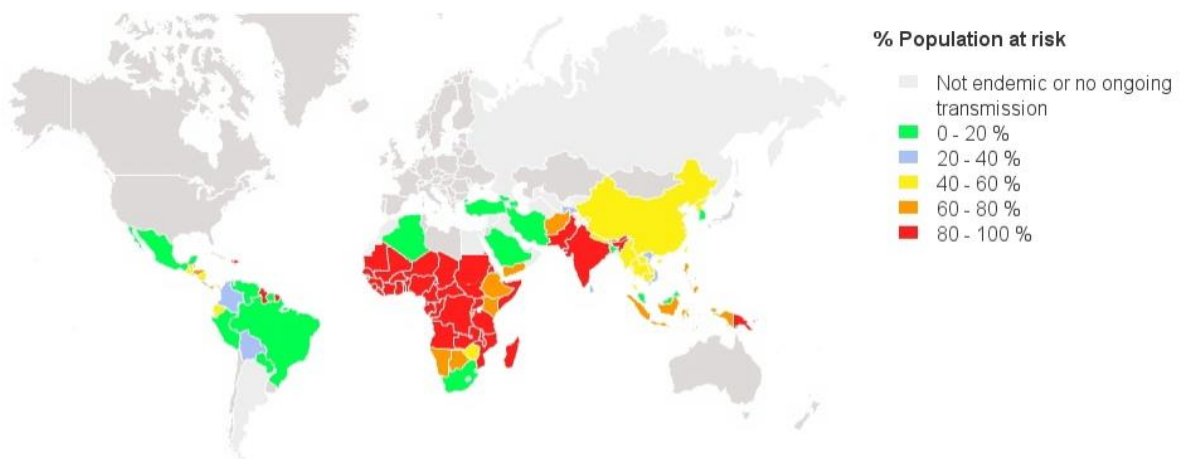


FIGURA 1 - População (%) em área de risco em 2013.  
Fonte: Global Malaria Mapper, 2015.

No Brasil a malária foi um problema nacional de saúde pública na década de 40, quando cerca de 1/7 da população era infectada a cada ano. O número de casos diminuiu para menos de 100 mil após um intenso trabalho de controle dessa doença. Entretanto, devido ao

crescimento da região amazônica na década de 70, a incidência dessa infecção voltou a aumentar (BRASIL, 2001).

Dados apresentados pelo Boletim Epidemiológico (BRASIL, 2013) demonstram que os casos de malária no Brasil vêm diminuindo. Em 2011 foram registrados cerca de 270 mil casos, ou seja, uma redução de praticamente 57% comparada ao ano 2000 (Figura 2), e ocorreram 69 mortes. Na região amazônica, classificada como área endêmica, são notificados 99,7% dos casos de malária.

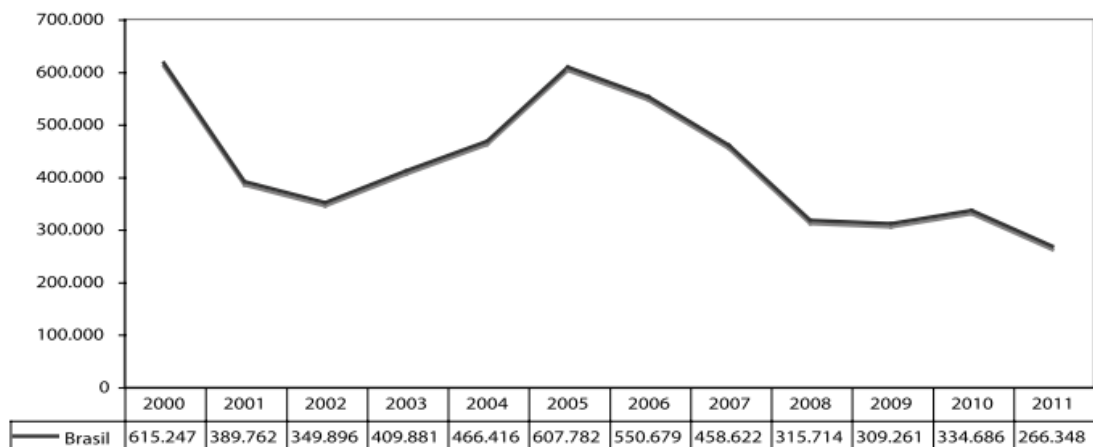


FIGURA 2 - Número de casos de malária registrados no Brasil.  
Fonte: Brasil, 2013.

O comprometimento político e os investimentos no combate a malária, assim como o aumento no controle do vetor, os testes de diagnóstico e o tratamento com TCA, têm levado a grandes avanços contra esta doença. Entre 2000 e 2013 as taxas de mortalidade da malária reduziram em 47% a nível mundial, em todas as faixas etárias, chegando a uma redução de 53% em crianças menores de cinco anos (WHO, 2014).

### 2.1.2 Agente Etiológico e Vetor

O agente etiológico da malária é o protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, família Plasmodiidae e do gênero *Plasmodium* (REY, 2011). Existem cerca de 100 espécies deste parasita que podem infectar diversas espécies de animais. Há anos é reconhecido que os seres humanos podem ser infectados pelo *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* e *P. knowlesi*, (CDC, 2012a).

A maioria das mortes devido à malária é causada pelo *P. falciparum*, visto que é considerado o mais virulento. Na infecção por esta espécie são formadas proeminências na superfície dos eritrócitos, responsáveis pela adesão destes aos microvasos. Essa aderência ocasiona danos teciduais característicos da malária cerebral (MC), como obstrução vascular, hipóxia tecidual e necrose (COLTEL et al., 2004; PIMENTEL et al., 2007; GREENWOOD et al., 2008).

O *P. vivax*, por sua vez, é menos letal, sendo ele o responsável pela maioria dos casos de malária no Brasil. Para invadir as células, essa espécie necessita um receptor (antígeno Duffy) expresso na superfície dos eritrócitos. O *P. ovale* causa uma infecção menos grave que o *P. vivax*, mesmo possuindo características clínicas similares a este (GREENWOOD et al., 2008; GARCIA, 2010; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

O *P. malariae* tem a característica de poder persistir por décadas no organismo, em um estado de infecção assintomático. O *P. knowlesi* é uma espécie parasita de macacos e foi descoberta recentemente como um agente etiológico da malária em humanos (GREENWOOD et al., 2008; DANESHVAR et al., 2009).

A transmissão da malária ocorre através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. São conhecidas em torno de 400 espécies deste mosquito, sendo 30 delas consideradas bons vetores. No Brasil o *Anopheles darlingi* é o principal vetor dessa infecção (BRASIL, 2010b; WHO, 2014). Ainda que raramente, a transmissão da malária também pode ocorrer de outras formas, como por transfusão de sangue ou utilização de agulhas contaminadas, chamada malária induzida (HERWALDT, 2001; BRASIL, 2010b; WHO, 2013b).

### 2.1.3 Ciclo do Parasita

O ciclo de vida do plasmódio ocorre em duas fases, sendo uma no hospedeiro vertebrado e uma no vetor (Figura 3). A infecção malárica inicia-se no momento em que a fêmea do mosquito *Anopheles* pica o homem e inocula os esporozoítos, formas infectantes do *Plasmodium*, na corrente sanguínea, que imediatamente se deslocam para o fígado e invadem os hepatócitos (FRANÇA et al., 2008; MANDAL, 2014).

Nessa fase, denominada ciclo pré-eritrocítico ou exo-eritrocítico, cuja duração varia dependendo da espécie que causou a infecção, ocorre a formação dos merozoítos. Em casos de infecção por *P. vivax* e *P. ovale*, devido às características dessas espécies, os esporozoítos

podem ocasionar recaídas, já que podem permanecer latentes no fígado por meses ou anos, sendo neste caso chamados de hipnozoítos (BRASIL, 2010a; GARCIA, 2010).

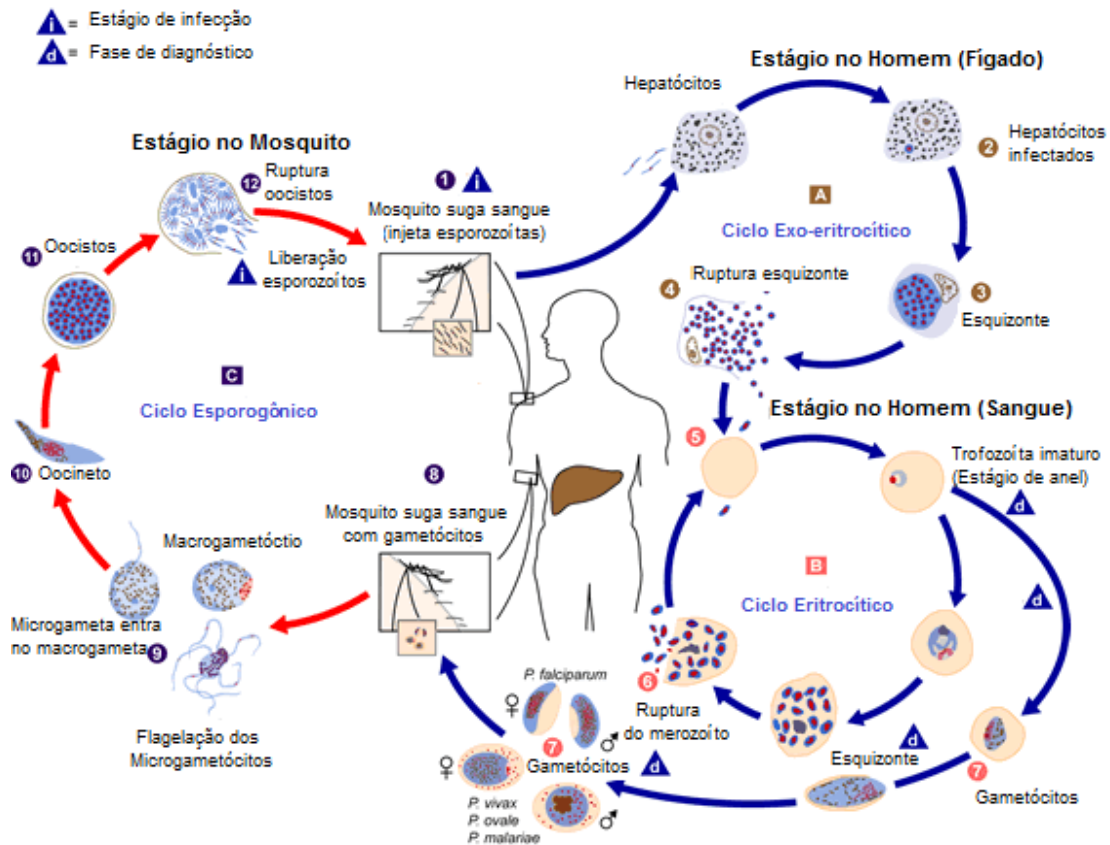


FIGURA 3 - Ciclo de vida do parasita da malária. O ciclo ocorre em dois hospedeiros – homem e mosquito. Primeiramente a fêmea do mosquito *Anopheles* infectada inocula os esporozoítos no hospedeiro humano (1). Os esporozoítos infectam as células do fígado (2) e amadurecem, sendo então chamado de esquizontes (3), que se rompem e liberam merozoítos(4). Após este estágio inicial no fígado, denominado ciclo exo-eritrocítico (A), os parasitas infectam as células vermelhas do sangue (5) e se multiplicam assexuadamente nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica) (B). Os trofozoítos amadurecem formando esquizontes, que se rompem e liberam os merozoítos (6). Alguns destes parasitas se diferenciam em estágios eritrocitários sexuais – gametócitos: microgametócito (sexo masculino) e macrogametócito (sexo feminino) (7). Quando o mosquito pica um ser humano infectado, ele ingere estes gametas (8), então se inicia o ciclo esporogônico (C). No estômago do mosquito os microgametas penetram nos macrogametas, formando zigotos (9), que se tornam móveis e alongados, sendo então denominados oocinetos (10), que por sua vez se desenvolvem em oocistos (11). Estes crescem, rompem e liberam esporozoítos (12), que vão para a saliva do mosquito.

Fonte: Adaptado de: CDC, 2012b.

Após a ruptura do hepatócito, os merozoítos invadem as hemácias e iniciam o ciclo eritrocítico. Essa fase é responsável pelas manifestações clínicas da malária e se repete em prazos regulares, dependendo de cada espécie. Com o avanço da infecção malárica, os merozoítos se transformam em trofozoítos, que se desenvolvem e se dividem em novos merozoítos. Quando o eritrócito se rompe, os merozoítos são liberados e podem iniciar uma



nova infecção ou se transformar em gametócitos, formas que não se dividem (CUNICO et al., 2008; SADANAND, 2010; MANDAL, 2014)

O mosquito, através da picada, suga o sangue do indivíduo infectado. No intestino do mosquito inicia-se o ciclo sexuado dos gametócitos, ocorrendo a formação de gametas masculinos e femininos. Estes gametas se unem e formam o zigoto, que se transforma em oocineto, forma que se move em direção ao epitélio da parede intestinal, onde se aloja e transforma-se em oocisto. Este passa por uma multiplicação esporogônica e, devido seu rompimento, libera esporozoítas que invadem a hemolinfa do inseto, podendo migrar para as glândulas salivares. Assim, os esporozoítos estão prontos para serem injetados na corrente sanguínea do hospedeiro e iniciar um novo ciclo (CUNICO et al., 2008; FRANÇA et al., 2008; GARCIA, 2010 ).

#### **2.1.4 Sintomatologia**

Na primeira semana após a picada do mosquito, durante a fase pré-eritrocítica, o indivíduo não apresenta sintomas. As manifestações clínicas e patológicas da malária começam a surgir quando o plasmódio infecta os eritrócitos e o quadro de sintomas pode progredir uma vez que o parasita infecta diversos órgãos, como fígado, cérebro, baço e vasos sanguíneos (GARCIA, 2010; PAGARO; JADHAV, 2013).

Inicialmente ocorre uma ligeira elevação da temperatura, mal-estar, cefaleia, dor muscular, desconforto abdominal e fadiga, mas também podem ocorrer náuseas, vômitos e hipotensão ortostática. Entretanto, por serem sintomas comuns a diversas doenças, são necessários acompanhamento e exames específicos para um diagnóstico definitivo (SADANAND, 2010; WHITE et al., 2014).

O acesso malárico inicia quando a temperatura começa a aumentar e o indivíduo tem sensação de frio e calafrios. Após a primeira fase, o indivíduo tem sensação de calor e sua temperatura pode chegar aos 41°C, bem como pode apresentar cefaleia, vômito e náusea. Essa fase é então seguida de sudorese e por uma queda na temperatura (BRASIL, 2010b; GARCIA, 2010).

Crianças, gestantes e adultos de áreas não endêmicas que visitam áreas de transmissão ativa são os mais propensos a desenvolver a doença. Na malária grave, ou seja, quando há disfunção de algum órgão vital, as manifestações dependem da idade e da intensidade de

transmissão do local. Em geral, em crianças é mais comum a presença de anemia grave e hipoglicemia e em adultos podem ocorrer edema de pulmão, icterícia e insuficiência renal, sendo que em ambas as faixas etárias podem ocorrer acidose e coma. A presença de anemia pode ser devido a vários mecanismos que podem ocasionar tanto o aumento da hemólise quanto a diminuição da produção de eritrócitos (DONDORP et al., 2008; GARCIA, 2010; WHO, 2013b; WHITE et al., 2014). A hipoglicemia, que está associada ao consumo de glicose pelo parasita, e o aumento nos níveis de lactato são alterações graves da malária que estão relacionadas ao mau prognóstico da doença (HORTELANO et al., 2013).

Além dos sintomas descritos, também podem ocorrer convulsão, trombocitopenia, sangramento espontâneo, fraqueza generalizada, dificuldade em respirar, choque circulatório e hemoglobinúria, como também a presença de alta parasitemia e de esplenomegalia e hepatomegalia, devido a remoção das hemácias lesadas e do pigmento malárico (BECKER et al., 2004; PIMENTEL et al., 2007; PAGARO; JADHAV, 2013; WHO, 2013b).

### **2.1.5 Diagnóstico**

Quando se suspeita que uma pessoa tenha malária, é importante saber a residência do paciente e se ele viajou para alguma área endêmica. Os sintomas desenvolvidos pelo indivíduo portador da malária não são precisos, visto que essa enfermidade pode ser causada por mais de uma espécie de plasmódio. Assim, testes rápidos ou através de microscopia são fundamentais para se realizar um diagnóstico preciso, o que pode ajudar a evitar casos de resistência aos medicamentos e efeitos adversos (ADITYA et al., 2013; WHO, 2013b).

O padrão ouro para detecção do plasmódio no sangue é a microscopia, que pode ser realizada em um esfregaço ou na gota espessa de sangue. É um método simples, de baixo custo e de fácil realização, que permite analisar a morfologia do parasita e verificar seu estágio de desenvolvimento, bem como detectar uma baixa parasitemia (BRASIL, 2010b; ADITYA et al., 2013; WHO, 2013b).

Os testes imunocromatográficos, por sua vez, envolvem a detecção de antígeno do parasita por anticorpo monoclonal. Entretanto, seu custo é elevado, comparado à microscopia, além de não permitir verificar o nível de parasitemia nem fazer a distinção entre alguns plasmódios (BRASIL, 2010a).

### 2.1.6 Profilaxia e Tratamento

O controle do vetor é uma das formas de erradicar a malária. Para isso, faz-se o uso de inseticidas no interior das casas, bem como de mosquiteiros. Também são usados repelentes corporais, que são úteis no combate a malária, assim como a manutenção da higiene local (PHILLIPS-HOWARD et al., 2003; GREENWOOD et al., 2005; ADITYA et al., 2013).

A terapêutica antimalárica tem como objetivo impedir o ciclo reprodutivo sanguíneo do protozoário, eliminar os gametócitos, bem como impedir recidivas da infecção (BRASIL, 2010a). Os fármacos antimaláricos disponíveis no mercado são de origem natural ou compostos sintéticos, específicos para cada etapa de vida do plasmódio (FRANÇA et al., 2008).

Dentre os quimioterápicos disponíveis para o tratamento dessa parasitose incluem-se biguanidas (proguanil), diaminopiridinas (pirimetamina), diclorobenzilidina (lumefantrina), hidroxinaftoquinonas (atovaquona), lactonas sesqui-terpênicas (derivados da artemisinina, artesunato e artemeter) e quinolinas (quinina, cloroquina, halofantrina), que podem ser utilizados associados com outros medicamentos (sulfonamidas, tetraciclina e lincosamidas) (PIMENTEL et al., 2007).

Recomenda-se como terapia de primeira linha para malária *P. falciparum* o uso de TCA, assim como no caso de malária *P. vivax* cloroquina-resistente. Um potente tratamento para malária, a TCA consiste na artemisinina ou um de seus derivados, como o artemeter e o artesunato, combinado com um antimalárico de ação prolongada. A artemisinina, isolada da erva chinesa *Artemisia annua*, possui alto índice terapêutico e reduz a carga parasitária já em 48 horas de tratamento (DONDORP et al., 2011; ADITYA et al., 2013; MANDAL, 2014; WHO, 2014).

Além da terapêutica com TCA, a terapia com cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina e amodiaquina também é eficaz, segura e acessível (MANDAL, 2014). A cloroquina, que tem ação rápida, boa disponibilidade, baixa toxicidade e custo acessível, é o medicamento utilizado para malária *P. vivax*, em áreas onde não há resistência a esse fármaco, combinada com um tratamento com primaquina, para profilaxia (SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; WHO, 2014).

A quinina age sobre as formas eritrocíticas sexuadas e foi considerada referência para tratamento da malária. Seu uso foi limitado devido a seus diversos efeitos adversos e a introdução de fármacos mais efetivos. Entretanto, o emprego da quinina para o tratamento da

malária tem sido revisto devido aos casos de resistência a cloroquina e a limitada disponibilidade de TCA (FRANÇA et al., 2008; ACHAN et al., 2011).

Dificuldades em erradicar a malária podem ocorrer devido a inúmeros fatores, como falhas nas campanhas de combate a malária, condição socioeconômica dos indivíduos afetados e resistência do mosquito aos inseticidas. Além disso, o complexo ciclo de vida do parasita e o regime de tratamento antimalárico normalmente composto por mais de um fármaco podem causar vários efeitos adversos e, assim, contribuir para que o paciente interrompa o tratamento, bem como, para que o parasita desenvolva resistência aos medicamentos (PIMENTEL et al., 2007; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010).

Em alguns países o mosquito está manifestando resistência aos inseticidas e o parasita também vem mostrando resistência a artemisinina (WHO, 2014). Em virtude disso, a busca por uma vacina contra malária, bem como, por fármacos menos tóxicos e mais eficazes ou por novas formas farmacêuticas torna-se uma alternativa promissora ao combate da malária (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; MANDAL, 2014).

#### **2.1.6.1 Quinina**

O efeito medicinal da quinina, extraída da Cinchona, já era conhecido pela sociedade indígena. A casca dessa árvore era utilizada para tratamento da febre e foi importada para a Europa pelos padres jesuítas, por volta de 1630. Dela foram extraídos os primeiros compostos quinolínicos antimaláricos, sendo o principal deles o alcaloide quinina (6'-methoxycinchinan-9-ol). A estrutura química da quinina é composta por dois núcleos (Figura 4). A oxidação nesses núcleos forma os seus metabólitos. No núcleo quinuclidina as reações ocorrem, preferencialmente, na posição C-3, podendo também ocorrer na N-1 e na cadeia lateral de vinil (BANNON et al., 1998; CUNICO et al., 2008; FRANÇA et al., 2008).

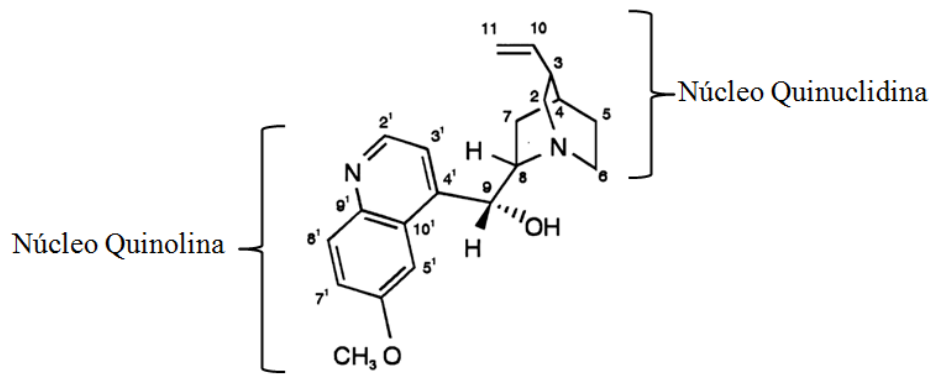


FIGURA 4 - Estrutura química da quinina.  
Fonte: Adaptado de Bannon et al., 1998.

Durante sua metabolização são produzidos diferentes metabólitos, que foram identificados na urina através do método de espectrometria. Bannon e colaboradores (1998) separaram a quinina e dez metabólitos, sendo que quatro deles foram identificados como 3-hidroxiquinina, 2'-quinona, o-desmetilquinina e 10,11-dihidroxi-dihidroquinina e outros seis provavelmente surgiram da transformação dos metabólitos primários (3-hidroxi-2'-quinona, 10,11-dihidroxi-dihidro-o-desmetilquinine, 10,11-dihidroxi-dihidro-2'-quinona, o-desmetil-2'-quinona, o-desmetil-3-hidroxiquinine e o-desmetil-3-hidroxi-2'-quinona).

A quinina faz parte da família das quinolinas e é um composto básico, por isso sempre apresentado na forma de sal. Existem diversas preparações, sendo o dicloridrato mais utilizado. Além da atividade antimalárica, esse fármaco tem atividade analgésica e é utilizado para o tratamento de câimbras e como aditivo de bebidas (SAMANIDOU et al., 2005; FRANÇA et al., 2008; ACHAN et al., 2011).

Por cerca de 300 anos, a quinina foi o único medicamento eficiente para tratamento da malária, sendo mais tarde substituída por fármacos sintéticos, que são mais eficazes e seguros, além de serem sintetizados mais facilmente (SAMANIDOU et al., 2005; ACHAN et al., 2011).

A quinina é rapidamente absorvida e altamente ligada a proteínas. Suas propriedades farmacocinéticas e terapêuticas podem variar com a idade e a imunidade do paciente, bem como com a gravidade da doença (PUKRITTAYAKAMEE et al., 2003; ACHAN et al., 2011). Doses terapêuticas de quinina são consideradas seguras no primeiro trimestre de gestação e pouco se sabe sobre a segurança do uso de TCA nesse período (McGREADY et al., 2002; ACHAN et al., 2011). A quinina associada a clindamicina é recomendada nos casos de malária nesse período de gravidez (WHO, 2015).

Esse fármaco atua principalmente na forma eritrocitária do parasita, mas também nos gametócitos de *P. vivax* e *P. malariae*, e não tem ação na forma hepática. Seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. No eritrócito, o parasita depende da lise da hemoglobina para sua nutrição. Esse processo resulta na liberação do grupamento heme, tóxico ao parasita, que então é convertido em hemozoína, uma forma não tóxica. A quinina, por sua vez, concentra-se nos vacúolos ácidos alimentares do plasmódio e inibe a polimerização do heme em hemozoína. O parasita, então, não consegue inativar o heme e morre devido o dano oxidativo na membrana, nas proteases digestivas e nas biomoléculas. Para inativação do heme, primeiramente a quinolina liga-se ao heme e então este complexo (heme-fármaco) satura as cadeias de polímero do heme (SULLIVAN et al., 1998; SADANAND, 2010; CHIKEZIE; UWAKWE, 2011).

No entanto, este fármaco também é conhecido pelo baixo índice terapêutico e por seus efeitos tóxicos, o que tem limitado seu uso clínico. Um estudo retrospectivo realizado por Rolling e colaboradores (2013) constatou que 71% dos pacientes tratados com quinina apresentaram algum efeito adverso, mesmo quando administrada em doses terapêuticas.

A quinina está relacionada à tríade de toxicidade que envolve hipoglicemia (JONES et al., 1986; OKITOLONDA et al., 1987), hipotensão e cinchonismo, caracterizado por náusea, vômito e cefaleia (WOLF; OTTEN; SPADAFORA, 1992; SAMANIDOU et al., 2005).

Relatos na literatura demonstram que esse antimalárico pode causar diversos outros efeitos secundários, como distúrbios visuais (CANNING; HAGUE, 1988; VUSIRIKALA; WILLIAMS; RAM, 2005) e distúrbios auditivos (KARLSSON et al., 1990; TANGE, et al., 1997; CLAESSEN et al., 1998; GÜRKOV et al., 2008), bem como dano cardíaco (GOLDENBERMG; WEXLERM, 1988; BONINGTON et al., 1996; OFUSORI et al., 2008), dano hepático (PEREZ et al., 1994), dano renal, como nefrite intersticial aguda (PAWAR; JACOBS; SMITH, 1994) e danos hematológicos, que incluem trombocitopenia (BARRETT et al., 1983), agranulocitose (SUTHERLAND et al., 1977), linfocitopenia (HOU et al., 1997) e coagulação intravascular disseminada (SPEARING et al., 1990). Alguns efeitos adversos, como o distúrbio auditivo, dependem da concentração e podem ser reversíveis (CANNING; HAGUE, 1988; ACHAN et al., 2011). Além disso, a quinina pode causar a Síndrome Hemolítica-Urêmica, caracterizada por anemia hemolítica, insuficiência renal aguda e plaquetopenia (GOTTSCHALL et al., 1991).

## 2.2 Sistemas Carreadores de Fármacos

Um dos maiores desafios para a indústria farmacêutica e um importante campo de pesquisa nos últimos anos é a liberação de fármacos em locais específicos de ação, que tem como um dos objetivos aumentar a concentração do fármaco no tecido alvo e, assim, reduzir sua concentração em outros locais (SCHAFFAZICK et al., 2003; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012; KUMAR; ZHANG; LIANG, 2013).

Os sistemas nanoparticulados, que possuem até 1 micrômetro de diâmetro, são exemplos de sistemas carreadores de fármacos (SOPPIMATH et al., 2001; HANS; LOWMAN, 2002; ALLEN; CULLIS, 2004). Esses sistemas modulam a liberação do fármaco e possuem diversas vantagens quando comparados a outras formas farmacêuticas e ao fármaco livre, visto que podem direcionar o fármaco ao local específico, proteger o fármaco da degradação, diminuir a dosagem, reduzir efeitos adversos e melhorar o índice terapêutico (ALLEN; CULLIS, 2004; CHO et al., 2008; FAROKHZAD; LANGER, 2009; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012; KUMAR; ZHANG; LIANG, 2013).

Esses vetores englobam os lipossomas, que possuem um núcleo aquoso envolto por lipídios, e as nanopartículas (NP), que são formadas por polímeros degradáveis, e por isso são consideradas mais estáveis, e possuem diferentes composições e organizações estruturais, podendo se diferenciar em nanocápsulas (NC) (núcleo oleoso e parede polimérica) e nanoesferas (matriz polimérica) (Figura 5) (COUVREUR; FATAL; ANDREMONT, 1991; SOPPIMATH et al., 2001; SCHAFFAZICK et al., 2003).

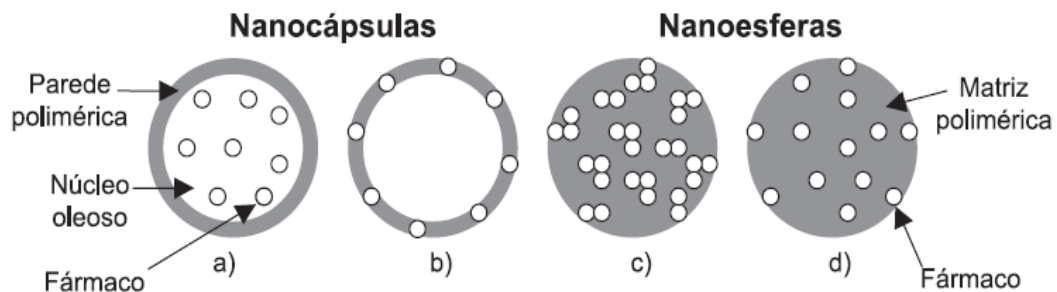


FIGURA 5 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

Fonte: Schaffazick et al., 2003, p.726

Apesar de apresentarem diversas vantagens, por serem suspensões aquosas, as NP apresentam problemas de estabilidade, biocompatibilidade de materiais, formação de precipitados durante o armazenamento e alto custo, que ainda devem ser contornados. Além disso, deve-se observar o polímero utilizado na formulação das NP, pois ele pode afetar sua estrutura e propriedades, bem como sua aplicação (HANS; LOWMAN, 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003; PIMENTEL et al., 2007).

### **2.2.1 Sistemas Nanoparticulados Contendo Fármacos Antimaláricos**

A aplicação da nanotecnologia no tratamento e diagnóstico de inúmeras patologias tem atraído a atenção de pesquisadores que estão na busca de uma nova forma farmacêutica para o tratamento da malária (COUVREUR; FATAL; ANDREMONT, 1991; HANS; LOWMAN, 2002; PIMENTEL et al., 2007).

Pesquisas com fármacos antimaláricos vêm apresentando resultados promissores. A encapsulação lipossômica de arteether, derivado da artesiminina, mostrou melhora na biodisponibilidade e aumento na concentração máxima do fármaco, comparado a suspensões aquosas (BAYOMI et al., 1998). O estudo de Chimanuka e colaboradores (2002), realizado com formulações lipossômicas de artemeter, demonstrou boa estabilidade dessa formulação bem como eficácia no tratamento de camundongos infectados pelo *P. chabaudi*.

Estudos com NC contendo halofantrina mostraram um rápido controle do desenvolvimento do parasita em camundongos infectados pelo *P. berghei* (MOSQUEIRA et al., 2004) e também uma redução na toxicidade da fármaco (LEITE et al., 2007). Também foi observada melhoria da eficácia terapêutica, com redução da dose em 25%, no tratamento da malária com nanoemulsão de primaquina, comparado à solução simples desse fármaco (SINGH; VINGKAR, 2008).

A concentração de quinina no cérebro aumentou quando foram utilizadas NC conjugadas com transferrina, demonstrando que a MC pode ser tratada com nanossistemas (GUPTA; JAIN; JAIN, 2007). No estudo realizado por Haas e colaboradores (2009), a nanoencapsulação diminuiu a dose eficaz de quinina de 105 mg/kg/dia para 75 mg/kg/dia, ou seja, cerca de 30%, bem como aumentou a concentração da fármaco nos glóbulos vermelhos, melhorando sua eficácia.



## 2.3 Estresse Oxidativo

### 2.3.1 Radical Livre e Espécies Reativas

No final de 1950, pouco se sabia sobre os radicais livres e antioxidantes na área das ciências clínicas e biológicas. Somente após a descoberta da superóxido dismutase (SOD), em 1968, os cientistas despertaram o interesse nessas substâncias (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000).

Radical livre (RL) é toda espécie que contém um ou mais elétrons desemparelhados na última camada e que possui um relevante grau de reatividade. No entanto, algumas ER não possuem elétrons desemparelhados, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), não sendo definida como RL (HALLIWELL, 1991; ARUOMA, 1998).

As ER podem ser derivadas do oxigênio molecular (ERO), do nitrogênio (ERN) e de outras substâncias químicas. As ERO, espécies mais importantes geradas no organismo, incluem os radicais hidroxila ( $OH\bullet$ ), ânion superóxido ( $O_2\bullet^-$ ), óxido nítrico ( $NO\bullet$ ) e peroxil ( $RO_2\bullet$ ), bem como as espécies não radicalares como  $H_2O_2$ , ozônio ( $O_3$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Existem também as ERN, como o  $NO\bullet$  e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), bem como as ER derivadas de cloro, enxofre e outros metais (ARUOMA, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

Os RL podem ser gerados de diferentes formas. No organismo eles podem ser formados a partir do metabolismo humano, como na cadeia respiratória, na fagocitose e na oxidação de ácidos graxos, e também em condições fisiológicas e processos inflamatórios ou infecciosos. Fontes exógenas de RL incluem a poluição, fumaça, solventes e radiação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; RAO P et al., 2011).

Em concentrações fisiológicas, as ER desempenham importantes funções no organismo (RAO P et al., 2011). ERO e ERN são necessárias para o processo de maturação celular, podem exercer função de moléculas sinalizadoras e atuar no sistema de defesa do organismo, já que os leucócitos podem liberar RL para então destruir os micro-organismos invasores (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; RAY; HUANG; TSUJI, 2012).

### 2.3.2 Dano Oxidativo

Uma produção exagerada de RL faz com que o organismo acione o seu sistema de defesa antioxidante, na tentativa de restaurar o equilíbrio. Quando este equilíbrio não é reestabelecido, desencadeia-se o estresse oxidativo (EO). Esse pode levar ao dano oxidativo em biomoléculas como lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (VALKO et al., 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

A peroxidação lipídica é a principal reação do EO. Os fosfolipídios compõem as membranas celulares e podem ser degradados quando ocorre o dano oxidativo, visto que são alvos dos RL. Essa condição ocasiona dano celular, como alteração na integridade das membranas (RAO P et al., 2011; NIKI, 2014). Nesse processo, um átomo de hidrogênio é extraído de uma cadeia lipídica poli-insaturada, formando um radical que vai reagir com outros lipídios da membrana, formando os lipídios hidroperóxidos (FERREIRA; ABREU, 2007). Esses lipídios ainda podem ser degradados em subprodutos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), conhecidos como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como malondialdeído (MDA), e que podem ser mensuradas para avaliar o dano lipídico (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979; GRINTZALIS et al., 2013).

As proteínas também podem ser oxidadas por ER. Os RL podem ocasionar a fragmentação da proteína, bem como, oxidar as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (THERÓND et al., 2000). Quando sofrem oxidação alguns aminoácidos como a lisina, arginina, prolina e treonina, produzem derivados de carbonila, que também podem ser produzidos a partir de outras reações (THERÓND et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2007). Esses grupamentos carbonílicos podem ser quantificados para avaliar a extensão do dano proteico (LEVINE et al., 1990).

Outro alvo dos RL são os ácidos nucleicos. Esse ataque dos RL gera danos ao DNA, como ligações cruzadas ou quebras na cadeia de DNA, modificações nas bases e danos ao açúcar (THERÓND et al., 2000; WELCH et al., 2002). O dano ao DNA pode ser quantificado através da determinação da frequência de micronúcleos, que são fragmentos ou partes inteiras de cromossomos não incluídas no núcleo durante a divisão celular, mas com características morfológicas semelhantes ao núcleo principal, apesar de menor (FENECH et al., 2011; SCHMID, 1975).

Estudos apontam que o EO exerce um importante papel na progressão de doenças autoimunes, cardiovasculares, neurodegenerativas e crônicas, como câncer, artrite e

envelhecimento (ARUOMA, 1998; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; HALLIWELL, 2011; RAO P et al., 2011).

### 2.3.3 Defesas Antioxidantes

Segundo Halliwell (1991), uma substância que está em baixas concentrações comparada a um substrato oxidável e que inibe ou atrasa a oxidação desse substrato é chamada de antioxidante. O organismo possui um sistema aprimorado de defesa antioxidante, ou seja, moléculas que removem, neutralizam ou inibem a formação dos RL, protegendo o alvo biológico do dano oxidativo (HALLIWELL, 1991; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). As reações catalisadas por essas enzimas estão demonstradas na Figura 6. A SOD é responsável pela dismutação do ânion superóxido em  $H_2O_2$ , que por sua vez é decomposto pela CAT. A GPx catalisa a mesma reação da CAT, porém utiliza um cofator, a glutaciona reduzida (GSH). Nesta reação é formada a glutaciona oxidada (GSSG), que pela ação da glutaciona redutase (GR), é transformada em GSH (VASCONCELOS et al., 2007; RAO P et al., 2011).

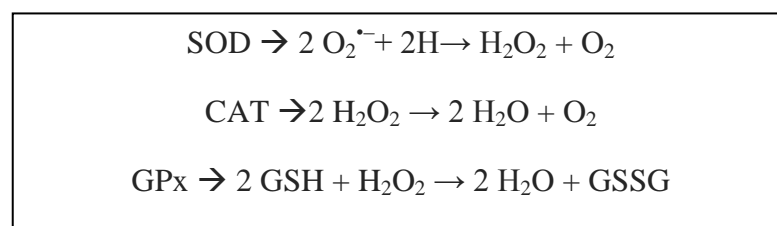


FIGURA 6 - Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.  
Fonte: Adaptado de Vasconcelos et al., 2007.

Já o sistema de defesa antioxidante não enzimático é representado por compostos endógenos como a glutaciona (GSH), ácido úrico e transferrina, e compostos exógenos como vitamina E e C,  $\beta$ -caroteno, flavonóides, entre outros (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; HALLIWELL, 2011; RAO P et al., 2011).

### 2.3.4 Malária e Estresse Oxidativo

A infecção pela malária é acompanhada pela produção aumentada de ER, levando a um quadro de estresse oxidativo, que pode estar associado a fisiopatogenia desta enfermidade. A produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o interferon gamma (INF- $\gamma$ ), em virtude da ativação da resposta imune do hospedeiro, ocasiona a ativação dos fagócitos e produção ERO. A infecção pelo plasmódio também resulta na redução dos níveis das defesas antioxidantes (PÁBON et al., 2003; PERCÁRIO et al., 2012).

Além disso, durante o ciclo assexuado, que ocorre no eritrócito do homem, o parasita necessita muito nutriente e, para isso, degrada a hemoglobina do hospedeiro. Neste processo, que ocorre dentro do vacúolo digestivo do parasita, a porção heme se separa da porção globina e o ferro é oxidado. Os elétrons livres vão então reagir com o oxigênio molecular, formando ERO (BECKER et al., 2004; EREL et al., 2001; PABÓN et al., 2003).

O *Plasmodium*, por sua vez, é sensível ao EO e necessita manter o equilíbrio para sobreviver. Segundo a revisão feita por Duran-Bedolla e colaboradores (2013), o parasita possui meios de retomar o equilíbrio, contornando os efeitos do EO. Além de possuir um sistema antioxidante, o parasita pode neutralizar o grupo heme, também chamado de ferriprotoporfirina, agregando-o em um pigmento cristalino não tóxico denominado hemozoína, assim evitando sua toxicidade.

Vários medicamentos disponíveis para tratamento da malária agem rompendo o equilíbrio do parasita seja por acumular ou produzir ER ou por inibir a ação de enzimas antioxidantes; por outro lado, também podem causar danos ao hospedeiro (PERCÁRIO et al., 2012; DURAN-BEDOLLA et al.; 2013). Estudos que envolvam quinina e o EO ainda são escassos. Ofusori e colaboradores (2008) demonstraram que a administração crônica de quinina pode aumentar os níveis de MDA no coração, evidenciando dano lipídico neste órgão.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Verificar o efeito do tratamento com nanocápsulas contendo quinina sobre parâmetros hematológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo em ratos Wistar.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Realizar a análise hematológica e total de contagem de plaquetas;
- Quantificar os marcadores enzimáticos para funções hepática (AST e ALT), renal (ureia e creatinina) e cardíaca (CK e CK-MB);
- Determinar os níveis de homocisteína;
- Determinar o dano oxidativo em proteínas;
- Determinar o dano oxidativo em lipídios;
- Determinar o dano oxidativo no material genético (DNA);
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), e glutathiona peroxidase (GPx);
- Determinar os níveis de glutathiona total (GSH).

## PARTE II

### MANUSCRITO

#### **Nanoencapsulation of quinine improves hematological, biochemical and oxidative stress parameters in Wistar rats**

*Alessandra Melise Golke, Angélica Aparecida da Costa Güllich, Patrícia Martinez Oliveira,  
Ritiéle Pinto Coelho, Aline Lorenset, Bruna Cocco Pilar, Letícia Gomes Almeida, Luana  
Roberta Michels, Ana Cristina Rodrigues da Silva, Sandra Elisa Haas, Vanusa Manfredini*

Em fase de preparação para submissão para European Journal of Pharmaceutical Sciences



**Nanoencapsulation of quinine improves hematological, biochemical  
and oxidative stress parameters in Wistar rats**

*Alessandra Melise Golke<sup>b</sup>, Angélica Aparecida da Costa Güllich<sup>b</sup>, Patrícia Martinez  
Oliveira<sup>b</sup>, Ritiéle Pinto Coelho<sup>b</sup>, Aline Lorenset<sup>a</sup>, Bruna Cocco Pilar<sup>b</sup>, Leticia Gomes  
Almeida<sup>a</sup>, Luana Roberta Michels<sup>c</sup>, Ana Cristina Rodrigues da Silva<sup>d</sup>, Sandra Elisa Haas<sup>abc</sup>,  
Vanusa Manfredini<sup>\*abc</sup>*

**Affiliation**

<sup>a</sup> Course of Pharmacy, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>c</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>d</sup> Pharmaceutical Biochemistry from the Catholic University of Pelotas - UCPel, Pelotas.

\* Correspondence should be addressed: Vanusa Manfredini, Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiiana, Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica, BR 472, Km 585, Uruguaiiana, RS, Brazil, CEP: 97500-970. Tel.: (55) 3413-4321. Fax: (55) 3414-1484. E-mail address: [vanusamanfredini@unipampa.edu.br](mailto:vanusamanfredini@unipampa.edu.br)

## Abstract

Malaria is a parasitic disease, considered a global public health problem, caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and transmitted by the bite of the female *Anopheles* mosquito. This disease includes symptoms such as fever, chills, headache, vomit, diarrhea and anemia, which can lead to coma and death. Among the many drugs available for the treatment of malaria, the most classic is quinine, an alkaloid extracted from the bark of the *Cinchona* species, a potent blood schizonticide. However, it has limited use because of its toxicity and the appearance of new drugs. In this context, development of a dosage form capable of minimizing the toxicity caused by quinine would be an alternative to overcome the limitations of treatment. Then, nanotechnology has attracted the interest of researchers in nanoencapsulation drugs. This study aimed to verify hematological, biochemical and oxidative stress parameters in rats treated with quinine-loaded nanocapsules. The animals were divided into four groups which received the following treatments: control (saline - 0.9% NaCl), free quinine (75mg/kg/day), blank nanocapsules, quinine-loaded nanocapsules (75 mg/kg/day). The formulations were administered three times a day intraperitoneally for seven consecutive days. On the eighth day the rats were euthanized and venous blood was collected for followed analysis. Treatment with quinine-loaded nanocapsules has shown promising results as it was able to maintain blood levels within the normal range. While markers of cardiac, hepatic and renal function had decreased blood levels compared to the treated group with free quinine. In addition, the nanoencapsulation was able to significantly increase the activity of antioxidant enzymes and mitigate the lipid, protein and genetic damage induced by free quinine. Then, the results suggest that the nanoencapsulation of quinine was effective in reducing the adverse effects caused by the drug, making it safer for the treatment of malaria.

**Keywords:** malaria, quinine, nanocapsules, hematology, biochemistry, oxidative stress.



## 1. Introduction

The parasitoses are infectious diseases caused by protozoan or metazoan, considered a worldwide public health problem. It is among the leading causes of death and sometimes limiting the development and the quality of life in many countries (França et al., 2008).

Among the major parasitic diseases is malaria which, according to the World Health Organization (2014), affected about 198 millions people and caused about 584 000 deaths in 2013, with 90% of these deaths occurred in Africa. In Brazil, in 2011, there were 270 000 cases, 99% of them in the Amazon region (Brasil, 2013b).

Malaria is caused by protozoa of the genus *Plasmodium*. In humans, the most common species are *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* and, more recently, *P. knowlesi*. It is transmitted through the bite of infected female *Anopheles* mosquito (França et al., 2008; Hortelano et al., 2013; White, 2008).

Symptoms of malaria include fever, chills, headache, vomiting, diarrhea, acidosis and anemia, if not treated properly can lead to complications such as thrombocytopenia, renal failure, pulmonary edema, coma and death (Hortelano et al., 2013; Rolling et al., 2013). Treatment of this parasitosis aims to stop the blood reproductive cycle of parasite, eliminate the gametocytes and prevent infection relapse (Brasil, 2010). Among the various drugs available for the treatment of malaria, the most classic is quinine (Greenwood et al., 2008).

Quinine is an alkaloid extracted the bark of the Cinchona tree, according to the first reports, around 1600 was used by Indians for treatment of febrile states (Achan et al., 2011; Samanidou et al., 2005). This drug acts on erythrocyte form the parasite, the main antimalarial until the last century. However, had limited use because both therapeutic dose as for overdose is connected to a triad of toxicity involving hypoglycemia (Okitolonda et al., 1987; White, 1992), hypotension (White, 2007) and cinchonism (Achan et al., 2011; Wolf et al., 1992). Moreover, it can cause visual disturbances (Vusirikala et al., 2005) and auditory (Gürkov et al., 2008; Tange et al., 1997) that may be reversible.

The mechanism action of quinine is not fully established yet, but believed that it inhibits the formation of hemozoin and thus induces the production of pro-oxidants (Bedolla-Duran et al., 2013). The storage of these substances, also called reactive species, associated with a decrease in antioxidant defenses creates an imbalance triggering oxidative stress, which plays an important role in development of complications caused of malaria (Halliwel, 2011; Percário et al., 2012). A study in the myocardium of mice treated with quinine showed that

the drug was able to induce oxidative stress generating lipid damage, evidenced by the increase in the level of malondialdehyde (Ofusori et al., 2008).

Studies suggest that nanoencapsulated systems protect the drug toxicity of the body and increase its bioavailability at the site of action, thereby decreasing their therapeutic dosage (Kumar et al., 2013; Parven et al., 2012). However, not much known about the toxicity of nanocapsules (NC), as well as on the effects their exposure (Elsaesser and Howard, 2012).

Thus, the objective of this study was to evaluate hematological, biochemical and oxidative stress parameters in Wistar rats treated with quinine-loaded nanocapsules.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Materials and reagents**

All reagents were of analytical grade, purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Kits for the blood profile analysis and biochemical markers of cardiac, hepatic and renal function (Labtest, Lagoa Santa, Minas Geras, Brazil).

### **2.2. Experimental Animals**

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Pampa (UNIPAMPA) under the Protocol 033/2013, being this affiliated with the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The experiments were conducted in accordance with ethical and technical principles of animal experimentation established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the law No. 11.794 8 October 2008 laying down the procedures for the scientific use of animals (Brazil, 2008; 2013).

Were used 24 adult male Wistar rats, weighing about 150g, which remained in the Bioterio from UNIPAMPA, campus Uruguaiana under standard environmental conditions, kept in the cabin with cycle 12 hours light / dark, which received diet and water *ad libitum*, in quantity and appropriate quality to maintain their health.

The animals were divided into four groups (n = 6) which received the following treatments: control (saline - 0.9% NaCl), free quinine (75mg / kg / day), blank nanocapsules, quinine-loaded nanocapsules (75 mg / kg / day).

The formulations were administered three times a day intraperitoneally for seven days, always at the same time (Haas, 2007). On the eighth day the animals were euthanized, venous blood was collected and fractionated to evaluation hematological, biochemical and oxidative stress parameters.

### 2.3. Preparation of suspensions of nanocapsules

The NC were prepared using interfacial precipitation of preformed polymer method according to the methodology described by Fessi and collaborators (1988). The organic phase was formed with poly ( $\epsilon$ -caprolactone), medium chain triglyceride (TCM), Lipoid S45® and quinine, and dissolved in acetone, being kept under heating and stirring. This phase was poured into the aqueous phase consisting of water and polysorbate 80. After the formation of the suspension of NC, acetone and part of the water were evaporated (2 mg / ml quinine). Blank NC, without the drug, were also prepared.

### 2.4. Physico-chemical characterization of nanocapsules

The formulations were characterized by diameter (Mastersizer 2000), the Zeta potential (Zetasizer, Malvern), pH and drug content.

### 2.5. Hematological parameters

Samples of venous blood were collected in tubes containing EDTA (Vacutainer - Becton, Dickinson and Company - New Jersey - USA) and analyzed immediately after collection. The complete blood count was performed in an automatic counter Hematology Analyzer Cell-Dyn (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA), blood smears were prepared and stained with Panótico kit (Renylab Chemicals & Pharmaceuticals, Barbacena - Minas Gerais, Brazil).

### 2.6. Biochemical parameters

A part of blood collected was packaged in tubes without anticoagulant (Vacutainer - Becton, Dickinson and Company - New Jersey - USA). Markers of cardiac function creatine kinase (CK) and isoenzyme creatine kinase cardiac muscle (CK-MB), hepatic function

aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) and renal function urea and creatinine in serum were evaluated using automatic analyzer A25 Biosystems (AS Biosystems, Barcelona, Spain). Homocysteine levels were quantified in erythrocytes by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS / MS) according to the methodology developed by Nelson and collaborators (2003). All assays were performed in triplicate.

## 2.7. Oxidative stress parameters

The activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) was determined in erythrocytes using commercial kits RANSOD<sup>®</sup> and RANSEL<sup>®</sup>, respectively (Randox Laboratories, UK). The activity of catalase (CAT) in erythrocytes was determined according to the method described by Aebi (1984). Total glutathione (GSH) levels in erythrocytes were quantified through the method described by Akkerboom and Sies (1981).

The oxidative damage to plasma proteins was determined by measurement of carbonyl group second method of Levine and collaborators (1990). Lipid peroxidation was determined in plasma by measuring the thiobarbituric acid reactive species (TBARS) according to the methodology described by Ohkawa and collaborators (1979). The frequency of micronuclei was determined in peripheral blood leukocytes second the methodology described by Schmid (1975). All assays were performed in triplicate.

## 2.8. Statistical Analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The comparison among groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Bonferroni test for multiple comparisons. The results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

The physico-chemical characteristics of the NC are described in Table 1. The nanoparticles, generally, have an average diameter between 100 and 300 nm, and its size may vary owing to different factors, such as preparation method and, in the case of the NC, the

nature of oil used in the core (Schaffazick et al., 2003). In this work the NC had an average diameter of  $160.9 \pm 2.2$  nm to  $176 \pm 8$  nm, showing that they are considered NC. The zeta potential, in turn, indicates the electric potential of the surface of the nanoparticles, being influenced by the load of formulation components (Schaffazick et al., 2003). Blank nanocapsules, in this study, showed average zeta potential of -13 mV and quinine-loaded nanocapsules of -18 mV. The average pH of blank nanocapsules was 4.8 and of quinine-loaded nanocapsules was 8.4, which is higher owing to presence of drug. The drug content in the NC indicates the amount of drug that is nanocoated with relation to what has been placed for preparation of NC (Schaffazick et al., 2003). In this work, the quinine-loaded nanocapsules showed drug content of  $98.6 \pm 2.89\%$ , indicating good encapsulation efficiency.

**Table 1**  
Physico-chemical characterization of nanocapsules

	Blank Nanocapsules	Quinine-loaded Nanocapsules
Diameter (nm)	$160.9 \pm 2.2$	$176 \pm 8$
Zeta Potential (mV)	$-13.4 \pm 0.8$	$-18.0 \pm 2.2$
pH	$4.8 \pm 0.1$	$8.4 \pm 0.02$
Content (%)	---	$98.6 \pm 2.89$

The results obtained in this study for hematological parameters are shown in the Table 2. The findings show that the treated group with free quinine obtained values significantly decreased ( $p < 0.05$ ) hemoglobin (Hb), hematocrit (Hc) and total erythrocyte count (RBC) compared to the control group. The treated groups with NC had significantly higher values ( $p < 0.05$ ) for Hb, Hc and RBC compared to free quinine group.

**Table 2**  
Hematological parameters in Wistar rats treated with nanocapsules containing quinine.

	Control	Free Quinine	Blank Nanocapsules	Quinine-loaded Nanocapsules
Hemoglobin (g/dL)	$14,02 \pm 0,48$	$11,58 \pm 0,55^a$	$14,24 \pm 0,43^b$	$14,23 \pm 0,27^b$
Hematocrit (%)	$39,50 \pm 0,94$	$35,10 \pm 0,77^a$	$38,93 \pm 0,57^b$	$39,29 \pm 0,68^b$
Red blood cells (RBC) ( $10^6/\text{mm}^3$ )	$6,52 \pm 0,45$	$5,36 \pm 0,17^a$	$6,41 \pm 0,17^b$	$6,42 \pm 0,23^b$
MCV (fL)	$57,83 \pm 1,09$	$50,67 \pm 1,53^a$	$57,00 \pm 0,77^b$	$57,56 \pm 0,51^b$
MCH (pg)	$20,47 \pm 0,467$	$19,38 \pm 0,77^a$	$20,51 \pm 0,78^b$	$20,30 \pm 0,86^b$
MCHC (%)	$35,28 \pm 0,83$	$32,03 \pm 0,49^a$	$34,28 \pm 0,91^{ab}$	$34,99 \pm 0,95^b$
RDW	$14,80 \pm 0,43$	$15,15 \pm 0,24^a$	$14,93 \pm 0,37$	$14,98 \pm 0,40$
Leukocytes ( $10^3/\text{mm}^3$ )	$6,10 \pm 0,24$	$4,68 \pm 0,45^a$	$6,27 \pm 0,20^b$	$6,30 \pm 0,28^b$
Neutrophils (%)	$33,00 \pm 7,05$	$33,17 \pm 4,73$	$32,44 \pm 7,20$	$38,80 \pm 11,08$
Lymphocytes (%)	$61,67 \pm 7,02$	$60,33 \pm 3,79$	$61,94 \pm 7,09$	$57,60 \pm 9,22$
Eosinophils (%)	$1,56 \pm 0,92$	$1,72 \pm 0,46$	$2,16 \pm 1,15$	$2,00 \pm 0,00$
Monocytes (%)	$3,67 \pm 1,857$	$4,83 \pm 1,25$	$3,67 \pm 1,49$	$3,89 \pm 1,94$
Band neutrophil (%)	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$2,27 \pm 1,56^{abc}$
Platelets ( $10^3/\text{mm}^3$ )	$324,33 \pm 19,99$	$96,33 \pm 5,87^a$	$952,61 \pm 49,75^{ab}$	$722,63 \pm 63,91^{abc}$

<sup>a</sup> Significantly different of the control group ( $p < 0.05$ ); <sup>b</sup> Significantly different of free quinine group ( $p < 0.05$ ); <sup>c</sup> Significantly different of blank nanocapsules group ( $p < 0.05$ ).

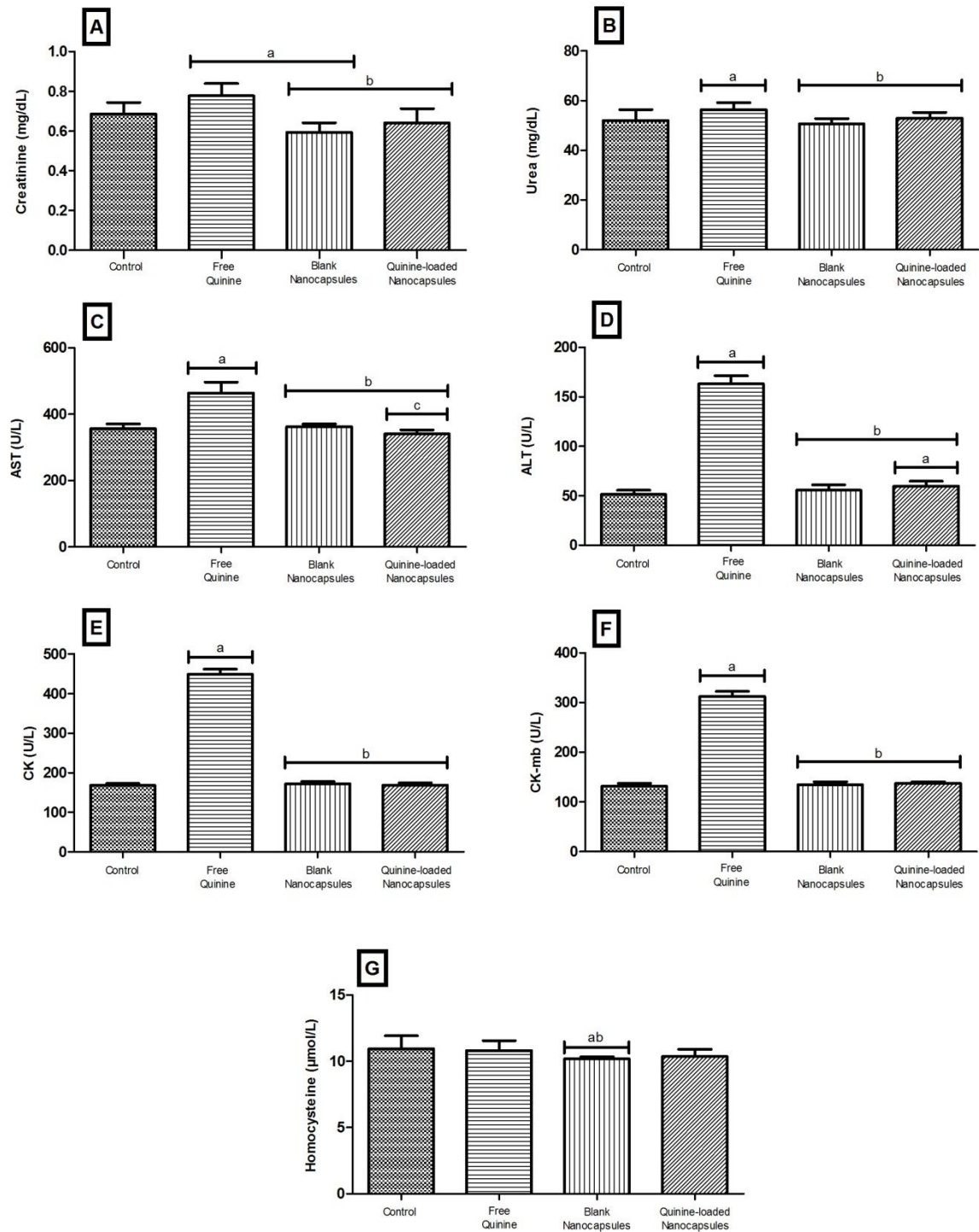
Analyzing white series, it was observed that the overall number of leukocytes was significantly decreased ( $p < 0.05$ ) in the free quinine group compared to the control group and significantly increased ( $p < 0.05$ ) in the treated groups with NC when compared to free quinine group. The differential count white blood cell (WBC) had change only in the number of band neutrophil, which was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the treated group with quinine-loaded nanocapsules when compared to other groups.

The platelet count, in turn, was significantly decreased ( $p < 0.05$ ) in the free quinine group compared to the control group and increased in the treated groups with NC in relation to control groups and free quinine.

The findings of biochemical parameters are shown in Fig. 1. The levels of creatinine (Fig. 1A) were significantly increased ( $p < 0.05$ ) in the free quinine group and significantly decreased ( $p < 0.05$ ) in the treated group with blank nanocapsules compared to the control group and the treated groups with NC showed a significant decrease ( $p < 0.05$ ) relative to free quinine group. Urea (Fig. 1B) showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the free quinine group compared to the control group and a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the treated groups with NC compared to free quinine group.

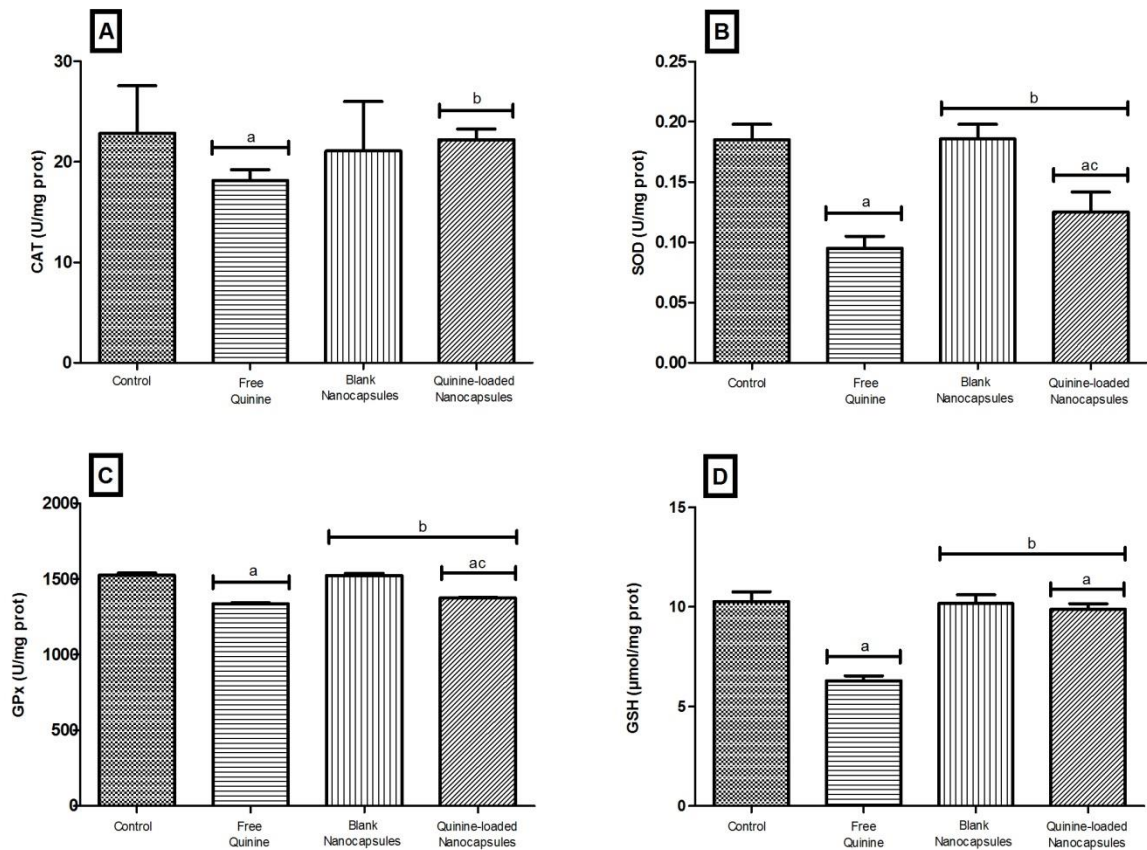
In Fig. 1C and 1D are shown the results for AST and ALT, respectively. The levels of AST showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the free quinine group compared to the control group and significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the treated groups with NC when compared to free quinine group. The results of ALT in the free quinine group and treated group with quinine-loaded nanocapsules were statistically increased ( $p < 0.05$ ) compared to the control group. The treated groups with NC showed significantly lower values ( $p < 0.05$ ) when compared to free quinine group.

The results CK, CK-MB and homocysteine are shown in Fig. 1E, 1F and 1G respectively. Results for CK and CK-MB showed that there was a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the free quinine group compared to control group, and showed that the levels of these parameters were significantly decreased ( $p < 0.05$ ) in treated groups with NC when compared to free quinine group. Homocysteine levels in the treated group with blank nanocapsules were statistically decreased ( $p < 0.05$ ) compared to the control group and the free quinine group.



**Fig. 1.** Biochemical parameters in Wistar rats treated with nanocapsules containing quinine. (A) Values for creatinine. (B) Values for urea. (C) Values for AST. (D) Values for ALT. (E) Values for CK. (F) Values for CK-MB. (G) Values for homocysteine. <sup>a</sup> Significantly different of the control group ( $p < 0.05$ ); <sup>b</sup> Significantly different of free quinine group ( $p < 0.05$ ); <sup>c</sup> Significantly different of blank nanocapsules group ( $p < 0.05$ ).

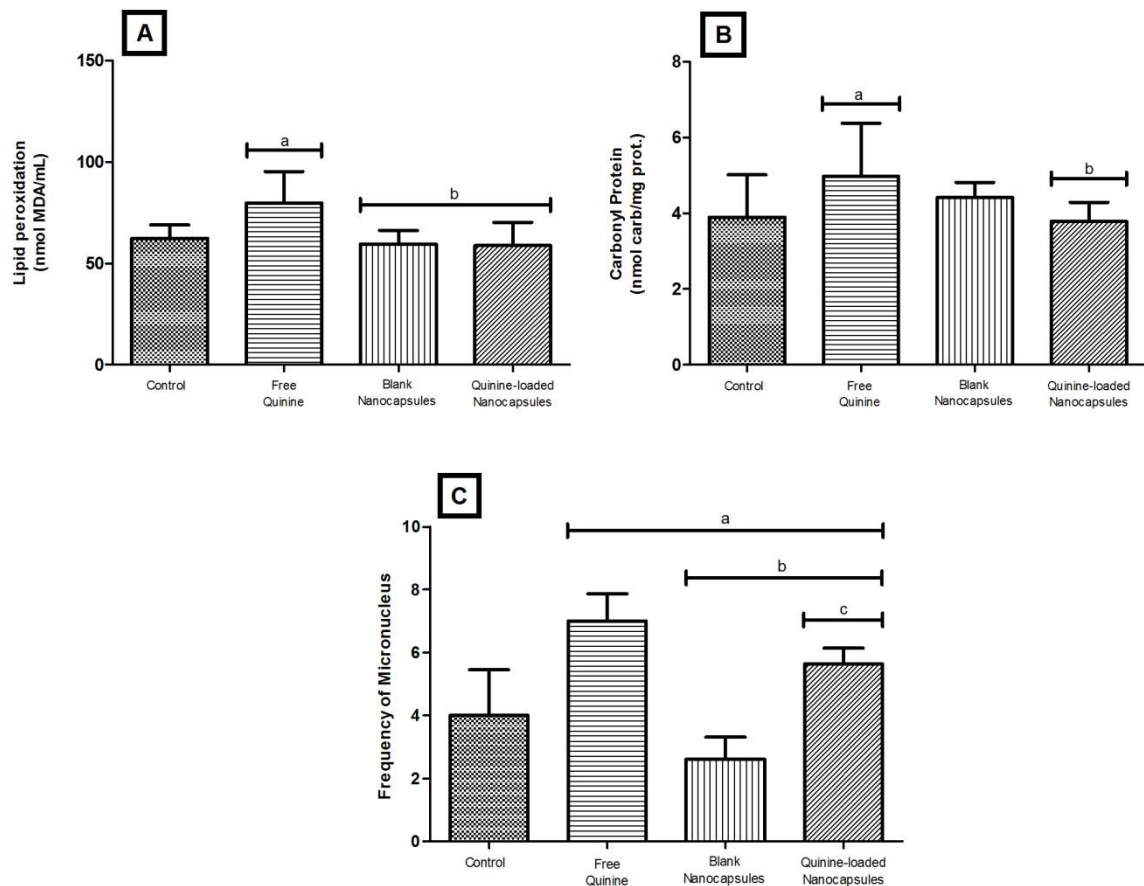
The results obtained for the antioxidant defenses are shown in Fig. 2. The catalase enzyme activity (Fig. 2A) showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the free quinine group compared to control group and a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the treated group with quinine-loaded nanocapsules compared to the free quinine group. Both SOD and GPx activity (Fig. 2B and 2C, respectively) showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in free quinine group and quinine-loaded nanocapsules compared to the control and showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the treated groups with NC compared to the quinine group. GSH levels (Fig. 2D) had significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the free quinine group and quinine-loaded nanocapsules group compared to the control group; treated groups with NC, in turn, achieved a significant increase ( $p < 0.05$ ) in GSH levels as compared to the free quinine group.



**Fig. 2.** Antioxidant defenses in Wistar rats treated with nanocapsules containing quinine. (A) Value for CAT. (B) Value for SOD. (C) Value for GPx. (D) Value for GSH. <sup>a</sup> Significantly different of the control group ( $p < 0.05$ ); <sup>b</sup> Significantly different of free quinine group ( $p < 0.05$ ); <sup>c</sup> Significantly different of blank nanocapsules group ( $p < 0.05$ ).



In Fig. 3 are shown the data obtained for the evaluation of oxidative damage. The levels of TBARS (Fig.3A) demonstrated a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the free quinine group compared to the control group and a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the treated groups with NC when compared to free quinine group. Free quinine group also showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) of carbonyl groups (Fig. 3B) compared to the control group; and the quinine-loaded nanocapsules group showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in this parameter compared to free quinine group. The frequency of micronuclei (Fig. 3C) demonstrated a significant difference ( $p < 0.05$ ) of all treated groups compared to the control group. The treated groups with NC showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) relative to free quinine group.



**Fig. 3.** Markers of oxidative damage in Wistar rats treated with nanocapsules containing quinine. (A) Lipid peroxidation. (B) Protein carbonyl content. (C) Micronucleus Test. <sup>a</sup> Significantly different of the control group ( $p < 0.05$ ); <sup>b</sup> Significantly different of free quinine group ( $p < 0.05$ ); <sup>c</sup> Significantly different of blank nanocapsules group ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Malaria is an important public health problem that still causes hundreds of deaths worldwide. There are several medications available to treat this disease, which the quinine. This drug is a potent antimalarial but had limited use because of their side effects. The use of NC may be a promising alternative to protect the drug and also minimize the adverse effects caused by quinine.

The results found in the blood test showed that treatment with the free quinine induced a significant decrease in the levels of Hb, Hc and RBC, characterizing an anemia, corroborating studies conducted in patients treated with quinine, which also showed this picture (Anjelo et al., 2014; Stroncek et al., 1992). Another study by Osonuga and collaborators (2012a) showed that mice treated with artemether also had anemia. Omotosho and collaborators (2014) demonstrated that the use of chloroquine and artesunate induces a reduction in RBC and Hc, whereas the Hb levels decrease only with the use of chloroquine. According Dhaliwal et al (2004), quinine causes the production of IgM antibody, forming an antibody-drug complex which binds to erythrocytes and activates the complement system, which causes hemolysis.

Regarding the white series, it was found that the treatment with free quinine changed WBC characterizing a leukopenia. These results are in agreement with studies in patients treated with quinine in which it was found that the presence of these hematological disturb (Stroncek et al., 1992; Sutherland et al., 1977). Other studies, involving different antimalarial, also demonstrated the induction capacity of WBC decrease by these treatments (Omotosho et al., 2014; Osonuga et al., 2012a; Shuhua et al., 2002).

The group receiving free quinine showed a significant reduction in the number of platelets. This finding corroborates with studies that revealed reduction platelet counts in patients treated with quinine (Gottschall et al., 1991; Howard et al., 2003). Research suggests that this drug-induced thrombocytopenia is due to an antibody, the presence of the drug, it binds to epitopes on the platelet membrane (Mintezer et al., 2009).

The evaluation of hemogram for the treated group with quinine-loaded nanocapsules suggests that NC is able to generate less damage or normalize levels of hematological parameters compared to treatment with free quinine.

Quinine is a drug that is distributed in various organs of the body. In the heart is able to block sodium channels (Jaeger, 2012), prolong the QT interval on the electrocardiogram (Kinoshita et al., 2010) and has vasodilating action (Riseman et al., 1954). Cardiac function

can be evaluated through blood biomarkers such as CK, present in the skeletal muscle may be elevated in various myopathies, and CK-MB, one of the isoforms of CK, present in myocardium and considered a marker of heart damage (Nigam, 2007).

In the present study CK and CK-MB levels they found significantly increased in the free quinine group compared to the control. The same effect was observed in patients treated with chloroquine (Reffellmann et al., 2006). The cardiovascular damage and the myopathy are among the toxic effects caused by antimalarials (Alkadi, 2007), as well as cardiomyopathy (Teixeira et al., 2002). Treatment with quinine-loaded nanocapsules revealed a significant improvement of these biomarkers, suggesting a protective character of cardiac function.

The liver is also the target of quinine metabolites. The assessment of hepatic function may be performed by serum biomarkers as bilirubin, alkaline phosphatase, ALT and AST. Transaminases are recommended for analysis of hepatocellular injury, and ALT is more sensitive and specific, being found principally in the liver (Singh et al., 2011). Quinine is associated with liver damage, such as granulomatous hepatitis (Katz et al., 1983; Mathur et al., 1990), but there is little evidence of their relationship to changes in transaminases (Livertox, 2015). In this study it was found a significant increase in serum levels of AST and ALT in free quinine group, suggesting hepatics implications. These findings are related to studies in patients treated with this drug (Howard et al. 2003; Katz et al., 1983; Perez et al., 1994). Another study also found that the AST and ALT average of malaria patients treated with quinine or artesunate showed up increased (Rolling et al., 2013).

Serum ALT levels showed up elevated in rats treated with quinine and rich drink quinine (Theophilus et al., 2012) as well as in children diagnosed with cerebral malaria treated with this drug (Abdalla and Zaki, 2009). Normally, quinine has mild hepatotoxic effect and the levels of biomarkers normalize after suspension of treatment, and were not related deaths due to this cause (Livertox, 2015). In addition, other antimalarials change caused these liver enzymes, such as artesunate (Bigonyaa et al., 2015), Coartem (artemether + lumefantrine) (Theophilus et al., 2012), Fansidar® (sulfadoxine + pyrimethamine) (Johnkennedy et al., 2010) and halofantrine (Osonuga et al., 2012b). In this study, the level of transaminases obtained a significant improvement after treatment with quinine nanocoated, suggesting protective character of liver function.

The toxic effects of quinine may also compromise the kidney (Achan et al., 2011; Colley et al., 1989). Renal function can be checked by changing biomarkers such as urea and creatinine (Mounton and Holder, 2006; Theophilus et al., 2012). These survey results showed an increase of these renal parameters in the treated group with free quinine. Studies in animal

models and humans have shown that treatment with quinine caused an increase in creatinine level (Anjelo et al., 2014; Pawar et al., 1994; Theophilus et al., 2012) e de ureia (Anjelo et al., 2014; Colley et al., 1989). Both parameters can also be increased due to the use of drinks containing quinine (Theophilus et al., 2012). The treatment with other antimalarials, as Coartem<sup>®</sup> (Theophilus et al., 2012), Fansidar<sup>®</sup> (Jhonkenedy et al., 2010) e P-Alaxin<sup>®</sup> (Olayinka e Ore, 2013), they can also raise the level of these renal biomarke. An increase in creatinine may signal renal toxicity and elimination deficiency of residue in the body (Theophilus et al., 2012). According to this study, treatment with quinine-loaded nanocapsules presented creatinine and urea values similar to the control group.

This work also demonstrated that treatment with free quinine significantly decreased the activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx, and the level of GSH. The study Olayemi and collaborators (2012) showed a decrease in SOD and glutathione S-transferase (GST) activity due to treatment with quinine and with other antimalarials. In addition, treatment with different antimalarials caused a decrease of antioxidant defenses, such as GSH levels and of GST activity in liver (Farombi et al., 2000), SOD activity in liver and CAT in liver and kidney (Adaramoye et al., 2008), SOD and CAT activity in plasma (Iyawe and Onigbinde, 2009) and SOD activity in serum (Idowu et al., 2015). Akanbi and collaborators (2010) demonstrated reduced levels of GSH and ascorbic acid in infected women or healthy women treated with different antimalarials.

Moreover, these results also showed that treatment with free quinine caused oxidative damage to biomolecules. The proteins are immediate target of oxidative stress, when oxidation occurs their side chains are produced of carbonyl groups that also may be introduced in proteins due to other reactions and can be used as biomarker protein damage, and its accumulation already has been observed in several pathologies (Dalle-Donne et al., 2003; Heidari et al., 2014). In this study it was found that the treatment with free quinine induced protein damage. This finding corroborates with studies report that exposure of human erythrocytes at primaquine (Alanazi, 2010) and hepatocytes at amodiaquine (Heidari et al., 2014) may lead to increased levels of carbonyl groups.

The lipids, in particular polyunsaturated fatty acids, phospholipid components forming the cell membrane, are vulnerable to oxidative stress. The attack of free radicals can cause lipid peroxidation and, hence, change the structure and functions of the cell membrane (Niki, 2014; Rao P et al., 2011). Treatment with free quinine in this work was able to induce lipid peroxidation. This result is in agreement with the study of Ofusori and collaborators (2008), which showed that the quinine can cause lipid damage in the heart muscle, evidenced by the

increase in TBARS levels. Other antimalarials drugs can cause lipid damage in rat liver (Farombi et al., 2000; Srivastava et al., 1993) and serum of healthy or malarial individuals (Akanbi et al., 2010), mice (Iyawe and Onigbinde 2009) and rabbits (Adisa et al., 2011).

This present study also found that the treated group with free quinine showed a significant increase in micronuclei frequency. The micronucleus test is used to investigate permanent damage to the genetic material, whereas the micronucleus are fragments of chromosomes or entire portions that are not included in the nucleus during the cell division and are generated due to DNA damage (Luzhna et al., 2013). These results are consistent with studies which report that treatment with antimalarials drugs such as artesunate (Aquino et al., 2011) and Coartem<sup>®</sup> (Idowu et al., 2015) induce to an increase in micronuclei frequency in rodent bone marrow. It was also observed that the group treated with quinine-loaded nanocapsules showed a significant increase in micronuclei frequency, indicating that the NC minimize genetic damage induced by free quinine, but do not protect fully compared to the control group.

Through analyzing the antioxidant defenses and oxidative damage markers it was found that the NC were able to alleviate the oxidative stress induced by treatment with free quinine, thus minimizing the cytotoxic potential of the drug.

Nanotechnology is a therapeutic novelty, thus don't known exactly the effects of exposure to NC and its toxicity. Furthermore, the mode of interaction between the NC with the organism is not totally clarified, but scientific studies report that the cells can absorb them. It is known that there are several possible mechanisms NC cause toxicological damage, including the generation of reactive species (Elsaesser and Howard, 2012). In this study it was found that the NC was not able to induce notable toxicity in most of the parameters analyzed, in the conditions used, corroborating study of Bulcão and collaborators (2014), an important data for the evaluation of security nanoencapsulated systems.

## **5. Conclusion**

The findings this work suggests that treatment with free quinine may alter hematological, biochemical and oxidative stress parameters and that the administration of nanoencapsulad drug can mitigate these damages. Thus the NC can be an effective instrument for reducing the toxicity of quinine and increase the safety of the treatment for malaria, but more studies are required to elucidate the effects of exposure to NC in the long term.

## Conflicts of interest statement

All authors report no conflict of interest.

## References

- Abdalla, B.E., Zaki, H.Y., 2009. Biochemical study in Sudanese children with Cerebral Malaria during antimalarial treatment (Artemether Vs. Quinine). *Sudan. J. of Paediatricians* 9, 52-59.
- Achan, J., Talisuna, A.O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., Roenthal, P.J., D'Alessandro, U., 2011. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar. J.* 10 (144)
- Adaramoye, O.A., Osaimoje, D.O., Akinsanya, A.M., Nneji, C.M., Fafunso, M.A., Ademowo, O.G., 2008. Changes in Antioxidant Status and Biochemical Indices after Acute Administration of Artemether, Artemether-Lumefantrine and Halofantrine in Rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102, 412–418.
- Adisa R.A., Ogunbayo, O.A., Olorunsogo, O.O., Admowo, O.G., 2011. Sulphadoxine-pyrimethamine alters the antioxidant defense system in blood of rabbit. *Niger. J. Physiol. Sci.*, 26, 207 – 211.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121–127.
- Akanbi, O. M., Odaibo, A. B., Ademowo, O. G., 2010. Effect of Antimalarial Drugs and Malaria Infection on Oxidative Stress in Pregnant Women. *Afr. J. Reprod. Health* 14 (3), 209-212.
- Akerboom, T.P.M., Sies, H., 1981. Assay of Glutathione Disulfide, and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods Enzymol.* 77, 373-382.
- Alanazi, F.K., 2010. Pravastatin provides antioxidant activity and protection of erythrocytes loaded primaquine. *Int. J. Med. Sci.* 7 (6), 358-365.
- Alkadi, H.O., 2007. Antimalarial Drug Toxicity: A Review. *Chemother.* 53, 385–391.
- Anjelo, J., Rao, N., David, V., Otto, S., Russ, G., 2014. Renal-limited thrombotic microangiopathy and acute interstitial nephritis with a single dose of quinine. *Clin. Kidney J.* 7, 311–313.
- Aquino, I., Perazzo, F.F.; Maistro, E.L., 2011. Genotoxicity assessment of the antimalarial compound artesunate in somatic cells of mice. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1335–1339.
- Brasil, 2008. Law n° 11.794, 08 October 2008. [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm). Accessed 26 Jun 2015.

- Brasil, 2010. Ministry of Health. Secretariat of Health Surveillance. Department of Epidemiological Surveillance. Infectious and parasitic diseases: pocket guide. 8 ed. Brasilia: Ministry of Health.
- Brasil, 2013a. Ministry of Science, Tecnology e Inovation National Council for the Control of Animal Experimentation – CONCEA.
- Brasil, 2013b. Ministry of Health. Secretariat of Health Surveillance. Epidemiological malaria situation in Brazil, 2000 to 2011. *Epidemiological Bulletin*, 44 (1).
- Bigonyaa, P., Saha, T., Tiwari, V., 2015. Hematological and biochemical effects of sub-chronic artesunate exposure in rats. *Toxicol. Rep.* 2, 280–288.
- Bulcão, R.P., Freitas, F.A., Dallegrave, E., Venturini, C.G., Baierle, M., Durgante, J., Sauer, E., Cassini, C., Cerski, C.T., Zielinsky, P., Salvador, M., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Garcia, S.C., 2014. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86, 167–177.
- Colley, J.C., Edwards, J.A., Heywood, R., Purser, D., 1998. Toxicity studies with quinine hydrochloride. *Toxicology* 54, 219-226.
- Dhaliwal, G.; Cornett, P.A.; Tierney, L.M., 2004. Hemolytic Anemia. *American Family Physician* 69 (11), 2599-2606.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 329, 23–38.
- Duran-Bedolla, J., Rodrigues, M.H., Saldana-Navor, V., Rivas-Arancibia, S., Cerbon, M., Rodrigues, M.C., 2013. Oxidative stress: production in several processes and organelles during Plasmodium sp development. *Oxid. Antioxid. Med. Sci.* 2 (2), 93-100.
- Elsaesser, A., Howard, C.V., 2012. Toxicology of nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 129–137.
- Farombi, E.O., Olowu, B.I., Emerole, G.O., 2000. Effect of three structurally related antimalarial drugs on liver microsomal components and lipid peroxidation in rats. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 126, 217–224.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., 1988. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. *Eur. Pat.* 274961 A1.
- França, T.C.C., Santos, M.G. dos, Figueroa-Villar, J.D., 2008. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. *Quim. Nova* 31 (5), 1271-1278.
- Gottschall, J.L., Elliot, W., Lianos, E., McFarland, J.G., Wolfmeyer, K., Aster, R.H., 1991. Quinine-Induced Immune Thrombocytopenia Associated With Hemolytic Uremic Syndrome: A New Clinical Entity. *Blood* 77 (2), 306-310.

- Greenwood, B.M., Fidock, D.A., Kyle, D.E., Kappe, S.H.I., Alonso, P.L., Collins, F.H., Duffy, P.E., 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest.* 118 (4), 1266-1276.
- Gürkov, R., Eshetu, T., Miranda, I.B., Berens-Riha, N., Mamo, Y., Girma, T., Krause, E., Schmidt, M., Hempel, J., Löscher, T., 2008. Ototoxicity of artemether/lumefantrine in the treatment of falciparum malaria: a randomized trial. *Malar. J.* 7 (179).
- Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 32 (3), 125-130.
- Haas, S.E. Avaliação da eficácia e farmacocinética de nanocápsulas poliméricas de quinina em ratos infectados com *Plasmodium berghei*. 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.
- Heidari, R., Babaei, H., Eghbal, M.A., 2014. Amodiaquine-induced toxicity in isolated rat hepatocytes and the cytoprotective effects of taurine and/or N-acetyl cysteine. *Res. Pharm. Sci.* 9 (2), 97–105.
- Hortelano, M.G.L., Pérez, V.F., Tomé, M.I.G., 2013. Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la malaria. *Anais de Pediatria (Barc)* 78 (2), 124.e1-124.e8.
- Howard, M.A., Hibbard, A.B., Terrell, D.R., Medina, P.J., Vesely, S.K., George, J.N., 2003. Quinine allergy causing acute severe systemic illness: report of 4 patients manifesting multiple hematologic, renal, and hepatic abnormalities. *BUMC Proceedings* 16, 21–26.
- Idowu, E.T., Alimba, C.G., Olowu, E.A., Otubanjo, A.O., 2015. Artemether-Lumefantrine treatment combined with albendazole and ivermectin induced genotoxicity and hepatotoxicity through oxidative stress in Wistar rats. *Egypt. J. Basic Appl. Sci.* 2, 110-119.
- Iyawe, H.O.T., Onigbinde, A.O., 2009. Impact of Plasmodium berghei and Chloroquine on Haematological and Antioxidants Indices in Mice. *Asian J. Biochem.* 4, 30-35.
- Jaeger, A., 2012. Quinine and chloroquine. *Med.* 40 (3), 154-155.
- Johnkennedy, N., Adamma, ., Austin, A., Chukwunyere, N.E., 2010. Alterations In Biochemical Parameters Of Wister Rats Administered With Sulfadoxine And Pyrimethamine (Fansidar®). *Al. Ameen. J. Med. Sci.* 3 (4), 317-321.
- Katz, B., Weetch, M., Chopra, S., 1983. Quinine-induced granulomatous hepatitis. *Br. Med. J.* 286, 264-265.
- Kinoshita, A., Yamada, H., Kotaki, H., Kimura, M., 2010. Effects of anti-malarial drugs on the electrocardiographic QT interval modelled in the isolated perfused guinea pig heart system. *Malar. J.* 9 (318), 1-5.
- Kumar, A., Zhang, X., Liang, X., 2013. Gold nanoparticles: Emerging paradigm for targeted drug delivery system. *Biotechnol. Adv.* 31, 593–606.



- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Cliement. I., Lenz, A., Ahn, BW., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.
- Livertox, 2015. Quinine. Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <http://livertox.nih.gov/Quinine.htm>. Accessed 26 Jun 2015.
- Luzhna, L., Kathiria, P., Kovalchuk, O., 2013. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Front. Genet.*, v.4, p. 01-17.
- Mathur, S., Dooley, J., Scheuer, P.J., 1990. Quinine induced granulomatous hepatitis and vasculitis. *Br. Med. J.* 300, 613.
- Mintzer, D.M., Billet, S.N., Chmielewski, L., 2009. Drug-Induced Hematologic Syndromes. *Adv. Hematol.* 2009 (7), p. 1-11.
- Mounton, R., Holder, K., 2006. Laboratory tests of renal function. *Anaesth. Intensive Care Med.* 7(7), 240-243.
- Nelson, B., Pfeiffer, C.M., Sniegowski, L.T., Satterfield, M.B., 2003. Development and evaluation of an isotope dilution LC/MS method for the determination of total homocysteine in human plasma. *Anal.Chem.* 75 (4), 775-784.
- Nigam, P.K., 2007. Biochemical markers of myocardial injury. *Indian J. Clin. Biochem.* 22 (1), 10-17.
- Niki, E., 2014. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 809–817.
- Ofusori, D.A., Josiah, S.J., Ayoka, A.O., Omotoso, E.O., Odukoya, S.A., 2008.. Effect of chronic administration of quinine on the myocardium of mice. *J. Appl. Biomed.* 6, 187–193
- Ohkawa, H., Onishi, H., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Okitolonda, W., Delacollette, C., Malengreau, M., Henquin, J.C., 1987. High incidence of hypoglycaemia in African patients treated with intravenous quinine for severe malaria. *Brit. Med. J.* 295, 716-718.
- Olayemi, S. O., Arikawe, A. P., Akinyede, A., Oreagba, A. I., Awodele, O., 2012. Effect of Malarial Treatments on Biochemical Parameters and Plasma pH of Mice Infected with *Plasmodium berghei*. *Int. J. Pharmacol.* 8, 549-554.
- Olayinka, E.T., Ore, A., 2013. Alterations in antioxidant status and biochemical indices following administration of Dihydroartemisinin-Piperazine Phosphate (P-ALAXIN®). *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 5 (4), 43-53.

Omotosho, O.O., Adebisi, M.A., Oyeyemi, M.O., 2014. Comparative study of the haematology and serum biochemistry of male Wistar rats treated with Chloroquine and Artesunate. *J. Phys. Pharm. Adv.* 4 (8), 413-419.

Osonuga, I.O., Osonuga, O.A., Osonuga, A., Onadeko, A.A., Osonuga, A.A., 2012a. Effect of artemether on hematological parameters of healthy and uninfected adult Wistar rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2 (6), 493-495.

Osonuga, I.O., Osonuga, O.A., Osonuga, A., Onadeko, A.A., Osonuga, A.A., 2012b. The acute hepatotoxic effect of halofantrine on healthy and uninfected adult Wistar rats. *Int. J. Pharmacol.* 8, 209-211.

Pawar, R., Jacobs, G.H., Smith, M.C., 1994. Quinine-associated acute interstitial nephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 24 (2), 211-214.

Parveen, S., Misra, R., Sahoo, S., 2012. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med.* 8, 147-166.

Percário, S., Moreira, D.R., Gomes, B.A.Q., Ferreira, M.E.S., Gonçalves, A.C.M., Laurindo, P.S.O.C., Vilhena, T.C., Dolabela, M.F., Green, M.D., 2012. Oxidative Stress in Malaria. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16346-16372.

Perez, J.A., Stryker, J., Arsura, E.L., Hewitt, J.M., 1994. Probable Quinine-induced Hepatotoxicity. *West. J. Med.* 160, 59-60.

Rao P, S., Kalva, S., Yerramilli, A., Mamidi, S., 2011. Free radicals and tissue damage: Role of Antioxidants. *Free Radic. Antioxid.* 1, 2-7.

Reffelmann, T., Naami, A., Spuentrup, E., Köhl, H.P., 2006. Images in cardiovascular medicine. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging of a patient with chloroquine-induced cardiomyopathy confirmed by endomyocardial biopsy. *Circulation* 114, 357-358.

Riseman, J.E.F., Steinberg, L.A., Altman, G.E., 1954. Treatment of Angina Pectoris with Cinchona Alkaloids. *Circulation* 10, 809-823.

Rolling, T., Wichaman, D., Schmiedel, S., Burchard, G.D., Kluge, S., Cramer, J.P., 2013. Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis. *Malar. J.* 12 (241).

Samanidou, V.F., Evaggelopoulou, N.E., Papadoyannis, I.N., 2005. Simultaneous determination of quinine and chloroquine anti-malarial agents in pharmaceuticals and biological fluids by HPLC and fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 21-28.

Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31(9), 9-15.

Schaffazick, C.R.; Guterres, S.S., Freitas, L.L., Pohlmann, A.R., 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím. Nova*, 26, 726-737.

- Shuhua, X., Yuanqing, Y., Qiqing, Y., Utzinger, J., Huifang, G., Peiying, J., Jinying, M., Jian, G., Bergquist, R., Tanner, M., 2002. Potential long-term toxicity of repeat orally administered doses of artemether in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (1), 30–34.
- Singh, A., Baht, T.K., Sharma, O.P., 2011. Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. *J. Clin. Toxicol.*, S:4.
- Srivastava, P., Puri, S.K., Dutta, G.P., Pandey, V.C., 1993. Effect of the antimalarial agents primaquine and (N'-3-acetyl-4-5-dihydro-2-furanyl)-N4-(6-methoxy-8-quinolinyl)l,4-pentane-diamine on oxidative stress and antioxidant defences in mice. *Biochem. Pharmacol.* 46 (10), 1859-1860.
- Stroncek, D.F., Vercellotti, G.M., Hammerschmidt, D.E., Christie, D.J., Shankar, R.A., Jacob, H.S., 1992. Characterization of Multiple Quinine-Dependent Antibodies in a Patient With Episodic Hemolytic Uremic Syndrome and Immune Agranulocytosis. *Blood* 80 (1), 241-248.
- Sutherland, R., Vincent, P.C., Raik, E., Burgess, K., 1977. Quinine-induced agranulocytosis: toxic effect of quinine bisulphate on bone marrow cultures in vitro. *Br. Med. J.* 1, 605-607.
- Tange, R.A., Dreschler, W.A., Claessen, F.A.P., Perenboom, R.M., 1997. Ototoxic reactions of quinine in healthy persons and patients with *Plasmodium falciparum* infection. *Auris Nasus Larynx* 24, 131-136.
- Teixeira, R.A, Martinelli Filho, M., Benvenuti, L.A., Costa, R., Pedrosa, A.A., Nishioka, S.A.D., 2002. Cardiac Damage from Chronic Use of Chloroquine. A Case Report and Review of the Literature. *Arq. Bras. Cardiol.* 79 (1), 85-88.
- Theophilus, J.J., Ubana. E.M., Odey, M.O., Sampson, E.V., Iwara, W.A., Inekwe, V.U., Agba, A.M., 2012. Biochemical and toxicological evaluation of some quinine, quinine-rich drinks and coartem. *Trends in Adv. Sci. and Eng.* 4 (1), 47-52.
- Vusirikala, V., Williams, T.A., Ram, A.R.R., 2005. A late presentation of ocular quinine toxicity managed with a combination of vasodilatory treatments. *Eye* 19, 801–802.
- White, N. J., 1992. Antimalarial pharmacokinetics and treatment regimens. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 34, 1-10.
- White, N.J., 2007. Cardiotoxicity of antimalarial drugs. *Lancet Infect. Dis.* 7, 549–58.
- White, N.J., 2008. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin. Infect. Dis.* 46, 172–17.
- Wolf, L.R., Otten, E.J., Spadafora, M.P., 1992. Cinchonin: two case reports and review of acute quinine toxicity and treatment. *The Journal of Emergency Medicine* 10, 295-301.
- World Health Organization, 2014. WHO Global Malaria Programme. World Malaria Report 2014. Geneva: World Health Organization.

## PARTE III

### 4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho indicam que os sistemas nanoencapsulados:

- Aprimoram parâmetros hematológicos como hemoglobina, hematócrito, eritrócitos e demais índices hematimétricos, porém não houve significado clínico para RDW;
- Normalizam a contagem de células brancas e não alteram o diferencial leucocitário;
- Aumentam a contagem de plaquetas totais;
- Reduzem os níveis dos marcadores de função renal de creatinina e ureia;
- Reduzem os níveis dos marcadores de função hepática AST e ALT;
- Reduzem os níveis dos marcadores cardíacos CK e CK-MB;
- Melhoram a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx;
- Aumentam o nível de GSH;
- Minimizam o dano lipídico, proteico e genético;

Esses resultados evidenciam que as nanocápsulas conferem um caráter protetor, sendo assim, a nanoencapsulação da quinina é uma estratégia promissora para contornar os efeitos adversos desse fármaco, tornando-o mais seguro no tratamento da malária.

## 5 PERSPECTIVAS

Este trabalho tem como perspectivas futuras:

- Realizar a histopatologia dos órgãos;
- Avaliar marcadores inflamatórios (PCR, IL-1B, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ );
- Verificar a biodistribuição do fármaco;
- Verificar o efeito da exposição as nanocápsulas, a longo prazo;
- Realizar estudo com nanocápsulas contendo quinina em roedores infectados com *Plasmodium berghei*;
- Realizar estudo com quinina em diferentes nanossistemas.

## REFERÊNCIAS

- ACHAN, J. et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v.10, n. 144, p. 1-12, 2011.
- ADITYA, N. P.; et al. Advances in nanomedicines for malaria treatment. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 201–202, p. 1–17, 2013.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**, v. 303, p. 1818–1822, 2004.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.
- BANNON, P.; et al. Identification of quinine metabolites in urine after oral dosing in humans. **Journal of Chromatography B**, v. 715, n. 2, p. 387-393, 1998.
- BARRET, A. P.; TVERSKY, J.; GRIFITHS, C. J. Thrombocytopenia induced by quinine. **Oral medicine**, v. 55, n. 4, p. 351-354, 1983
- BAYOMI, M. A.; et al. In vivo evaluation of arteether liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, p. 1-7, 1998.
- BECKER, K.; et al. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 163–189, 2004.
- BONINGTON, A.; et al. Fatal quinine cardiotoxicity in the treatment of falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 305–307, 1996.
- BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Programa Prevenção e Controle da Malária. 2001. Disponível em:  
<<http://www.abrasil.gov.br/nivel3/index.asp?id=28&cod=BUSCA>>, Acesso em: 16 nov.2014.
- \_\_\_\_\_.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. **Boletim Epidemiológico**, v. 44, n. 1, 2013.

CANNING, C. R.; HAGUE, S. Ocular quinine toxicity. **British Journal of Ophthalmology**, v. 72, p. 23-26, 1988.

Centers for Disease Control and Prevention. Malaria Parasites, 2012a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

\_\_\_\_\_. Malaria Parasites, 2012b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

\_\_\_\_\_. About Parasites, 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/about.html>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

CHIKEZIE, P. C.; UWAKWE, A. A. Membrane Lipid Peroxidation of HbAA Erythrocyte of Non-Malarious Participants Administered with Quinine. **Free Radicals and Antioxidants**, v.1, p. 21-25, 2011.

CHIMANUKA, B.; et al. Preparation of  $\beta$ -artemether liposomes, their HPLC–UV evaluation and relevance for clearing recrudescent parasitaemia in *Plasmodium chabaudi* malaria-infected mice. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 13–22, 2002.

CHO, K.; et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p.1310–1316, 2008.

CLAESSEN, F. A.; et al. Quinine pharmacokinetics: ototoxic and cardiotoxic effects in healthy Caucasian subjects and in patients with falciparum malaria. **Tropical Medicine & International Health**, v. 3, n.6, p. 482–489, 1998.

COLTEL, N.; et al. Cerebral malaria – a neurovascular pathology with many riddles still to be solved. **Current Neurovascular Research**, v.1, p. 91-110, 2004.

COUVREUR, P.; FATTAL, E. & ANDREMONT, A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 9, p. 1079-1086, 1991.

CUNICO, W.; et al. Fármacos antimalariais – história e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmácia.**, v.89, n.1, p.49-55, 2008.

DANESHVAR, C.; et al. Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 852-860, 2009.

DONDORP, A. M.; et al. The Relationship between Age and the Manifestations of and Mortality Associated with Severe Malaria. **Clinical Infectious Diseases**, v.47, p. 151–157, 2008.

DONDORP, A. M. et al. The Threat of Artemisinin-Resistant Malaria. **The New England Journal of Medicine**, v. 265, n. 12, 2011.

DURAN-BEDOLLA, J.; et al. Oxidative stress: production in several processes and organelles during Plasmodium sp development. **Oxidants and Antioxidants in Medical Science**, v. 2, n. 2, p 93-100, 2013.

EREL, O.; et al. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malária. **Clinical Biochemistry**, v. 34, p. 341–344, 2001.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p.16–20, 2009.

FENECH, M.; et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, 2011.

FERNANDO, S. D. et al. The impact of repeated malaria attacks on the school performance of children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 6, p. 582–588, 2003.

FERREIRA, I. C. R. F.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, n. 2, p. 32-39, 2007



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

GARCIA, L. S. Malaria. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 93–129, 2010.

Global Malaria Mapper. % of Population at risk, 2013. 2015. Disponível em: <<http://worldmalaria-report.org/>> Acesso em: 01 jun. 2015.

GOLDENBERG, A. M.; WEXLER, L. M. D. Quinine Overdose: Review of Toxicity and Treatment. **Clinical Cardiology**, v. 11, p. 716-718, 1988.

GOTTSCHALL, J. L. et al., Quinine-Induced Immune Thrombocytopenia Associated With Hemolytic Uremic Syndrome: A New Clinical Entity. **Blood**, v. 77, n. 2, p. 306-310, 1991.

GREENWOOD, B. M. et al. Malaria. **Lancet**, v. 365, p. 1487–1498, 2005.

GREENWOOD, B. M. et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, 2008.

GRINTZALIS, K.; et al. Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 59, p. 27–35, 2013.

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

GÜRKOV, R. et al. Ototoxicity of artemether/lumefantrine in the treatment of falciparum malaria: a randomized trial. **Malaria Journal**, v.7, 2008.

GUTTERIDGE, J. C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136-147, 2000.

HAAS, S. E.; et al. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 156–161, 2009.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. **The American Journal of Medicine**, v. 91 (suppl 3C), 1991.

\_\_\_\_\_. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HANS, M. L., LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Sciences**, v. 6, p. 319-27, 2002.

HERWALDT, B. L. Laboratory-Acquired Parasitic Infections from Accidental Exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 659-688, 2001.

HORTELANO, M. G. L. et al. Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la malaria. **Anais de Pediatria (Barc)**. v. 78, n. 2, p. 124.e1-124.e8, 2013.

HOU, M.; et al. Multiple Quinine-Dependent Antibodies in a Patient With Episodic Thrombocytopenia, Neutropenia, Lymphocytopenia, and Granulomatous Hepatitis. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 4806-4811, 1997.

JONES, R. G.; et al. Severe symptomatic hypoglycaemia due to quinine therapy. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 79, p. 426-428, 1986.

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

KIHARA, M.; CARTER, J. A.; NEWTON, C. R. J. C. The effect of Plasmodium falciparum on cognition: a systematic review. Tropical Medicine and International Health, v. II, n. 4, p. 386–397, 2006.

KUMAR, A.; ZHANG, X.; LIANG, X. Gold nanoparticles: Emerging paradigm for targeted drug delivery system. Biotechnology Advances, v. 31, p. 593–606, 2013.

LEITE, E. A.; et al. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. **Life Sciences**, v. 80, p.1327–1334, 2007.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-487, 1990

MANDAL, S. Epidemiological aspects of vivax and falciparum malaria: global spectrum. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.4, Suppl 1, p:S13-S26, 2014.

McGREADY, R.; et al. The effects of quinine and chloroquine antimalarial treatments in the first trimester of pregnancy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 180-184, 2002.

MOSQUEIRA, V. C. F.; et al. Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in *Plasmodium berghei*-infected mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n.4, p.1222-1228, 2004.

NIKI, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 809–817, 2014.

OFUSORI, D. A. et al. Effect of chronic administration of quinine on the myocardium of mice. **Journal of Applied Biomedicine**, v.6, p.187–193, 2008.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annals of Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.

OKITOLONDA, W. et al. High incidence of hypoglycaemia in African patients treated with intravenous quinine for severe malaria. **British Medical Journal**, v. 295, p. 716-718, 1987.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 115, 2010.

PÁBON, A.; et al. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 71–78, 2003.

PAGARO, P. M.; JADHAV, P. Hematological aspects in malária. **Medical Journal of Dr. D.Y. Patil University**, v. 6, p. 175-178, 2013

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, p. 147–166, 2012.

PAWAR, R; JACOBS, G. H.; SMITH, M. C. Quinine-Associated Acute Interstitial Nephritis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 124, n. 2, p: 211-214, 1994.

PERCÁRIO, S.; et al. Oxidative Stress in Malaria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 16346-16372, 2012.

PEREZ, J. A.; et al. Probable Quinine-induced Hepatotoxicity. **The Western Journal of Medicine**, v. 160, n. 1, p. 59-60, 1994.

PHAM-HUY, L. A; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free Radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.

PHILLIPS-HOWARD, P. A., et al. Efficacy of permethrin-treated bed nets in the prevention of mortality in young children in an area of high perennial malaria transmission in western Kenya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68 (suppl 4), p. 23–29, 2003.

PIMENTEL, L. F. et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503-534, 2007.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; et al. Quinine Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships in Uncomplicated Falciparum Malaria. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 47, n.01, p. 3458–3463, 2003

RAO P, S.; et al. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, p. 2-7, 2011.

RAY, P. D.; HUANG, B.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 981-990, 2012.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guababara Koogan, 2011.

ROLLING, T. et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis. **Malaria Journal**, v.12, n. 241, p. 1-8, 2013.

SADANAND, S. Malaria: an evaluation of the current state of research on Pathogenesis and antimalarial drugs. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 83, n. 4, p. 185-191, 2010.

- SAMANIDOU, V. F. ; EVAGGELOPOULOU, E. N.; PAPADOYANNIS, I. N. Simultaneous determination of quinine and chloroquine anti-malarial agents in pharmaceuticals and biological fluids by HPLC and fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 21–28, 2005.
- SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 560–575, 2010.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v.31, n. 9, p. 9-15, 1975.
- SINGH, K. K.; VINGKAR, S. K. Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 347, p. 136–143, 2008.
- SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.
- SPEARING, R. L.; et al. Quinine induced disseminated intravascular coagulation. **Lancet**, v. 336, p.1535–1537, 1990.
- SULLIVAN, D. J.; et al. Common Mechanism for Blockade of Heme Polymerization by Antimalarial Quinolines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 47, p. 31103-31107, 1998.
- SUTHERLAND, R.; et al. Quinine-induced agranulocytosis: toxic effect of quinine bisulphate on bone marrow cultures in vitro. **British Medical Journal**, v. 1, p. 605-607, 1977.
- TANGE, R. A. Ototoxic reactions of quinine in healthy persons and patients with Plasmodium falciparum infection. **Auris Nasus Larynx**, v. 24, p. 131-136, 1997.
- THERÓND, P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 3, p. 373–384, 2000.
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VITOR-SILVA, S. et al. Malaria is associated with poor school performance in an endemic area of the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v.8, n. 230, p. 01-07, 2009.

VUSIRIKALA, V.; WILLIAMS, T. A.; RAM, A. R. R. A late presentation of ocular quinine toxicity managed with a combination of vasodilatory treatments. **Eye**, v.19, p. 801–802, 2005.

WELCH, K. D. et al. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 7, p. 577–583, 2002.

WELLEMNS, T. E.; MILLER, L. H. Two worlds of malaria. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 1496–1498, 2003.

WHITE, N. J. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 172–173, 2008.

WHITE, N. J. et al. Malária. **Lancet**, v. 383, p. 723–735, 2014

WOLF, L. R.; OTTEN, E. J.; SPADAFORA, M. P. Cinchonin: two case reports and review of acute quinine toxicity and treatment. **The Journal of Emergency Medicine**, v.10, p.295-301, 1992.

World Health Organization. WHO Global Malaria Programme. World Malaria Report 2013. Geneva: World Health Organization; 2013a.

\_\_\_\_\_. Management of severe malaria: A practical handbook. Third edition. Geneva, World Health Organization, 2013b.

\_\_\_\_\_. WHO Global Malaria Programme. World Malaria Report 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.

\_\_\_\_\_. WHO Global Malaria Programme. Guidelines for the treatment of malaria – 3rd edition, 2015.

**ANEXO A - Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA**

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

**Pró-Reitoria de Pesquisa**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: [ceua@unipampa.edu.br](mailto:ceua@unipampa.edu.br)

---

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO  
DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: **033/2013**

Título: **ANÁLISE DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, HISTOPATOLÓGICOS,  
BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR ENFECTADOS  
COM *PLASMODIUM BERGHEI* E TRATADOS COM NANOSSISTEMAS CONTENDO  
QUININA**

Data da aprovação: **31/01/2014**

Período de vigência do projeto: De: **01/2014** Até: **01/2017**

Pesquisador: **VANUSA MANFREDINI**

Campus: **URUGUAIANA**

Telefone: **(55) 8407-5737**

E-mail: **vanusamanfredini@unipampa.edu.br**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alessandra S. K. Tamajusuku Neis', written over a horizontal line.

Alessandra S. K. Tamajusuku Neis  
Professor Adjunto  
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA