



LILIANE HENRIQUE TORRES

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
TESTES *IN VITRO* DO ANTIMALÁRICO
PRIMAQUINA EM CICLODEXTRINA**

LAVRAS – MG

2014

LILIANE HENRIQUE TORRES

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E TESTES *IN VITRO* DO
ANTIMALÁRICO PRIMAQUINA EM CICLODEXTRINA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agroquímica, para a
obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Torres, Liliane Henrique.

Caracterização físico-química e testes *in vitro* do antimalárico primaquina em ciclodextrina / Liliane Henrique Torres. – Lavras : UFLA, 2014.

102 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luciana de Matos Alves Pinto.

Bibliografia.

1. Malária. 2. Fármaco - Liberação controlada. 3. Hemólise. 4. Hidroxipropil- β -ciclodextrina. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 616.9362

LILIANE HENRIQUE TORRES

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E TESTES *IN VITRO* DO
ANTIMALÁRICO PRIMAQUINA EM CICLODEXTRINA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agroquímica, para a
obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2014.

Dr. Paulo Sérgio Castilho Preté UFLA

Dra. Josefina Aparecida de Souza UFLA

Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto

Orientadora

LAVRAS – MG

2014

Aos meus pais, Luiz e Lu, por sempre acreditarem em mim e me mostrarem que sou capaz.

Aos meus filhos, Caio e Gabriel, por me ensinarem o verdadeiro significado do amor.

Ao Pablo, meu companheiro de todas as horas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pelo dom da vida e por repor minhas forças a cada nascer de sol. “Tudo posso Naquele que me fortalece (Fl. 4:13)”

Aos meus pais, Lu e Luiz, pelo incentivo que sempre me deram nesta caminhada, por me amarem e me apoiarem.

Ao meu marido, Pablo, por sempre acreditar em minhas escolhas, me acompanhar por onde eu for e por me confortar nos momentos em que eu mais precisei.

Aos meus filhos, Caio e Gabriel, que são pequenas grandes bênçãos na minha vida, agradeço por me ensinarem a ser uma pessoa melhor. Perdoem-me por todas as vezes em que mamãe esteve ausente e jamais se esqueçam do meu amor infinito por vocês.

Ao meu irmão, Luizinho, por me socorrer sempre que eu precisei com os programas de computador e tudo mais. Amo muito você.

À minha orientadora, Luciana, pela oportunidade, pelo aprendizado, carinho e atenção com que me acompanhou durante todo este tempo, e, principalmente, por me acalmar nos momentos de desespero.

Ao professor Carlos Jaime, da Universidade Autônoma de Barcelona, pela disponibilidade em realizar os experimentos de RMN e por ser tão solícito ao responder meus questionamentos e dúvidas.

Ao Paulo Preté, que tanto me ajudou e me ensinou ao longo desta caminhada. Sem você, muito do que está aqui não seria realizado. Obrigada pela generosidade, pelo apoio, pela boa vontade, pelo carinho e pela confiança.

À banca avaliadora, Josy, Paulo e Celeste, pela disponibilidade e contribuições dadas a este trabalho.

A todos os professores da Universidade Federal de Lavras, por me ensinarem um pouco do que sabem. Todos vocês são muito especiais.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica, pelas prosas informais e descontraídas, pelo aconchego e amizade. Em especial, à Xulita, por sempre me ajudar e socorrer com os equipamentos. Ao Lucas e à Adnéia, por serem companheiros, por estarem sempre prontos a me ajudar, pelas trocas de experiências e discussões produtivas, e pela boa vontade que sempre tiveram comigo, meu muito obrigada!

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade de aprender cada vez mais e de realizar este mestrado.

Ao pessoal da escola, que carinhosamente chamo de família Mesquita, pelas vezes que me ampararam, pela amizade e pela oportunidade de poder me aperfeiçoar.

Enfim, a todos os meus familiares e amigos que, direta ou indiretamente, me ajudaram no decorrer desta estrada e que sempre torceram por mim, meus sinceros agradecimentos.

É de coração que agradeço a todos vocês...

Liliane.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas, Graças a Deus, não sou o que era antes (Martin Luther King)

RESUMO

A malária é uma doença típica de países tropicais e que acomete milhões de pessoas todos os anos. É uma infecção no sangue causada pelo parasito intracelular *Plasmodium*, que é transmitido por fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Os sintomas da malária se caracterizam por febre alta, dor de cabeça, dores musculares, calafrios e mal-estar generalizado. A primaquina é o único antimalárico eficiente contra os esquizontes hepáticos e os gametócitos de *P. vivax* e *P. ovale* porém, apresenta efeitos adversos como formação de meta-hemoglobina e hemólise. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, compostos de unidades de glicose e que apresentam a propriedade de formar complexos de inclusão com moléculas hóspedes, melhorando sua estabilidade e solubilidade, diminuindo sua toxicidade e aumentando sua biodisponibilidade. Este trabalho focou na preparação e na caracterização de um complexo de inclusão entre primaquina (PQ) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD), visando à redução de sua toxicidade. O complexo foi caracterizado utilizando-se as técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura e ressonância magnética nuclear. A partir das análises realizadas pôde-se observar que há uma interação entre a molécula de PQ e a HPCD e prever a estequiometria mais provável de complexação (1:2 PQ:HPCD). Diante dos dados obtidos, sugere-se que seja possível que este complexo esteja se formando tanto por inclusão quanto por não inclusão. Nos estudos *in vitro* de liberação da droga, observou-se que a presença de ciclodextrina modifica o sistema de liberação do fármaco, porém, em baixa extensão. A liberação total da primaquina (100%) em solução ocorreu após 4,5 dias de diálise e, para o complexo de inclusão, neste mesmo intervalo de tempo, a liberação foi de aproximadamente 96%. Estudos hemolíticos em eritrócitos humanos revelaram que tanto a PQ livre quanto o complexo, apresentaram efeito lítico nas concentrações acima de 1 mM, sendo que este efeito lítico, para ambos, foi “mascarado” pela oxidação da hemoglobina. Já a HPCD apresentou efeito lítico crescente em concentrações acima de 4 mM. Nas concentrações superiores a 1 mM, tanto a PQ livre quanto o complexo induziram a oxidação da hemoglobina, não havendo diferença significativa entre a forma livre e a complexada. A HPCD não apresentou efeito oxidante sobre a hemoglobina. Diante destes resultados, conclui-se que a formação do complexo, aparentemente, não beneficiou a molécula de PQ, quanto à redução de toxicidade ou à liberação controlada.

Palavras-chave: Malária. Fármaco. Liberação controlada. Hemólise. Hidroxipropil- β -ciclodextrina.

ABSTRACT

Malaria is a disease typical of tropical countries that affects millions of people every year. It is a blood infection caused by the intracellular parasite *Plasmodium* that is transmitted by infected mosquitoes of the genus *Anopheles*. The malaria symptoms are characterized by high fever, headache, muscle aches, chills and general discomfort. Primaquine is the only effective antimalarial against hepatic schizonts and gametocytes of *P. vivax* and *P. ovale*, but has adverse effects such as formation of methaemoglobin and haemolysis. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides composed of glucose units which have the property of forming inclusion complexes with guest molecules, thus improving their stability and solubility, decreasing their toxicity and increasing their bioavailability. This work focused on the preparation and characterization of an inclusion complex between primaquine (PQ) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD), in order to reduce its toxicity. The complex was characterized using the techniques of infrared spectroscopy with Fourier transform, scanning electron microscopy and nuclear magnetic resonance. It was observed from the analyses, that there is an interaction between PQ molecule and HPCD and the most favorable stoichiometry of complexation. With the obtained data, it was possible to suggest that this complex were formed either by inclusion or non-inclusion of the guest molecule. On the *in vitro* studies of drug release, it was observed that the cyclodextrin presence modifies the drug release system, however in low extension. The primaquine total release (100%) in solution occurred after 4.5 days of dialysis and for the inclusion complex, in this same time interval, the release was approximately 96%. Hemolytic studies in human erythrocytes revealed that both in free or complexed PQ, a lytic effect was observed in concentrations above 1 mM and this lytic effect for both was "masked" by hemoglobin oxidation. For HPCD, an increasing lytic effect was observed at concentrations above 4 mM. In concentrations higher than 1 mM, both the free and the complexed PQ induced hemoglobin oxidation, with no significant difference between the free and complexed form. HPCD showed no oxidative effect on hemoglobin. Considering these results, it is concluded that complex formation apparently did not benefit the PQ molecule, regarding the reduction of toxicity or controlled release.

Keywords: Malaria. Drug. Controlled release. Hemolysis. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> , H.I. (hospedeiro intermediário) e H.D. (hospedeiro definitivo).....	21
Figura 2	Estrutura química da pamaquina (A) e da primaquina (B).....	28
Figura 3	Representação esquemática da face interna da membrana eritrocitária.....	34
Figura 4	Representação gráfica da distribuição dos fosfolípidios na bicamada eritrocitária.....	35
Figura 5	Protoporfirina IX (grupamento heme).....	40
Figura 6	Representação esquemática da β -CD e sua estrutura tridimensional.....	44
Figura 7	Representação esquemática da hidroxipropil- β -ciclodextrina.....	46
Figura 8	Espectro de absorção UV-vis da molécula de [PQ] = 25 μ M, à temperatura ambiente.....	58
Figura 9	Determinação da constante de absorvidade molar da PQ em 258nm, à temperatura ambiente.....	59
Figura 10	Espectros de absorbância da PQ de 230 nm a 300 nm (A) e curva de variação da absorbância da PQ (25 μ M) em λ = 258 nm, em função da constante dielétrica do meio (B).....	61
Figura 11	Variação da absorbância da PQ (25 μ M) na presença de HPCD, em diferentes razões molares.....	64
Figura 12	Variação da absorbância da PQ (25 μ M) em água, em uma mistura água:etanol 20:80, v/v e em presença de HPCD.....	65
Figura 13	Espectro de Infravermelho da primaquina pura (PQ), da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD), da mistura física (MF) e do complexo (PQ:HPCD).....	67
Figura 14	Espectro de Infravermelho de superposição da primaquina pura (PQ), da hidroxipropil- β -ciclodextrina(HPCD), da mistura física (MF) e do complexo (PQ:HPCD).....	67
Figura 15	Micrografia eletrônica de varredura da HPCD (A), da PQ (B), da mistura física (C) e do complexo PQ:HPCD (D), com aumento de 1500x.....	69
Figura 16	Representação dos hidrogênios da ciclodextrina.....	71
Figura 17	Espectro de ^1H RMN da hidroxipropil- β -ciclodextrina.....	72

Figura 18	Espectro de ^1H RMN da primaquina.....	73
Figura 19	Espectro de ^1H RMN da HPCD, da PQ livre e do complexo PQ:HPCD.....	74
Figura 20	Gráfico de JobPlot do complexo PQ:HPCD.....	77
Figura 21	Curvas de liberação <i>in vitro</i> para PQ em ausência e presença de HPCD (razão molar 1:1) à 37°C.....	79
Figura 22	Efeito de concentrações crescentes de HPCD, PQ e complexo (PQ:HPCD) sobre eritrócitos íntegros (hematócrito de 0,15%), incubados em solução isotônica (PBS, pH 7,4), a 37°C.....	81
Figura 23	Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 μM) com concentrações crescentes de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em tampão PBS 5mM, pH 7,4, a 37°C.....	83
Figura 24	Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 μM) com concentrações crescentes de HPCD, em tampão PBS 5mM, pH 7,4, a 37°C.....	85
Figura 25	Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 μM) com concentrações crescentes de primaquina, em tampão PBS 5mM, pH 7,4, a 37°C.....	85
Figura 26	Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 μM) com concentrações crescentes do complexo, em tampão PBS 5mM, pH 7,4, a 37°C.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Esquemas de tratamento por infecção para os vários tipos de malária que acometem o ser humano.....	27
Tabela 2	Propriedades físico-químicas de algumas ciclodextrinas.....	45
Tabela 3	Atribuição e deslocamentos químicos dos prótons da HPCD, antes e após complexação com PQ.....	75
Tabela 4	Atribuição e deslocamentos químicos dos prótons da PQ, antes e após complexação com HPCD.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Ciclodextrina
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
Hb	Hemoglobina
HPCD	2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina
Ht	Hematócrito
MetHb	Meta-hemoglobina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
PBS	Tampão fosfato salino
PQ	Primaquina
RMN	Ressonância magnética nuclear
UV-vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Malária.....	18
2.1.1	Ciclo biológico dos plasmódios.....	20
2.2	Fármacos antimaláricos.....	24
2.2.1	Primaquina.....	28
2.2.1.1	Farmacocinética da primaquina.....	29
2.2.1.2	Mecanismo de ação da primaquina.....	30
2.2.1.3	Toxicidade da primaquina.....	31
2.3	Membrana eritrocitária.....	33
2.3.1	Hemólise isotônica.....	36
2.3.2	Dano oxidativo ao eritrócito.....	38
2.3.2.1	Hemoglobina.....	39
2.4	Ciclodextrinas.....	43
2.4.1	Estrutura química.....	43
2.4.2	Complexos de inclusão.....	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1	Caracterização ótica da primaquina.....	51
3.1.1	Comprimento de onda máximo e absorvidade molar.....	51
3.1.2	Comportamento da primaquina em ambiente com diferentes constantes dielétricas.....	51
3.2	Preparação do complexo entre a primaquina e hidroxipropil- β -ciclodextrina.....	52
3.3	Caracterização do complexo.....	52
3.3.1	Cinética de formação do complexo.....	52

3.3.2	Avaliação espectrofotométrica da interação PQ: HPCD.....	53
3.3.3	Análise por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	53
3.3.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
3.3.5	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	54
3.4	Testes <i>in vitro</i>	55
3.4.1	Hemólise isotônica.....	55
3.4.2	Oxidação da hemoglobina.....	56
3.4.3	Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1	Caracterização ótica da primaquina.....	58
4.1.2	Comprimento de onda máximo e absorvidade molar.....	58
4.1.3	Comportamento da primaquina em ambiente com diferentes constantes dielétricas.....	60
4.2	Caracterização do complexo de inclusão.....	62
4.2.1	Cinética de formação do complexo de inclusão.....	62
4.2.2	Avaliação espectrofotométrica da interação PQ:HPCD.....	63
4.2.3	Análise por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	66
4.2.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	69
4.2.5	Análise por ressonância magnética nuclear (RMN).....	70
4.3	Testes <i>in vitro</i>	78
4.3.1	Teste de liberação <i>in vitro</i>	78
4.3.2	Testes hemolíticos em condições isotônicas (liberação de Hb).....	80
4.3.3	Efeito oxidativo dos compostos sobre a hemoglobina.....	83
4.3.4	Testes de oxidação da hemoglobina.....	84
5	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma das doenças mais comuns em regiões tropicais e subtropicais do mundo e, ainda nos dias de hoje, é responsável por cerca de um milhão de mortes a cada ano. É uma doença infecciosa, causada pelo parasita intracelular *Plasmodium*, que é transmitido por fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, que se encontram distribuídos pela África, Ásia e América Latina. Na sua forma mais complicada, causa convulsão, hiperparasitemia, icterícia, anemia intensa, hemorragias e hipotensão arterial, levando, em muitas das vezes, o indivíduo infectado ao óbito.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013), no ano de 2012, foram diagnosticados mais de 207 milhões de casos de malária em cerca de 100 países. Somente no Brasil, em 2012, foram relatados mais de 242 mil casos e 64 mortes.

A primaquina (PQ), um antimalárico pertencente à família das 8-aminoquinolinas, apresenta alto valor clínico no tratamento da malária, especialmente por causa de seu amplo espectro de atividade contra todas as quatro espécies de plasmódios que são patogênicas para o ser humano e que são *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Esta droga é também muito importante por ser o único medicamento, disponível no momento, capaz de destruir a fase hipnozoítica do parasita e impedir as recaídas, além de atuar também como profilático, gametocida, esporonticida e auxiliar na cura radical em indivíduos infectados com *P. vivax* e *P. ovale*.

Apesar da sua importância clínica, a utilidade desta droga tem sido limitada, devido aos seus efeitos secundários, tais como distúrbios gastrointestinais, redução no número de leucócitos no sangue circulante, anemia hemolítica e meta-hemoglobinemia com cianose, particularmente em pacientes com deficiência da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase. Esta enzima é

reponsável pelo metabolismo eritrocitário, tanto na obtenção de energia a partir da glicose quanto na sua proteção contra agentes oxidantes. Sendo assim, a primaquina é contraindicada para gestantes e pessoas com deficiência da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase.

Os efeitos adversos da primaquina se dão, principalmente, por serem necessárias repetidas e elevadas doses do medicamento para o tratamento da doença, devido à sua baixa disponibilidade oral. São necessários, então, estudos de melhoramento desta droga, a fim de diminuir a sua toxicidade e melhorar a biodisponibilidade.

As ciclodextrinas (CD) naturais α , β e γ , e seus derivados sintéticos, têm propriedades químicas e estruturais que lhes permitem encapsular moléculas convidadas, obtendo-se complexos de inclusão que podem melhorar a estabilidade de medicamentos contra hidrólise, oxidação e desidratação, possibilitar que as substâncias encapsuladas sejam mais solúveis ou menos voláteis, prevenir as interações fármaco-fármaco, além de possibilitar a liberação controlada desse medicamento, podendo, assim, ocasionar a redução no número de doses administradas (MATIOLI, 2000).

Sendo assim, com base na problemática apresentada, a proposta central desta dissertação foi a encapsulação molecular do antimalárico primaquina com ciclodextrinas, a fim de diminuir sua toxicidade sistêmica e aumentar sua biodisponibilidade no organismo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Malária

A malária, também conhecida como paludismo ou febre palustre, continua sendo uma das mais importantes doenças parasitárias da atualidade. É uma doença infecciosa, causada pelo parasita intracelular *Plasmodium*, que é transmitido por fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, que se encontram distribuídos pela África, a Ásia e a América Latina (KUMAR et al., 2010).

Dados do Centers for Disease Control and Prevention (2012) mostram que a malária é a quinta doença causadora de mortes em países de baixa renda de todo o mundo, ficando somente atrás das infecções respiratórias, da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), das doenças diarreicas e da tuberculose.

De acordo com a World Health Organization (2013), no ano de 2012, foram relatados cerca de 207 milhões de casos de malária o que causou cerca de 627.000 mortes em todo o mundo. Estima-se que, em 2013, cerca de 3,4 bilhões de pessoas estariam em áreas de risco de malária, principalmente na África e no sudeste da Ásia, dos quais 1,2 bilhão são de alto risco. A maioria das mortes ocorre entre crianças menores de cinco anos que vivem na África, onde uma criança morre a cada minuto, de malária. Em áreas de alto risco, ocorre mais do que um caso de malária a cada 1.000 habitantes.

Segundo o grupo de estudos de Arevalo-Herrera et al. (2012), aproximadamente 60% dos casos de malária nas Américas são relatados no Brasil, quase que exclusivamente restrita à região Amazônica, sendo os outros 40% notificados em Colômbia, Peru, Venezuela, Bolívia, Caribe e alguns países da América Central, como Guatemala, Panamá e Honduras e, ainda, um número

bastante reduzido no México. Segundo a World Health Organization (2013), no Brasil, em 2012, foram registrados 242.758 casos de malária e 64 mortes.

O rápido desmatamento e as práticas agrícolas estão diretamente relacionados com o aumento da diversidade e a abundância de espécies de *Anopheles*, bem com o número de casos de malária. Além disso, as mudanças climáticas afetam profundamente a transmissão da malária em algumas regiões da América do Sul (AREVALO-HERRERA et al., 2012).

A malária também pode ser transmitida por transfusão de sangue infectado com o parasita, por via congênita ou pelo compartilhamento de agulhas por pessoas infectadas, mas a forma de transmissão mais frequente é pela picada de fêmeas infectadas por parasitas (GOODMAN; GILMAN, 2012). Dentre os parasitas que podem infectar o homem, podem-se citar *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*, sendo todas as espécies encontradas no Brasil, com exceção do *P. ovale*, que ocorre apenas no continente africano. Somente *P. vivax* e *P. ovale* são responsáveis por recaídas tardias, após a infecção inicial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a).

A malária é uma doença sistêmica que causa febre, acompanhada de calafrios, sudorese profusa e cefaleia, que ocorrem em ciclos regulares, conforme o tipo de parasita. Provoca alterações na maioria dos órgãos do homem, podendo variar sua gravidade de leve a muito grave e ser, até mesmo, fatal. Na sua forma mais grave e complicada, os principais sintomas são temperatura corporal acima de 41 °C, convulsão, hiperparasitemia ($> 200.000 \text{ mm}^3$), vômitos frequentes, icterícia, anemia intensa, hemorragias e hipotensão arterial. A principal ação patogênica da doença é a redução da capacidade de transporte de oxigênio pelo indivíduo infectado, sendo ocasionada devido à destruição de um elevado número de hemácias, pelo rompimento destas ao

liberar os merócitos do parasita (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a; REY, 2002).

2.1.1 Ciclo biológico dos plasmódios

Os protozoários do gênero *Plasmodium* têm um ciclo de vida dividido entre um hospedeiro vertebrado (homem) e um hospedeiro invertebrado (inseto vetor), sendo o mosquito o hospedeiro definitivo e o homem tem a única função de permitir que o parasita infecte outros mosquitos, possibilitando que o ciclo sexuado do parasita aconteça, já que em seres humanos este ciclo é assexuado (RANG et al., 2007).

O ciclo inicia-se conforme se pode acompanhar na Figura 1, quando um inseto infectado pica uma pessoa, inoculando, na circulação desta, formas infectantes do *Plasmodium*, chamadas de esporozoítos, que estavam acumuladas nas glândulas salivares do inseto. Dentro de 30 a 60 minutos, esses esporozoítos vão invadir as células do fígado, transformando-se, então, em estruturas conhecidas como trofozoítos pré-eritrocíticos, que iniciarão um ciclo de reprodução assexuada, os quais darão lugar a milhares de filhos: os merozoítas. Essa primeira fase do ciclo é assintomática e pode durar de 6 a 16 dias, sendo conhecida como exo-eritrocítica, pré-eritrocítica ou tecidual (GOODMAN; GILMAN, 2012; REY, 2002).

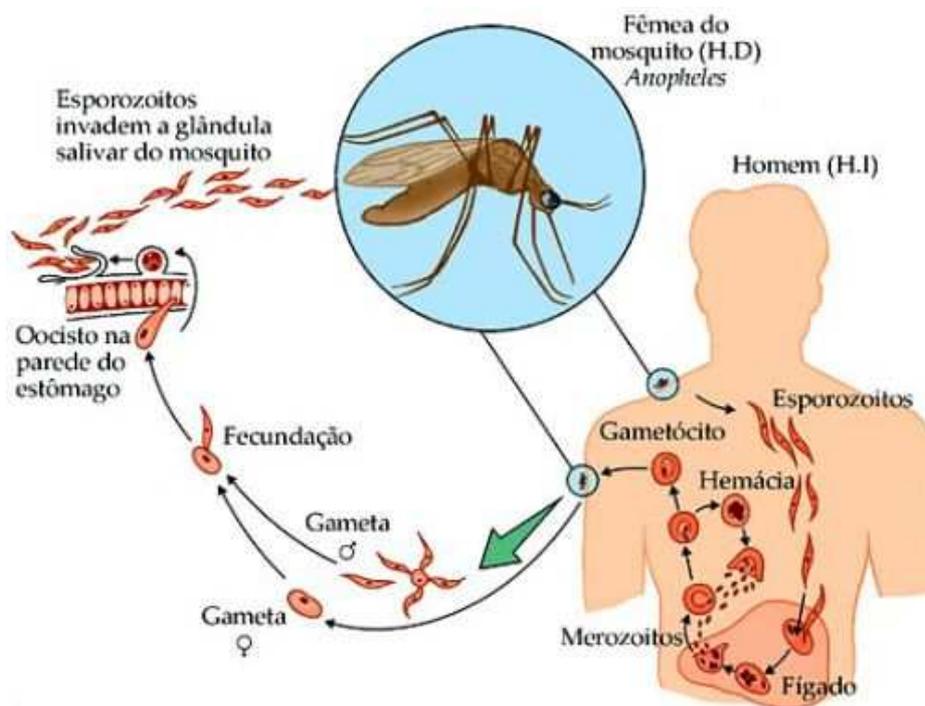


Figura 1 Ciclo de vida do *Plasmodium*, H.I. (hospedeiro intermediário) e H.D. (hospedeiro definitivo)
 Fonte: NOSSO MEIO POR INTEIRO, 2011.

A célula hepática fica distendida e degenerada, devido aos milhares de merozoítas e rompe-se, liberando-os na corrente sanguínea, na qual muitos são fagocitados pelas células de Kupffer, que são responsáveis por destruir restos de células, vírus e todo elemento estranho das células. Os merozoítas invadem os eritrócitos, formando parasitas móveis, chamados trofozoítos, iniciando, assim, o ciclo eritrocítico. É nesta fase que aparecem os primeiros sintomas da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; RANG et al., 2007; REY, 2002).

Nas infecções causadas pela malária *vivax* e *ovale*, alguns parasitas se desenvolvem rapidamente, enquanto outros apresentam um desenvolvimento mais lento, entrando num estado de latência no hepatócito, sendo, assim,

chamados de hipnozoítos (do grego *hipnos*, sono). Esses hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação, geralmente em períodos de seis meses a um ano após a infecção inicial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b; NEVES, 2003).

Na fase sanguínea do ciclo, o desenvolvimento do parasita se dá por esquizogonia, com conseqüente formação de outros merozoítos que se multiplicam por divisão binária, rompem as hemácias e caem novamente na corrente sanguínea, invadindo e rompendo outras hemácias. Depois de algum tempo de evolução da infecção da malária, alguns se diferenciam em formas sexuadas: os macrogametas (feminino) e os microgametas (masculino). Esses gametas, no interior das hemácias (gametócitos) que não mais se dividem, irão seguir seu desenvolvimento quando ingeridos pelos insetos vetores, dando origem aos esporozoítos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b; NEVES, 2003).

De acordo com o tipo de malária, este ciclo eritrocítico, ou seja, a formação de novos parasitas eritrocíticos repete-se em intervalos regulares no sangue, sendo responsáveis pelos picos febris. O ciclo do *P. falciparum* repete-se de 36 a 48 horas, produzindo a febre terçã maligna (terçã porque ocorre a “cada terceiro dia” e maligna por ser a mais perigosa). O *P. vivax* apresenta ciclo de 48 horas e é responsável pela malária terçã benigna, por ser mais branda. O *P. ovale*, com ciclo também de 48 horas, é responsável por outro tipo de febre terçã benigna e o *P. malariae* causa, febre quartã, por apresentar ciclo de 72 horas. Esta periodicidade está relacionada com as crises febris altas, características da malária sintomática (REY, 2002).

No período em que os trofozoítos se encontram no interior da célula, estes as modificam, inserindo nela proteínas e fosfolípídeos parasitários e se alimentam da hemoglobina da célula humana ou, ainda, de alguns componentes

do plasma, como glicose, metionina, biotina, purinas e pirimidinas, fosfato e ácido paraminobenzoico. A digestão da hemoglobina se faz por meio do vacúolo digestivo do parasita, ocorrendo a formação de monômeros ou dímeros de ferriprotoporfirina IX (heme), meta-hemoglobina e proteínas plasmodiais. Esse heme livre, tóxico para o plasmódio, é transformado em hemozoína, também chamada de pigmento malárico. Este pigmento se acumula no citoplasma do eritrócito humano e, posteriormente, é liberado no plasma, sendo fagocitado pelas células de Kupffer. Alguns antimaláricos agem na inibição da enzima parasitária responsável por este passo (NEVES, 2003; RANG et al., 2007).

A malária causada por *P. falciparum* é a mais perigosa, pois pode invadir hemácias de qualquer idade, capturando-as na vasculatura, gerando endotoxinas, provocando um alto índice de parasitemia, hipoglicemia, choque, falência múltipla de órgãos e morte, se não tratada. O *P. vivax* invade somente hemácias imaturas, pois somente se liga a proteínas específicas destes reticulócitos, causando baixa parasitemia, mas pode causar recidivas, devido às suas formas exoeritrocíticas que podem persistir por anos. O *P. ovale* também tem preferência por hemácias jovens e apresenta parasitemia mais baixa ainda do que o *P. vivax*. O *P. malariae* ataca hemácias com mais de 120 dias (senescentes), causando um baixo grau de infecção e baixa parasitemia e, assim como a malária, de *P. falciparum* não apresenta estágio exoeritrocítico (GOODMAN; GILMAN, 2012; RANG et al., 2007).

Um inseto, ao picar uma pessoa portadora de gametócitos, os ingere e estes gametócitos, no interior do organismo do inseto, se unem, formando um zigoto que, após um determinado tempo, se desloca através de movimentos amebóides, sendo chamado de oocineto e se acomoda na parede intestinal do inseto. Neste estágio, já chamado de oocisto, segrega um envoltório protetor e inicia a esporogonia (multiplicação esporogônica), formando milhares de elementos-filhos (esporozoítas), que rompem o oocisto e migram para as

glândulas salivares do inseto, que irão para a corrente sanguínea do homem, quando for picado por este inseto (REY, 2002).

2.2 Fármacos antimaláricos

Os fármacos indicados no tratamento da malária são caracterizados pelo ciclo evolutivo do parasita e pelos objetivos do seu uso: para evitar a doença ou para tratá-la. Segundo Rang et al. (2007),

- os fármacos utilizados para tratar a forma aguda da doença, ou seja, os que promovem a cura clínica, são os chamados **agentes esquizonticidas sanguíneos** e atuam nas formas eritrocíticas do parasita. Os principais fármacos pertencentes a essa classe são: quinina, mefloquina, cloroquina, halofantrino, sulfonas, pirimetamina, proguanila, atovaquona e algumas combinações destes com tetraciclina, doxiciclina, artemeter, artefleno e artesunato;
- os fármacos utilizados para a cura radical são os chamados **agentes esquizonticidas teciduais**, que atuam na forma hepática do plasmódio e causam a destruição dos gametócitos, evitando, assim, a transmissão para o mosquito vetor. Os únicos fármacos pertencentes a essa classe são a **primaquina** e a tafenoquina;
- os fármacos **profiláticos causais** são os utilizados para quimioprofilaxia e atuam bloqueando a ligação entre os estágios hepáticos e eritrocíticos do parasita. São muito utilizados em pessoas que pretendem viajar para áreas endêmicas e devem ser tomados com uma semana de antecedência da viagem. Os fármacos usados neste processo são cloroquina, mefloquina, proguanila, pirimetamina, dapsona e doxiciclina;
- os **gametocidas** têm a função de bloquear a transmissão por meio da eliminação dos gametócitos, evitando a propagação da doença, mas os

fármacos não são muito utilizados somente para esta finalidade. Exemplos de gametocidas são **primaquina**, proguanil e pirimetamina.

De acordo com o Ministério da Saúde (2001), os antimaláricos também podem ser classificados de acordo com os grupos químicos de sua estrutura: **arilaminoálcoois** (quinina, mefloquina e halofantrina), **4-aminoquinolinas** (cloroquina e amodiaquina), **8-aminoquinolinas** (primaquina), **peróxido de lactonasesquiterpênica** (derivados da artemisinina), **naftoquinonas** (atovaquona) e **antibióticos antimaláricos** (tetraciclina, doxiciclina e clindamicina).

Os complexos ciclos de vida dos plasmódios que causam a malária explicam a exigência de duas ou mais terapias, para eliminá-los. Esquizontocidas sanguíneos eliminam as formas assexuadas responsáveis pela malária clínica. Hipnozoitocidas matam as formas silenciosas do fígado que são responsáveis pelas recaídas e os gametocidas eliminam os estágios sanguíneos sexuais que podem infectar mosquitos. Muitas opções terapêuticas existem para terapia esquizontocida sanguínea, mas a primaquina é a única droga que atua como hipnozoitocida e atua também como gametocida, juntamente com outras drogas (BAIRD; SURJADJAJA, 2011).

Além de avaliar o ciclo evolutivo do parasita para escolha do fármaco, devem-se avaliar também sua segurança e farmacocinética. A quinina e a primaquina não são utilizadas como profiláticas, sendo mais utilizadas quando a infecção já se encontra instalada, devido a estes medicamentos terem uma toxicidade comum e meia-vidas curtas. Já a cloroquina, que apresenta meia-vida de aproximadamente 7 dias e baixa toxicidade, é utilizada como profilática em áreas não sensíveis a ela (GOODMAN; GILMAN, 2012).

Desde 1910, já foram relatados casos de resistência adquirida dos plasmódios às drogas antimaláricas, em especial a cloroquina, inicialmente no

Brasil e, posteriormente, em outras regiões da América do Sul, América Central ao leste do Canal do Panamá, Pacífico Ocidental, Ásia, Índia e África. Os mecanismos pelos quais os parasitas apresentam resistência aos quimioterápicos ainda não foram completamente elucidados. Sabe-se apenas que estes parasitas concentram baixos níveis do fármaco em seu organismo. Essa resistência pode ser devida, principalmente, à ocorrência de mutações espontâneas dos plasmódios ou a uma seleção de parasitas sensíveis e resistentes aos medicamentos. O surgimento desses parasitas resistentes ameaça tornar os antimaláricos utilizados atualmente ultrapassados, sendo constantemente necessária a busca de novos medicamentos antimaláricos (GOODMAN; GILMAN, 2012; REY, 2002).

O Ministério da Saúde, por meio do Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b) e do Guia de Bolso de Doenças Infecciosas e Parasitárias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a), recomenda os esquemas de tratamento para a malária, que estão listados na Tabela 1.

Estes medicamentos, bem como orientações de combate e prevenção da malária, são disponibilizados gratuitamente no Brasil, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS). Vários fatores influenciam o tratamento do paciente com malária, como a espécie do parasita infectante, a área em que a infecção foi adquirida e seu status de resistência aos antimaláricos, o estado clínico do paciente, qualquer doença que o acompanhe ou condição de gravidez. Deve-se fazer, primariamente, uma avaliação de todas estas condições e, então, fazer a escolha do antimalárico, sendo necessária, na maioria das vezes, a combinação de dois ou mais medicamentos.

Tabela 1 Esquemas de tratamento por infecção para os vários tipos de malária que acometem o ser humano

Malária não complicada	
Tipo de parasita infectante	Medicação
<i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i>	Cloroquina, 3 dias e primaquina, 7 dias (esquema curto) ou cloroquina, 3 dias e primaquina, 14 dias (esquema longo) (medicação não indicada para gestantes)
<i>P. malariae</i> para todas as idades e <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i>	Cloroquina, 3 dias (indicada para gestantes e crianças com menos de 6 meses)
Prevenção de recaídas frequentes por <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i>	Cloroquina semanal, por 12 semanas
<i>P. falciparum</i>	Combinação de artemeter e lumefantrina, por 3 dias ou artesunato e mefloquina, por 3 dias
<i>P. falciparum</i>	Combinação de artemeter e lumefantrina, por 3 dias ou artesunato e mefloquina, por 3 dias ou quinina mais clindamicina, do 1º ao 3º dia e clindamicina, no 4º e no 5º dia (indicada para gestantes e crianças menores de 6 meses)
Infecções mistas de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i>	Artemeter e lumefantrina ou artesunato e mefloquina, do 1º ao 3º dia e primaquina, do 7º ao 10º dia.
Malária grave e complicada em todas as faixas etárias	
<i>P. falciparum</i>	Artesunato e clindamicina ou artemeter e clindamicina (não indicado para gestantes no 1º trimestre)
<i>P. falciparum</i>	Quinina e clindamicina (indicado para gestantes no 1º trimestre e crianças menores de 6 meses)

Nos Estados Unidos, a maioria das drogas utilizadas no tratamento é ativa contra as formas de parasitas no sangue (a forma que causa a doença) e inclui: cloroquina, atovaquona-proguanil, artemeter-lumefantrina, mefloquina, quinina, quinidina, doxiciclina (utilizada em combinação com quinina), clindamicina (utilizada em combinação com quinina) e artesunato (não licenciada para uso nos Estados Unidos, mas está disponível através da Malária CDC hotline). Além desses, a primaquina é utilizada contra as formas de parasitas dormentes no fígado (hipnozoítas) e previne recaídas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012).

2.2.1 Primaquina

O mais antigo antimalárico da família das 8-aminoquinolinas, conhecido como pamaquina ou plasmochin, foi sintetizado em 1925 e foi capaz de destruir gametócitos do parasita, quando utilizado em combinação com a quinina. Ele foi útil para a prevenção de recaídas por *P. vivax*, mas teve como desvantagem sua elevada toxicidade, o que levou ao abandono de seu uso terapêutico. Mesmo assim, a pamaquina representou um avanço para o desenvolvimento de um novo antimalárico, em 1946, por Elderfield e colaboradores, nos Estados Unidos. Este composto, chamado primaquina (PQ), foi testado com sucesso em prisioneiros da Segunda Guerra Mundial. A estrutura química da pamaquina e a da primaquina estão representadas na Figura 2. Outros antimaláricos, como a pentaquine ou a isopentaquine, também apareceram na década de 1940, mas a PQ foi o que apresentou a maior eficácia e menores níveis de toxicidade (VALE; MOREIRA; GOMES, 2009).

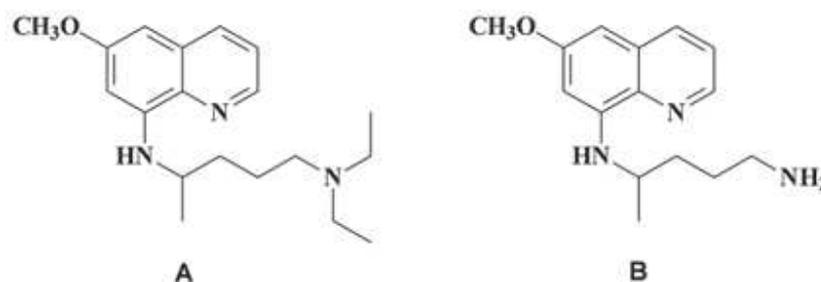


Figura 2 Estrutura química da pamaquina (A) e da primaquina (B)

A primaquina [(4RS)-N4-(6-metoxi-8-quinolinil)-1,4-diaminopentano difosfato] pertence à classe das amino-8-quinoleínas, que constituem a única classe de fármacos eficiente contra os esquizontes hepáticos e os gametócitos de

P. vivax e *P. ovale*. Apresenta elevado valor clínico para a cura definitiva depois de surto agudo de malária, por impedir as recaídas e destruir os gametócitos. Apesar de ser ativa contra os estágios hepáticos de *P. falciparum*, mostra-se não eficaz contra o seu estágio eritrocítico, não sendo, portanto, utilizada como tratamento para a malária provocada por *P. falciparum* (GOODMAN; GILMAN, 2012; REY, 2002).

A primaquina é útil para combater a malária em três frentes distintas:

- (i) profilaxia primária contra todas as espécies de malária;
- (ii) profilaxia terminal (recidivas) para pessoas extensivamente expostas à *P. vivax* ou *P. Ovale*;
- (iii) cura radical em indivíduos infectados com *P. vivax* ou *P. ovale*.

Em regiões endêmicas, a PQ é utilizada como um gametocida para impedir a transmissão da infecção do hospedeiro humano para os mosquitos, bloqueando, assim, a propagação da doença (VALE; MOREIRA; GOMES, 2009). A administração da PQ deve ser associada a um esquizotocida sanguíneo, sendo, na maioria das vezes, a cloroquina a droga escolhida, erradicando-se, assim, os estágios eritrocíticos dos plasmódios e reduzindo a possibilidade de resistência medicamentosa (GOODMAN; GILMAN, 2012). Embora raras, já foram relatadas algumas evidências de sensibilidade a algumas cepas de *P. vivax*, demonstrando alguma resistência dos plasmódios à PQ (RANG et al., 2007).

2.2.1.1 Farmacocinética da primaquina

A primaquina administrada por via parenteral causa hipotensão, por isso é dada apenas por via oral. É rapidamente absorvida no trato gastrointestinal e concentra-se no fígado, no cérebro, no coração, nos pulmões e no músculo esquelético. Há picos no plasma no período de 1 a 3 horas, numa concentração

de aproximadamente 70 mg mL⁻¹. Ela é rapidamente excretada na urina, com uma meia-vida de 4 a 9 horas, e apenas uma pequena fração é excretada na forma do seu fármaco original. Seu metabolismo é complexo e pouco compreendido. Entre os vários metabólitos conhecidos ou suspeitos, nenhum foi definitivamente ligado à atividade contra o parasita *Plasmodium* (BAIRD; HOFFMAN, 2004; GOODMAN; GILMAN, 2012).

2.2.1.2 Mecanismo de ação da primaquina

O mecanismo de ação da primaquina não é completamente entendido, podendo ser por ação da própria PQ ou, mais provável, por algum de seus metabólitos secundários que estejam envolvidos no ataque aos estágios de hipnozoítos e gametócitos do parasita (VALE et al., 2009; FERREIRA; GOMES; VIEIRA, 2011).

Acredita-se que a sua atividade antimalárica seja, provavelmente, atribuída à interferência na estrutura do DNA do parasita, intercalando-se a droga entre os pares de bases e impedindo a replicação do material genético (FERREIRA; GOMES; VIEIRA, 2011). Outra provável rota de ação é a produção de metabólitos altamente reativos que podem gerar potenciais oxidativos intracelulares na produção das espécies reativas de oxigênio ou, mesmo, na interferência da função da ubiquinona no transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial. No entanto, não há nenhuma informação conclusiva mostrando se a atividade antimalárica da primaquina é devido à ação direta da droga ou apenas mediada por seus metabólitos (VALE; MOREIRA; GOMES, 2009; FERREIRA; GOMES; VIEIRA, 2011).

Os resultados apresentados por Basso et al. (2011), por meio de estudos dos efeitos da primaquina sobre a estrutura de membranas modelo de lipídeos, indicam que a interação não específica da primaquina com membranas

biológicas pode desempenhar papel importante e representar uma rota adicional no modo de ação dessa droga ou estar envolvida com seus efeitos adversos. Assim, apesar da larga propagação de efeitos biológicos promovidos pela PQ, a exata compreensão do seu mecanismo de ação ainda é desconhecida.

2.2.1.3 Toxicidade da primaquina

Apesar da efetividade da PQ contra as formas hepáticas das quatro espécies de *Plasmodium* que podem afetar o homem, ela é, muitas vezes, associada a efeitos adversos graves em consequência de seus metabólitos tóxicos, como, por exemplo, a 5-hidroxiprimaquina e a 6-metoxi-8-aminoquinolina. O uso deste fármaco pode ocasionar distúrbios gastrointestinais, leucopenia, desenvolvimento de meta-hemoglobinemia com cianose e anemia hemolítica. É contraindicada para indivíduos com deficiência hereditária da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e também para gestantes (RANG et al., 2007; VALE; MOREIRA; GOMES, 2009).

A PQ não é significativamente ativa contra as fases eritrocitárias do ciclo de vida do Plasmodium. No entanto, afeta os eritrócitos dos hospedeiros, especialmente em pessoas com deficiência da enzima citoplasmática G6PD, condição ligada ao cromossomo X e que afeta mais de 400 milhões de indivíduos no mundo. Nestas pessoas, a PQ provoca anemia hemolítica (enfermidade que causa destruição das hemácias) e ocorre um favorecimento da ruptura da membrana dos eritrócitos que não conseguem regenerar a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH), cuja principal função é auxiliar nos processos oxidativos, sendo sua concentração reduzida pelos metabólitos oxidantes da PQ, causando a hemólise (SILVA et al., 2006; RANG et al., 2007; VALE; MOREIRA; GOMES, 2009).

A gravidade da anemia hemolítica parece estar relacionada com a dose de PQ e o grau de deficiência de G6PD (RANG et al., 2007; VALE; MOREIRA; GOMES, 2009). Pessoas que são deficientes nesta enzima são extremamente sensíveis a agentes hemoglobina-oxidantes, tais como PQ, outras aminoquinolinas, nitritos, cloratos, fenacetina, acetanilida, sulfanilamida, nitrobenzeno, anilina, assim como compostos endógenos, nitratos, nitritos e óxido nítrico (SANTANA et al., 2007; VALE; MOREIRA; GOMES, 2009).

A meta-hemoglobinemia está associada à PQ, bem como aos seus metabólitos, como a 6-metoxi-8-hidroxilaminoquinolina, resultante da dealquilação e posterior hidroxilação da PQ (FERREIRA; GOMES; VIEIRA, 2011). É uma condição patológica decorrente do acúmulo anormal de meta-hemoglobina (MetHb). Meta-hemoglobinemia refere-se à oxidação do ferro da hemoglobina do estado ferroso (Fe^{++}) ao estado férrico (Fe^{+++}), impedindo, dessa forma, a hematose (troca de gás carbônico por oxigênio, no processo de respiração). Os eritrócitos contêm uma taxa normal de MetHb (1-2%), mantida por mecanismos redutores fisiológicos, resultantes da oxidação espontânea. No entanto, a presença de MetHb em quantidades elevadas torna-se incompatível com a vida. A formação de meta-hemoglobina é favorecida em situações adversas, tais como estresse oxidativo, infecções, deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase ou influência de xenobióticos. Isto leva a um aumento da concentração de MetHb no corpo, o que implica em elevados riscos para a saúde (SANTANA et al., 2007; VALE; MOREIRA; GOMES, 2009).

Ganesan et al. (2009) demonstraram que a PQ causou a formação de meta-hemoglobina em pessoas deficientes de G6DP e em pessoas com eritrócitos normais. No entanto, em deficientes de G6DP, os eritrócitos sofreram maior estresse oxidativo e depleção de tióis de eritrócitos normais, devido à toxicidade da PQ.

Os efeitos adversos da PQ são maiores pela necessidade de ser administrada repetidamente e em doses elevadas, devido à sua baixa biodisponibilidade oral. Por isso, o uso prolongado desse medicamento deve ser evitado, numa tentativa de se diminuir a probabilidade de ocorrência de maiores efeitos tóxicos e sensibilização ao medicamento. Necessitam-se, ainda, de estudos de novas alternativas para melhoramento ou substituição desse fármaco, a fim de diminuir seus vários efeitos colaterais (GOODMAN; GILMAN, 2012; SANTANA et al., 2007; VALE; MOREIRA; GOMES, 2009).

2.3 Membrana eritrocitária

O eritrócito de mamíferos, célula vermelha do sangue, é uma célula anucleada de forma discoide bicôncava que contém hemoglobina em concentração elevada (cerca de 5 mM/célula) (BULL; BRETON-GORIUS; BEUTLER, 1990). Para cumprir a função de transportar a hemoglobina e levar oxigênio a todas as células, o eritrócito percorre todos os vasos sanguíneos do organismo aproximadamente 500.000 vezes, durante sua vida média de 120 dias (BULL; BRETON-GORIUS; BEUTLER, 1990) e é capaz de transpor capilares e sinusoides de diâmetros de 3 a 4 μm , que correspondem à metade de seu próprio diâmetro, de 7 a 9 μm (SCHERIER, 1985; BULL; BRETON-GORIUS; BEUTLER, 1990). Tais fenômenos só são possíveis graças à extrema resistência e à deformabilidade da membrana do eritrócito (LUX, 1988).

A membrana do eritrócito (Figura 3), devido à sua facilidade de obtenção e isolamento, tem sido extensivamente estudada e suas características principais são bastante conhecidas, sendo um ótimo modelo para o estudo de membranas mais complexas e de outros tipos de células (LAURIALT; O'BRIEN, 1991). A proporção, em peso, de proteínas:lipídios:carboidratos, é 49:43:8.

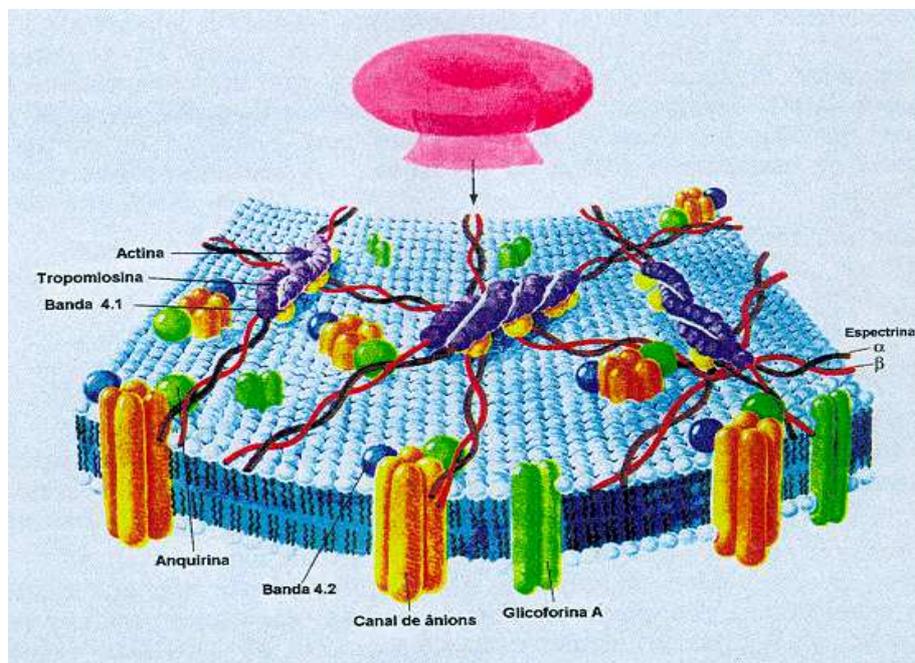


Figura 3 Representação esquemática da face interna da membrana eritrocitária (VOET; VOET, 1990)

A principal classe de lipídios da membrana eritrocitária, bem como na maior parte das membranas biológicas, é a dos fosfolipídios. Segundo Storch e Kleinfeld (1985), a composição lipídica da membrana eritrocitária é: fosfolipídios (47,5%), colesterol (25%), esfingomielina (17,5%) e glicolipídios (10%). Os fosfolipídios estão distribuídos assimetricamente entre as monocamadas interna e externa da membrana eritrocitária, como mostrado na Figura 4. A fosfatidilserina e a fosfatidiletanolaminase localizam-se, preferencialmente, na monocamada interna (DEVAUX, 1991; SCHROIT; ZWALL, 1991), enquanto a fosfatidilcolina e a esfingomielina encontram-se, preferencialmente, na monocamada externa (SCHROIT e ZWALL, 1991).

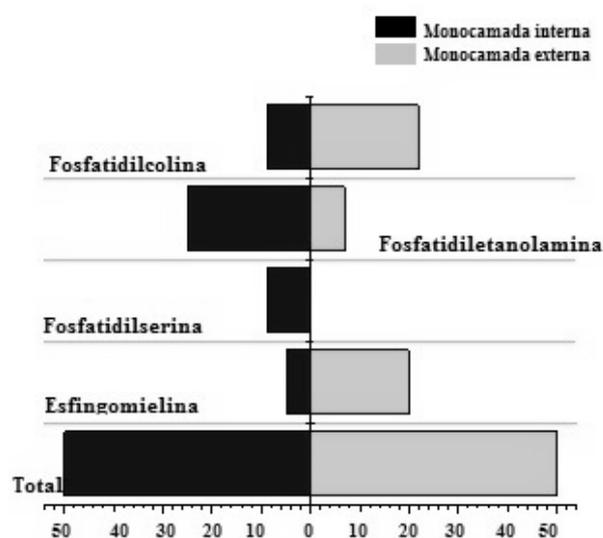


Figura 4 Representação gráfica da distribuição dos fosfolípidos na bicamada eritrocitária (GARRETT; GRISHAM, 1995)

Os mecanismos responsáveis pela manutenção dessa assimetria são: i) a interação preferencial de fosfolípidos com proteínas da membrana (principalmente com a espectrina), fixando esses compostos na monocamada interna e ii) a existência de translocases (ou flipases) responsáveis pela translocação específica, ATP-dependente, dos fosfolípidos com distribuição assimétrica entre as monocamadas externa e interna (DEVAUX, 1991).

Os lípidos orientam-se na bicamada, expondo sua parte polar ao meio aquoso (CONNOR; GILLUM; SCHROIT, 1990). As proteínas intrínsecas têm uma porção hidrofóbica que interage com os lípidos, atravessando a bicamada. A maioria das proteínas extrínsecas da membrana eritrocitária está envolvida na formação de um extenso retículo submembranar, que se projeta para o lado citoplasmático da membrana, formando o citoesqueleto eritrocitário. O

citoesqueleto eritrocitário é composto por actina, proteína 4,1 (banda 4,1) e espectrina, sendo esta última o seu principal componente. A conexão entre as proteínas intrínsecas e a espectrina do citoesqueleto é feita por uma família de proteínas chamadas anquirinas. A interação da membrana com a espectrina seria responsável pela manutenção da integridade da célula na circulação sanguínea (PLATT; LUX; FALCONE, 1993; PLATT; FALCONE, 1995). Interações eletrostáticas parecem estar envolvidas na interação da espectrina com a membrana (KAHANA et al., 1991), enquanto a existência de regiões hidrofóbicas na molécula sugere que essas também sejam importantes para a manutenção da forma do eritrócito (STREICHMAN; KAHANA; SILVER, 1991).

Além do citoesqueleto, a membrana do eritrócito tem, em sua face externa, outra particularidade, o glicocálix, composto pela glicoforina (proteína intrínseca cuja única cadeia polipeptídica está associada a 16 resíduos de monossacarídeos) e outras glicoproteínas e glicolipídios. Essa região, bastante hidrofílica pela característica dos grupamentos OH dos açúcares, tem espessura de 100 nm, isto é, 20 vezes maior que o da própria bicamada lipídica (NELSON; COX, 2011), e constitui uma “barreira adicional” ao eritrócito.

2.3.1 Hemólise isotônica

A primeira tentativa de elucidar o fenômeno de hemólise isotônica induzida por xenobióticos data de 1966, quando Seeman classificou os agentes hemolíticos em dois grupos: as hemolisinas específicas e as não específicas. As primeiras induziam hemólise, mesmo em pequenas concentrações, ligando-se, especificamente, a componentes (receptor ou composto específico) da membrana. Seriam exemplos de hemolisinas específicas a digitonina, a saponina e a holoturina A, entre outras. As hemolisinas não específicas, por sua vez,

seriam as que protegem eritrócitos contra hemólise hiposmótica em pequenas concentrações, mas que induzem hemólise, quando em altas concentrações. Exemplos de hemolisinas não específicas incluem álcoois, vitamina A, lecitinas, ácido esteárico, surfactantes, agentes fenotiazínicos, anti-inflamatórios e anestésicos locais, entre outros (SEEMAN, 1972). O método proposto por Seeman para distinguir entre agentes que atuam ou não em componentes específicos de membrana não permite a elucidação de questões importantes sobre o assunto, tais como o modo de interação entre a droga e a membrana eritrocitária e com qual(ais) componente(s) específicos da membrana a droga interage.

Tem sido sugerido que a hemólise isotônica induzida por um grande número de compostos ocorreria pela perda da permeabilidade seletiva da membrana. O monitoramento da integridade dos eritrócitos pode ser feito com relativa facilidade, detectando-se fotometricamente a hemoglobina liberada em solução (LAURIALT; OBRIEN, 1991; MALHEIROS; PAULA; MEIRELLES, 1998, MALHEIROS; MEIRELLES; PAULA, 2000) ou, potenciometricamente, o potássio liberado no meio extracelular, sugerindo que a lise ocorreria em função da formação de pequenos poros na membrana (CHI; WU, 1991; BOGNER et al., 1996). Este mecanismo é conhecido como coloidosmótico e sugere que os pequenos poros permitem o equilíbrio entre íons, mas a retenção da hemoglobina e seus contraíons dentro da célula levariam a um desequilíbrio osmótico e conseqüente entrada de água, culminando na ruptura total da membrana.

Outro fator determinante na hemólise é a capacidade oxidante que muitos compostos químicos apresentam. Drogas hemolíticas, como aspirina, analina, acetanalida, fenacetina, sulfanilamidas e os agentes antimaláricos primaquina, pamaquina e pentaquina (COHEN; HOCHSTEIN, 1964; GOLDBERG; STERN, 1976; KOGA; MURAKAMI; KAWASHIMA, 1997),

são convertidos, *in vivo*, em derivados auto-oxidáveis, o que poderia justificar sua ação hemolítica. Estes compostos favoreceriam reações oxidativas que elevam os níveis celulares do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, disparando uma série de processos (oxidação da hemoglobina, peroxidação lipídica e inibição da glicólise), culminando na lise do eritrócito.

2.3.2 Dano oxidativo ao eritrócito

O dano oxidativo dos componentes celulares tem sido estabelecido como um fator importante em várias condições patológicas. Os eritrócitos são particularmente susceptíveis ao dano oxidativo como resultado do alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados das suas membranas e da alta concentração celular de oxigênio e hemoglobina (Hb), que são poderosos promotores de processos oxidativos (CLEMENS; WALLER, 1987). Sob condições normais, os eritrócitos são continuamente expostos a espécies reativas de oxigênio (EROS) de fontes internas e externas. No interior do eritrócito, estima-se que mais de 3% da oxi-Hb (forma oxigenada ou Fe^{++}) seja convertida em meta-hemoglobina (Fe^{+++}), com a concomitante produção de radicais superóxido (O_2^*) (VAN DEN BERG et al., 1991).

Em eritrócitos sadios, o dano oxidativo é prevenido por um eficiente sistema protetor constituído por uma série de enzimas e compostos antioxidantes que incluem as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase, além da glutatona reduzida e das vitaminas E e C. Assim, as EROS mais reativas, que são formadas no citosol com participação da Hb, são detoxificadas antes que possam atingir a membrana celular, em que, por meio do dano oxidativo, poderiam comprometer a integridade da célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). No entanto, uma pequena quantidade de EROS pode atingir a face interna da membrana celular (VAN DEN BERG et al., 1991) e a

exposição frequente dos eritrócitos ao contato com células metabolicamente ativas (fagócitos, por exemplo) pode contribuir para a manutenção de um contínuo estresse oxidativo na membrana dos eritrócitos, devido à constante produção de H_2O_2 . Muitos tipos de eritrócitos patológicos também têm susceptibilidade aumentada ao estresse oxidativo. Um exemplo é a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, que compromete a via das pentoses no eritrócito, diminuindo a formação de equivalentes redutores (NADPH), que servem como doadores de elétrons e prótons para a redução da glutatona oxidada e a consequente produção de glutatona reduzida. Além disso, em várias patologias que envolvem hemoglobinas anormais, verifica-se um aumento do dano oxidativo, que acelera a destruição dos eritrócitos (DINCER et al., 1999).

2.3.2.1 Hemoglobina

A hemoglobina é uma hemeproteína essencial para a vida de todos os vertebrados, ocorrendo também em alguns invertebrados, como crustáceos e anelídeos, em nódulos de algumas plantas leguminosas (BARBOSA; MEIRELLES, 1994), assim como leveduras e protozoários ciliados. A hemoglobina humana normal é constituída por quatro cadeias polipeptídicas (subunidades), sendo duas cadeias α com 141 resíduos de aminoácidos e duas cadeias β que apresentam 146 resíduos de aminoácidos. O conjunto das quatro subunidades tem massa molecular de 64 kDa. Cada subunidade tem um grupo heme, constituído pela protoporfirina IX (Figura 5), inserido em uma fenda hidrofóbica; o grupamento heme contém um átomo de ferro que ocupa a posição central do anel da porfirina. O ferro tem seis sítios de coordenação, dos quais quatro são ocupados pelos átomos de nitrogênio pirrólico do anel porfirínico; o quinto ligante é o átomo de nitrogênio de um imidazol da histidina proximal (da

alfa-hélice F8) que, provavelmente, ancora o heme na proteína e o sexto sítio está livre para um ligante extra como o oxigênio (NELSON; COX, 2011).

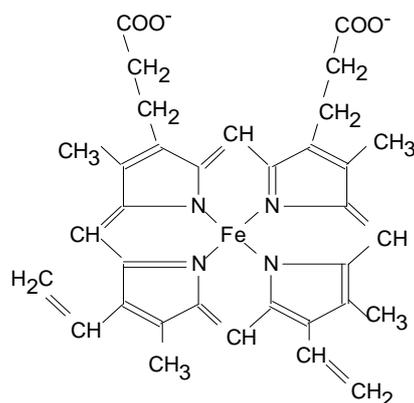


Figura 5 Protoporfirina IX (grupamento heme)

A principal função da Hb é o transporte de O_2 . Em organismos superiores, a Hb provê o aporte de O_2 a todas as células (necessário para o metabolismo aeróbio) por meio da circulação. Assim, essa molécula versátil é capaz de ligar-se reversivelmente ao O_2 , em função da oferta do gás e aumentar, em ordens de grandeza, a capacidade de transporte de oxigênio dentro dos organismos.

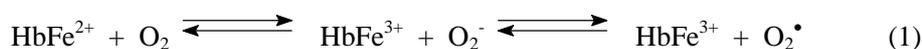
Quando a hemoglobina liga-se ao oxigênio, um elétron é polarizado do ferro para o oxigênio, formando, momentaneamente, a forma férrica ($HbFe^{3+}$). Em condições normais, este elétron é devolvido ao ferro no momento em que o oxigênio é liberado, restabelecendo sua forma ferrosa ($HbFe^{2+}$) (ANTONINI; BRUNORI, 1975).

O estado reduzido do ferro no grupamento heme (Fe^{2+}) é fundamental para a realização do transporte de oxigênio. Alguns resíduos invariáveis, de

natureza hidrofóbica, são responsáveis pela manutenção do ambiente não polar em torno do sítio de ligação do oxigênio, que é a base para a estabilidade do complexo ferro-oxigênio (ANTONINI; BRUNORI, 1975). Qualquer alteração no ambiente do heme pode levar à formação de meta-Hb. Por exemplo, Cauchey (1967) demonstrou que a velocidade de autooxidação da Hb é maior quando a histidina distal está substituída por outros resíduos, caracterizando, assim, a importância desse aminoácido na estabilidade do estado de oxidação do ferro no heme, garantindo a ligação da Hb com o oxigênio.

Em indivíduos normais, cerca de 3% da hemoglobina total circulante são convertidos diariamente a meta-Hb, como dito anteriormente. Fisiologicamente, a meta-Hb presente na célula é reduzida pela enzima meta-hemoglobina redutase, que utiliza o NADPH como fonte redutora (KURATA; SUZUKI; AGAR, 1993).

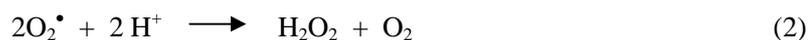
Com a formação da meta-Hb, ocorre, simultaneamente, a formação de radical superóxido (O_2^{\bullet}), de acordo com a equação 1.



Sendo assim, devido ao processo contínuo de oxigenação e desoxigenação da Hb, o radical superóxido (O_2^{\bullet}) é continuamente gerado no interior do eritrócito. É conhecido que este radical livre pode atacar, direta ou indiretamente, componentes das membranas, DNA e hormônios (KURATA; SUZUKI; AGAR, 1993; MARTINEZ-CAYUELA, 1995; CARDOZO-PELAEZ et al., 2000).

O radical superóxido, quando não reage com macromoléculas celulares, pode, por processo de dismutação, gerar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme a equação 2. Esta reação é catalisada pela enzima superóxido

dismutase (MISRA; FRIDOVICH, 1972; WINTERBOURN; METODIEWA, 1999), presente em altas concentrações no eritrócito.



No eritrócito, o O_2^\bullet promove grandes danos quando interage com o peróxido, produzindo intermediários altamente reativos, como o radical hidroxila (PEUCHANT et al., 1997). Os radicais produzidos podem, então, atacar os lipídios e as proteínas da membrana, resultando em hemólise e em perda da função celular.

Por apresentar ferro em sua estrutura, a hemoglobina pode, ainda, comportar-se como um reagente biológico de Fenton, sendo, assim, uma molécula com grande potencial promotor de processos oxidativos (CLEMENS; WALLER, 1987; PUPPO; HALLIWELL, 1988).

Em adição à capacidade da hemoglobina gerar o ânion superóxido, os processos oxidativos no interior dos eritrócitos são favorecidos pela alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados da membrana citoplasmática, rico suprimento de oxigênio e presença de metais de transição. Como o eritrócito maduro é anucleado, ele é incapaz de substituir componentes celulares danificados por processos oxidativos e, portanto, a consequência é a morte (lise) celular (KONUKOGLU; AKCAY; ERDEM, 1998).

Em condições fisiológicas, o eritrócito humano apresenta um tempo de vida médio de cerca de 120 dias, que propicia o desenvolvimento dos processos oxidativos. Durante este período, o eritrócito desenvolve suas funções sem aparente dano peroxidativo (CHIU; LUBIN; SHOHET, 1982) e isto se deve à presença de um eficiente sistema antioxidante formado por enzimas e compostos antioxidantes.

2.4 Ciclodextrinas

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, compostos de unidades de glicose unidas por ligações α -(1,4). As CDs naturais mais comuns são α , β e γ , que contêm seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopiranoses, respectivamente (JESUS et al., 2006; FRACETO et al., 2007; LYRA et al., 2010; YANG et al., 2012).

As CDs são produtos cíclicos da hidrólise do amido por alguns microrganismos, através da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). O amido utilizado para a produção de CDs é, geralmente, derivado do milho, mas também pode ser obtido a partir de batatas ou outras fontes (JESUS et al., 2006; FRACETO et al., 2007; MATIOLI, 2000).

Em 1891 foi feito o primeiro relato da existência das ciclodextrinas por Villiers e, em 1938, as estruturas das CDs foram elucidadas, por Freudenberg e seu grupo e também sua habilidade em formar complexos. Em seguida, propriedades de formação destes complexos de inclusão molecular foram estudadas, numerosos derivados preparados e diversas enzimas caracterizadas (CEREDA, 2003; MATIOLI, 2000).

Atualmente, o interesse pelas CDs tem aumentado consideravelmente e o grande investimento em pesquisas possibilitou redução no custo de produção das mesmas, viabilizando sua aplicação nas mais diversas áreas (BUHA et al., 2012; CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; MATIOLI, 2000).

2.4.1 Estrutura química

Em consequência da conformação do carbono C_1 dos resíduos de α -D-glicopiranosil e da falta de rotação livre ao redor das ligações glicosídicas, as CDs não são moléculas perfeitamente cilíndricas, mas apresentam a forma de

um cone truncado, conforme Figura 6. As CDs têm em sua estrutura grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior. Assim, apresentam exterior hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica (BUHA et al., 2012; FRACETO et al., 2007; MATIOLI, 2000; SANCHO et al., 2011).

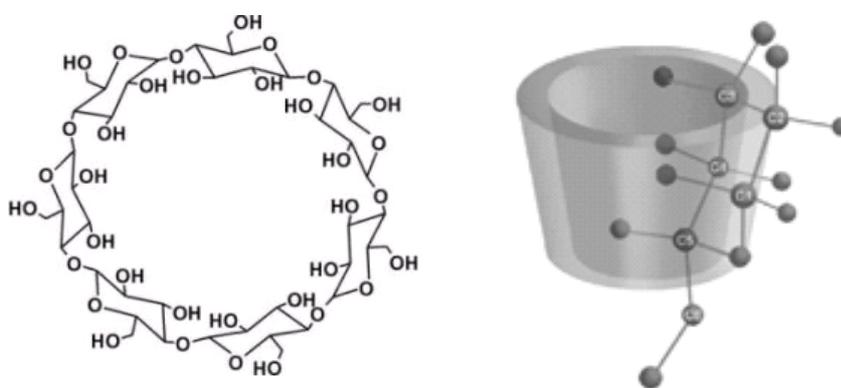


Figura 6 Representação esquemática da β -CD e sua estrutura tridimensional

Enquanto a superfície externa tem natureza hidrofílica, os pares de elétrons livres dos oxigênios envolvidos em ligações glicosídicas são dirigidos para o interior da cavidade, proporcionando elevada densidade eletrônica e, por consequência, um caráter menos polar. Graças à natureza hidrofóbica da cavidade, moléculas de tamanho, forma e hidrofobicidade adequada são capazes de interagir de forma não covalente, para formar um complexo estável, por inclusão molecular (JESUS et al., 2006; LYRA et al., 2010; MATIOLI, 2000; RODRIGUES et al., 2011).

A formação de complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas hóspedes é uma das propriedades mais importantes das ciclodextrinas. O encapsulamento pode ocorrer tanto em estado sólido, quando moléculas

hóspedes podem ser incluídas dentro da cavidade, quanto em solução, em que há um equilíbrio entre a molécula hóspede complexada e não complexada. As forças envolvidas no processo de formação dos complexos são forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. A maioria dessas interações é do tipo hospedeiro-convidado (SALTÃO; VEIGA, 2001; SINGH et al., 2010). Na Tabela 2 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas de CDs.

Tabela 2 Propriedades físico-químicas de algumas ciclodextrinas

Propriedades	α-CD	β-CD	γ-CD	HPCD
Número de resíduos de glicose	6	7	8	7
Massa molar (g mol ⁻¹)	972	1135	1297	1400
Solubilidade aquosa a 25 °C (g 100 mL ⁻¹)	14,5	1,85	23,2	600
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5	--
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3	6,0-6,5
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	427	--
DL50 oral rato (mg.kg ⁻¹)	≥10.000	>5.000	>>8.000	-

Fonte: (DODZIUK, 2006; LOFTSSON, 1998; SALTÃO; VEIGA, 2001) com adaptações.

Das CDs naturais, a mais utilizada é a β -CD, pois sua cavidade interna, com aproximadamente 6Å de diâmetro, acomoda os grupos aromáticos encontrados na maioria das drogas (PINHEIRO, 2012).

No que diz respeito à toxicidade, os órgãos mais afetados são os rins, após a absorção sistêmica. A β -CD forma um complexo insolúvel com o

colesterol. Esse complexo, na urina, passa por filtração glomerular e é retomado pelas células tubulares renais, o que traz danos aos rins (STELLA; HE, 2008).

Embora as CDs naturais sejam bastante utilizadas na investigação e no desenvolvimento de formulações farmacêuticas, elas apresentam algumas limitações, como veículos de fármacos, como é o caso da β -CD, que, devido à sua estrutura rígida, apresenta solubilidade aquosa reduzida. Foram sintetizados, então, representantes modificados mais solúveis, como a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD), a 2,6 dimetil- β -ciclodextrina (DMCD), a sulfo-butil-éter-ciclodextrina (SB-CD) e a metil-ciclodextrina randomizada (RM-CD), de forma a melhorar não só a sua solubilidade e toxicidade, bem como promover um aumento da sua capacidade de inclusão (BUHA et al., 2012; CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; MATIOLI, 2000).

Neste trabalho experimental foi utilizada a hidroxipropil- β -ciclodextrina (Figura 7), devido à sua baixa toxicidade, ao alto potencial de complexação e à grande solubilidade (ROJAS-AGUIRRE et al., 2012). Além disso, ela permite a sua administração por via parenteral, o que não é recomendado quando se utiliza a β -CD, que pode causar nefrotoxicidade (MELO et al., 2007).

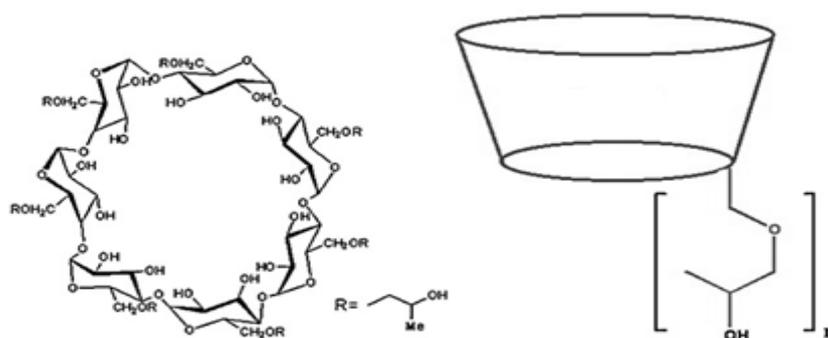


Figura 7 Representação esquemática da hidroxipropil- β -ciclodextrina (EL-SAYED, 2014)

2.4.2 Complexos de inclusão

As CDs podem ser utilizadas em fármacos, alimentos, cosméticos, etc., para: estabilidade (frente à luz, radiação UV, temperatura, oxidação, hidrólise); solubilização (aumento da solubilidade em água, substituição de solventes orgânicos); liberação controlada de ingredientes ativos; mascarar odores e sabor desagradáveis; aumentar a biodisponibilidade; extração seletiva e efetivar limpezas (MATIOLI, 2000; MERZLIKINE et al., 2011).

Devido à sua estrutura em forma de anel, as ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão, através de sua cavidade hidrofóbica, com vários compostos orgânicos ou não, modificando as características químicas e físicas dos mesmos. Tal característica é denominada encapsulação molecular (BUHA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2011; YANG et al., 2012).

O complexo de inclusão formado entre ciclodextrina e moléculas hóspedes é mantido por interações não covalentes e é um equilíbrio dinâmico, em que se tem a molécula hóspede constantemente se associando e se desassociando da cavidade da ciclodextrina. Dois fatores envolvem a formação desse complexo: um é que a molécula hóspede deve se associar inteiramente, ou ao menos parcialmente, dentro da cavidade da CD e outro é a polaridade da molécula hóspede e sua competição com outros elementos presentes no meio (CEREDA, 2003; MATIOLI, 2000; MERZLIKINE et al., 2011).

Em geral, moléculas hidrofóbicas têm alta afinidade pela cavidade da CD em solução aquosa. A hidratação de um complexo de CD com um hóspede hidrofóbico é favorecida energeticamente, quando comparada com a hidratação separada dos componentes. Na ausência da molécula hóspede, a cavidade hidrofóbica, que atua como hospedeira, é ocupada por moléculas de água; entretanto, essa é uma interação energeticamente desfavorável, uma vez que requer uma redução da entropia das moléculas de água. Contudo, uma molécula

hóspede específica, quando adicionada à solução de CD, expulsa as moléculas de água e ocupa ela própria esta cavidade (MATIOLI, 2000; MERZLIKINE et al., 2011).

A principal força motriz que favorece a encapsulação molecular consiste na substituição das moléculas de água que têm elevada entalpia por moléculas hóspedes de menor entalpia. Trata-se de um processo energeticamente viável, por promover alteração favorável de entalpia, aumento de entropia e redução da energia total do sistema, fatores que contribuem para o aumento da estabilidade do complexo formado. Interações eletrostáticas de van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio também contribuem para a formação e a estabilização dos complexos de inclusão (LYRA et al., 2010).

As CDs são utilizadas, principalmente, como agentes complexantes, para aumentar a solubilidade aquosa de drogas pouco solúveis e aumentar sua biodisponibilidade e estabilidade (PÉREZ-GARRIDO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011). A liberação controlada de fármacos por meio de complexos de inclusão com ciclodextrinas passa pela alteração da farmacocinética e a biodisponibilidade de princípios ativos que, apesar de terem boa ação farmacológica, são ainda limitados em relação à sua estabilidade e aos efeitos colaterais indesejáveis. Assim, sob a forma de complexo de inclusão, pode atingir o local de ação, sem problemas, como a inativação do fármaco e a irritação de mucosas, ou absorção limitada, permitindo o uso de uma via de administração mais cômoda (RODRIGUES et al., 2011; SALTÃO; VEIGA, 2001).

Em artigos publicados há relatos do estudo de antimaláricos com ciclodextrinas, a fim de melhorarem sua biodisponibilidade e diminuir seus efeitos adversos. Alguns desses artigos estão exemplificados a seguir.

Marconi et al. (2004) estudaram o complexo de inclusão entre o antimalárico esquizotocida sanguíneo artemisinina e β -CD, por meio da

espectroscopia de dicroísmo circular e cálculos teóricos de densidade funcional. Os autores demonstraram que o complexo foi formado em uma estequiometria de 1:1 (artemisinina: β -CD) e que as propriedades do fármaco foram alteradas devido à complexação com ciclodextrinas, indicando que houve um aumento na solubilidade e na biodisponibilidade da artemisinina complexada, quando comparada ao fármaco livre.

Nos estudos de Yang et al. (2009), sobre a caracterização do complexo de inclusão do antimalárico artemeter em hidroxipropil- β -ciclodextrina, os resultados demonstraram um aumento de 1,81 vezes na biodisponibilidade do fármaco em inclusão, comparado ao artemeter livre.

Rojas-Aguirre et al. (2012) avaliaram o efeito de um derivado do antimalárico quinazolina e de seu complexo com hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células modelos de eritrócitos humanos. Os resultados indicaram que a ciclodextrina facilita a interação do fármaco com a membrana do eritrócito, interagindo, principalmente, com a parte externa da membrana, perturbando a ordenação das cadeias acila de lipídios e aumentando a hidratação das interfaces lipídio-proteína na membrana interior, na qual o complexo é capaz de penetrar, sendo, portanto, uma forte razão para considerar que a quinazolina encapsulada em ciclodextrina seja uma formulação promissora para o tratamento da malária.

Em relação à primaquina, existem estudos que visam o melhoramento desta na tentativa de diminuir a sua toxicidade sistêmica com a diminuição da dose terapêutica e a entrega da droga no local de ação.

Stensrud et al. (2000) realizaram um estudo de encapsulação de primaquina em lipossomas em resposta a um gradiente de pH e observaram que a eficiência de encapsulação dependia da composição lipídica, da capacidade tamponante interna, da proporção droga-lipídio e da presença de colesterol e carga nos lipossomas.

Bhadra et al. (2005), em seus estudos de encapsulação de primaquina por glicodendrimeros, observaram que o revestimento por dendrimeros aumenta a retenção da droga, ocasionando uma liberação controlada. A toxicidade hemolítica foi diminuída, tornando este sistema adequado para a entrega do fosfato de primaquina para o fígado.

Elbashir et al. (2010) investigaram as interações entre os complexos de inclusão formados entre ciclodextrinas (α e β) com primaquina e o seu isômero de posição, o contaminante quinocida, por meio de método semiempírico (mecânica quântica). Eles concluíram que os complexos mais estáveis foram obtidos quando a cadeia lateral butilamino dos compostos estava inserida na cavidade das ciclodextrinas, pois o grupamento metoxi-quinolina é muito volumoso para se ajustar na cavidade da α -CD ou da β -CD. As principais forças que contribuíram para a estabilidade desse complexo de inclusão foram as forças de van der Waals e as forças eletrostáticas, sendo que as ligações de hidrogênio também contribuíram na energia de estabilização do complexo formado. A ligação de hidrogênio forte ocorreu entre a amina primária que se localiza em posição que permite a interação favorável com os átomos de oxigênio, localizados nas paredes interiores da molécula hospedeira.

De acordo com os estudos teóricos de Elbashir et al. (2010), energeticamente, a formação do complexo de inclusão entre primaquina e ciclodextrinas é favorável. Porém, ainda não existem estudos experimentais que comprovem a formação deste complexo e os benefícios provenientes dessa inclusão. Sendo assim, este trabalho foi realizado com os objetivos de preparar e caracterizar o complexo de inclusão entre PQ e HPCD e ainda avaliar, por meio de testes *in vitro*, a eficácia desta formulação de liberação modificada, a fim de promover a redução da toxicidade do antimalárico e melhorar seu perfil de atividade farmacológica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização ótica da primaquina

3.1.1 Comprimento de onda máximo e absortividade molar

A fim de se avaliar o comprimento de onda de absorção máxima da PQ, foi preparada uma solução estoque 1 mM do fármaco, em água. Esta solução foi posteriormente diluída para 25 μM e o seu espectro de absorção observado em um espectrofotômetro de UV-vis Varian – Cary 50 Probe, na faixa de 200 a 700 nm, utilizando-se uma cela com caminho ótico de 1 cm.

A absortividade molar da PQ foi determinada por meio dos valores de absorbância de soluções com concentrações crescentes de PQ (5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM e 25 μM), por meio da lei de Lambert-Beer (Equação 3). O termo A é a absorbância da amostra, c é a concentração da espécie absorvente, b é a distância percorrida pelo feixe através da amostra e ϵ é a absortividade molar.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (3)$$

3.1.2 Comportamento da primaquina em ambiente com diferentes constantes dielétricas

A fim de simular o comportamento da PQ em ambientes químicos de diferentes constantes dielétricas, espectros foram obtidos (na faixa de 230 nm a 300 nm) em meios contendo diferentes proporções de água:etanol (10:0, 7:3; 5:5; 3:7; 1:9 e 0:10, v:v) (LIMA, 2010).

3.2 Preparação do complexo entre a primaquina e hidroxipropil- β -ciclodextrina

Para a preparação do complexo de inclusão sólido, foram misturadas quantidades apropriadas de PQ e HPCD em água destilada, tal que a estequiometria fosse 1:1. As amostras foram deixadas sob agitação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o equilíbrio (tempo determinado no experimento de cinética, Item 3.3.1 Materiais e Métodos), a solução foi liofilizada (liofilizador Labconco Freezone 4.5) e armazenada em freezer. O complexo foi preparado no Laboratório de Bioquímica no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.3 Caracterização do complexo

3.3.1 Cinética de formação do complexo

Para a avaliação da cinética de formação do complexo, ou seja, o tempo necessário para que haja a incorporação da molécula de PQ na cavidade da HPCD, foram realizados alguns testes. Quantidades apropriadas de PQ e HPCD, na razão molar de 1:1, foram misturadas em água destilada e deixadas sob agitação, em temperatura ambiente, verificando-se a leitura no espectrofotômetro de UV-vis em tempos pré-determinados, no comprimento de onda de absorção máxima da PQ (258 nm), até que o equilíbrio fosse atingido. Os experimentos foram realizados em triplicata. Como referência, foi analisada também a absorbância de uma solução de mesma concentração de PQ pura. A cinética de formação do complexo foi avaliada no Laboratório de Bioquímica no Departamento de Química da UFLA.

3.3.2 Avaliação espectrofotométrica da interação PQ: HPCD

Para a avaliação da interação entre a molécula de PQ e HPCD, foram observados os efeitos da ciclodextrina no espectro de absorção UV-vis da PQ. Para isso, foram preparadas soluções de PQ:HPCD nas proporções de 1:0, 1:2, 1:100 e 1:500 e coletados os espectros de absorção na faixa de 230 nm a 300 nm, a fim de se verificar o efeito de concentrações crescentes de HPCD nos espectros da molécula de PQ.

3.3.3 Análise por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Utilizou-se espectrofotômetro Digilab Excalibur, série FTS 3000, com transformada de Fourier para a obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho. Empregaram-se janelas de KBr, a partir de 194 mg de KBr e 6 mg do material analisado que, após pesagem, foi levado em estufa, a 60 °C, por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram mantidas em dessecador e levadas à prensa hidráulica, por 10 segundos, sob uma pressão de 3 toneladas. Os espectros foram obtidos na faixa de 4.000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e número de acumulações igual a 16 scans. As análises de amostras de PQ, HPCD, mistura física de PQ + HPCD e complexo de inclusão PQ:HPCD na razão molar 1:1, foram feitas no Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ), no Departamento de Química da UFLA.

3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica do complexo de inclusão entre a PQ e a HPCD foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura Leo Evo 40, no

Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra Estrutural do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Foram realizadas análises de quatro amostras: PQ, HPCD, mistura física de PQ:HPCD e complexo entre PQ e HPCD. As amostras foram levadas à estufa, a 60 °C, por 15 minutos, para a retirada de toda a umidade presente nas mesmas. Logo depois, foram depositadas em stubs de alumínio com fitas de carbono (dupla face) e, em seguida, foram cobertas por uma fina camada de ouro em evaporador SCD 050 da Balzers, a fim de se tornarem condutoras.

3.3.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Amostras de PQ, HPCD e complexo (PQ:HPCD) foram preparadas em D₂O, para a aquisição de espectros unidimensionais, para atribuição dos hidrogênios pertencentes à cada molécula. Alíquotas de 600 µL foram levadas ao espectrômetro de ressonância magnética nuclear em tubos de 5 mm de diâmetro. Os experimentos foram conduzidos, a 25 °C, usando-se como referência o pico da água residual (4,7 ppm). Os experimentos de RMN de hidrogênio (¹H RMN) foram conduzidos em espectrômetro Bruker 400 MHz operando em um campo de 11,7 Tesla em frequência para hidrogênio de 499,73 MHz (resolução digital das medidas de 0,39 Hz/ponto), pertencente ao Departamento de Química da Universidade Autônoma de Barcelona, Espanha.

Espectros de ¹H foram utilizados para se analisar variações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios das moléculas de PQ e HPCD, após a complexação.

A estequiometria de complexação foi determinada pelo método de JobPlot. A partir de soluções equimolares de PQ e HPCD, foram adicionadas, sequencialmente, alíquotas de 50 µL de PQ, até um volume final de 500 µL, de forma que a concentração total de cada componente modificou-se, variando a

fração molar (r) das espécies entre 0 e 1. O parâmetro físico-químico analisado foi o deslocamento químico na ausência e na presença de HPCD. A análise dos dados foi realizada construindo-se um gráfico de variação do deslocamento químico, em função da fração molar, em que, no valor máximo de r , se tem a relação de estequiometria.

3.4 Testes *in vitro*

3.4.1 Hemólise isotônica

Para o preparo da suspensão de eritrócitos, foi utilizado sangue humano com anticoagulante heparina (27 mM citrato sódico, 72 mM cloreto sódico, 114 mM glicose e 2,6 mM ácido cítrico), que foi centrifugado, por 10 minutos, a 3.500 rpm. O plasma, as células brancas e as gorduras foram removidos por aspiração. As células vermelhas foram ressuspensas em tampão fosfato, PBS 5 mM (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 e NaCl) em pH 7,4, tampão de osmolaridade e pH fisiológico, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Foram realizadas duas repetições e o concentrado de hemácias obtido foi mantido sob refrigeração (4 °C). Esta “papa” de hemácias, com concentração de 100%, foi diluída para hematócrito (Ht) 0,15%.

O ensaio hemolítico consistiu na adição de concentrações crescentes das seguintes amostras: PQ, HPCD e complexo PQ:HPCD, a uma suspensão de hemácias com Ht de 0,15% diluídos em um volume final de 1 mL de tampão PBS. Após incubação à temperatura ambiente por 60 minutos, as amostras foram submetidas à centrifugação, por 8 minutos, a 8.000 rpm e a concentração de hemoglobina no sobrenadante determinada espectrofotometricamente em 412 nm. Foram realizadas medidas em triplicatas para cada concentração testada e também para os seguintes controles: c_1 = eritrócitos em PBS (controle de

hemólise mecânica) e c_2 = eritrócitos em água destilada (controle de hemólise total).

O efeito hemolítico (% de Hemólise) foi acompanhado medindo-se a concentração de hemoglobina no sobrenadante de acordo com a equação 4.

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \times 100 \quad (4)$$

em que A_a é a absorvância da amostra; A_{c1} e A_{c2} são, respectivamente, as absorvâncias dos controles c_1 e c_2 em 412 nm.

Com os valores calculados de percentual de hemólise, foram construídas curvas de hemólise induzida para cada solução testada.

3.4.2 Oxidação da hemoglobina

A fim de testar a toxicidade do complexo de inclusão PQ:HPCD em relação à PQ livre, realizaram-se ensaios para verificar o efeito oxidativo dos mesmos sobre a hemoglobina.

No preparo de hemoglobina purificada, as suspensões de hemácias foram lavadas três vezes em solução salina (154 mM de NaCl e centrifugadas, a 3.500 rpm, durante 5 minutos), hemolisadas com água destilada (1:1, v:v) e centrifugadas (1.500 xg, 5 minutos), descartando-se o precipitado. A concentração das soluções de hemoglobina foi determinada espectrofotometricamente pela absorção em 412 nm e diluídas nas mesmas condições dos ensaios hemolíticos (Ht 0,15%). Estas foram incubadas, durante 60 minutos, com quantidades crescentes de PQ pura, HPCD pura e complexo PQ:HPCD. A formação de meta-hemoglobina foi analisada em um

espectrofotômetro UV-vis da Varian – Cary 50 Probe, realizando-se uma varredura entre 500 e 700 nm. Como controle de indução da oxidação de 100% da hemoglobina, foi utilizado $K_3Fe(CN)_6$.

3.4.3 Ensaio de liberação *in vitro*

Para os testes de liberação, foram utilizados sistemas de dois compartimentos separados que permitiram observar a liberação da PQ livre e complexada, desde o compartimento doador (5 mL) até o compartimento acceptor (200 mL), contendo PBS 5 mM, pH 7,4, sob agitação leve, a 37 °C. Amostras do compartimento acceptor foram coletadas, durante 6 dias, e a concentração de PQ foi determinada por espectrofotometria UV-vis ($\lambda=258$ nm). A droga livre foi dispersa na mesma concentração em PBS e utilizada da mesma maneira, para fins de comparação. A liberação modificada foi observada por meio do gráfico de porcentagem de PQ liberada em função do tempo. Os experimentos foram realizados em triplicata. A quantificação da porcentagem de PQ liberada foi realizada utilizando-se uma curva de calibração (MORAES et al., 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização ótica da primaquina

4.1.2 Comprimento de onda máximo e absortividade molar

Medidas de absorção refletem a capacidade intrínseca de um material em absorver radiações em um comprimento de onda específico (LIMA, 2010). Para a realização de estudos de interação entre PQ e HPCD, propriedades óticas da PQ, como medidas de absorção em UV-vis, foram exploradas. Na Figura 8 apresenta-se o espectro de absorção da molécula de PQ, realizado entre 200 e 700 nm.

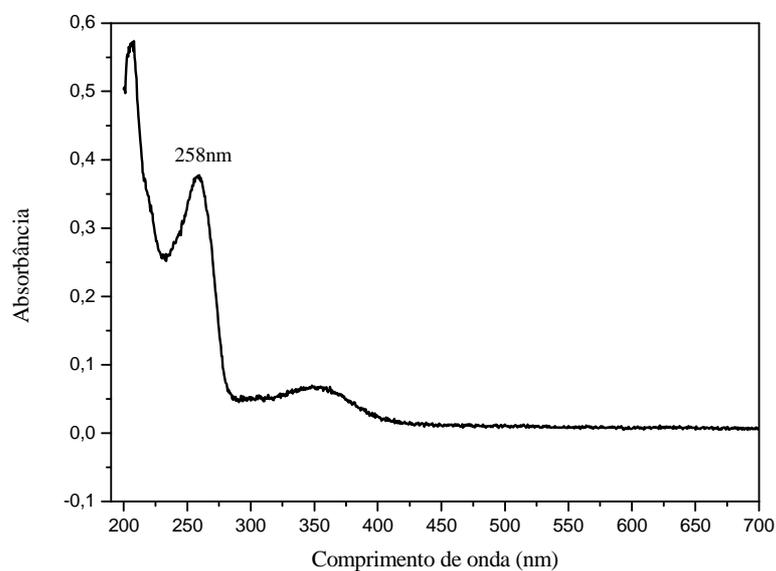


Figura 8 Espectro de absorção UV-vis da molécula de [PQ] = 25 μ M, à temperatura ambiente

A partir da análise da Figura 8 pode-se observar que a molécula de PQ apresenta um máximo de absorção em 258 nm. A partir deste dado, construiu-se uma curva analítica (Figura 9), variando-se a concentração de PQ entre 5 μM e 25 μM , por meio da qual foi possível determinar o valor da constante de absorvidade molar da mesma.

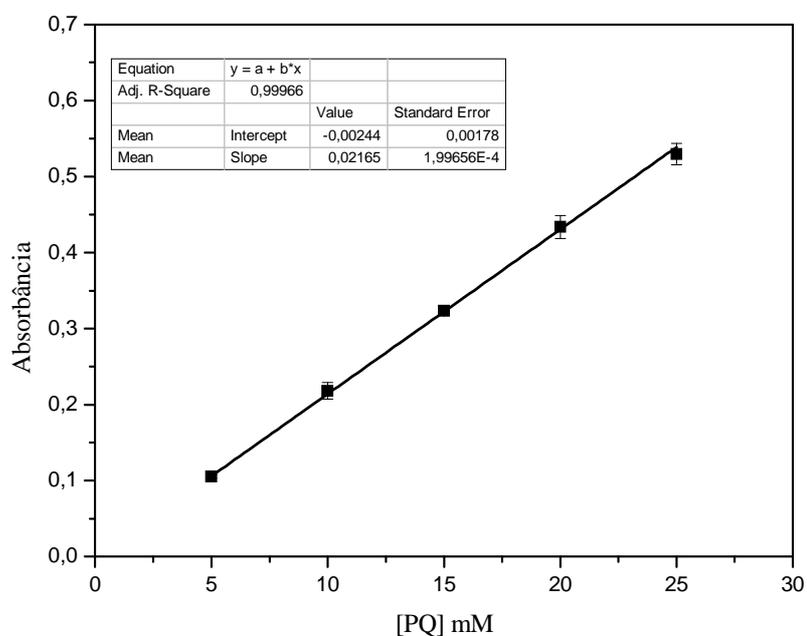


Figura 9 Determinação da constante de absorvidade molar da PQ em 258 nm, à temperatura ambiente

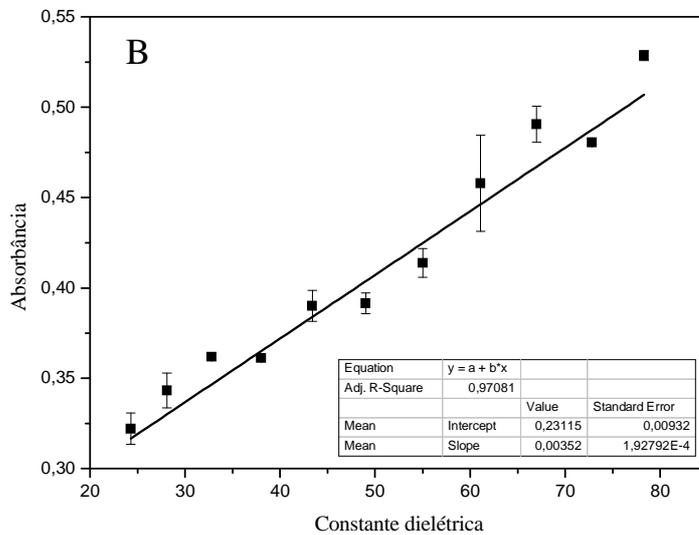
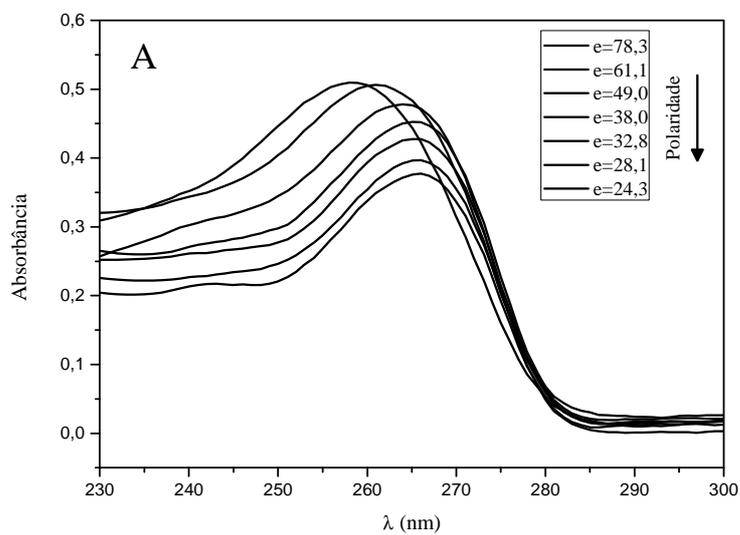
O valor da absorvidade molar encontrado a partir da equação de Lambert-Beer foi de $21.650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, sendo considerado um valor elevado,

indicando que a molécula tem alta capacidade de absorção da luz na região do UV-vis.

4.1.3 Comportamento da primaquina em ambiente com diferentes constantes dielétricas

No intuito de analisar a influência da polaridade do solvente na absorção da PQ na região do UV-vis, foram preparadas amostras do fármaco em diferentes constantes dielétricas, variando-se as proporções água:etanol, conforme descrito no item 3.1.2.

Os efeitos elementares das interações soluto-solvente puderam ser analisados e compreendidos pela ordenação da constante dielétrica. Na Figura 10A observa-se que o comportamento da PQ varia conforme se alteram as condições do meio. Estas variações se evidenciam tanto no deslocamento do comprimento de onda máximo quanto na intensidade de absorção. A variação na intensidade está relacionada com a probabilidade de ocorrer transição eletrônica entre os estados fundamental e excitado. Esta transição é dependente da eficiente solvatação dos níveis energéticos, favorecendo suas estabilizações. A ausência de variação no formato das bandas de absorção sugere que a excitação ocorre a partir de estados eletrônicos similares (GUZZO, 2007; LIMA, 2010).



Fi

gura 10 Espectros de absorbância da PQ de 230 nm a 300 nm (A) e curva de variação da absorbância da PQ (25 μM) em $\lambda = 258$ nm, em função da constante dielétrica do meio(B)

As leituras foram realizadas e os dados obtidos revelaram uma diminuição da absorbância de PQ em $\lambda = 258$ nm, em função da diminuição da polaridade ou da constante dielétrica do meio, conforme a Figura 10B. Observaram-se um deslocamento do comprimento de onda máxima absorção da PQ para maiores comprimentos de onda, região do vermelho (efeito batocrômico) e diminuição da intensidade de absorção (efeito hipocrômico), de acordo com a diminuição da polaridade, o que era de se esperar já que a molécula de PQ é hidrofílica. E, com a diminuição da polaridade, ela ficou menos solúvel no solvente.

4.2 Caracterização do complexo de inclusão

4.2.1 Cinética de formação do complexo de inclusão

A formação dos complexos está diretamente relacionada à hidrofobicidade da molécula hospedeira a ser incorporada e ao tamanho, devendo adequar-se inteiramente ou parcialmente no interior da cavidade da ciclodextrina (CEREDA, 2003; MATIOLI, 2000; MERZLIKINE et al., 2011). Como a molécula de PQ é mais hidrofílica, encontrou-se dificuldade em encontrar um intervalo de tempo específico para que o complexo de inclusão fosse formado. Padronizou-se o tempo de espera para cinco dias, pois, após alguns testes, observou-se que este tempo seria adequado, tendo havido uma mudança no comportamento ótico da PQ.

4.2.2 Avaliação espectrofotométrica da interação PQ:HPCD

A formação do complexo de inclusão provoca mudanças nos espectro de absorção da molécula hóspede, que são identificadas pelos deslocamentos batocrômicos e/ou pelo alargamento de bandas. Estas mudanças podem ser provocadas devido a uma perturbação dos níveis de energia eletrônicos do hóspede, causada pela interação direta com a ciclodextrina ou pela expulsão de moléculas de água de solvatação da cavidade da CD, ou, ainda, pelos dois efeitos (LYRA et al., 2010; SINGH et al., 2010).

Em soluções aquosas, após a inclusão de um fármaco na cavidade das CDs, há mudanças no ambiente químico e podem ocorrer deslocamentos (hipso e bato, hipo ou hiper-crômico) ou mudança de intensidade nos espectros (no pico de absorção máxima) de forma similar aos efeitos causados por solventes com diferentes polaridades (LIMA, 2010).

Em solução, nem todas as moléculas hóspedes encontram-se associadas à cavidade das CDs, devido ao equilíbrio dinâmico e, com o aumento da concentração de ciclodextrinas, uma maior quantidade de moléculas de PQ é capaz de formar complexos de inclusão. Por isso foi realizada a análise dos espectros de absorção UV-vis da molécula de PQ, em presença de concentrações crescentes de ciclodextrinas, conforme a Figura 11.

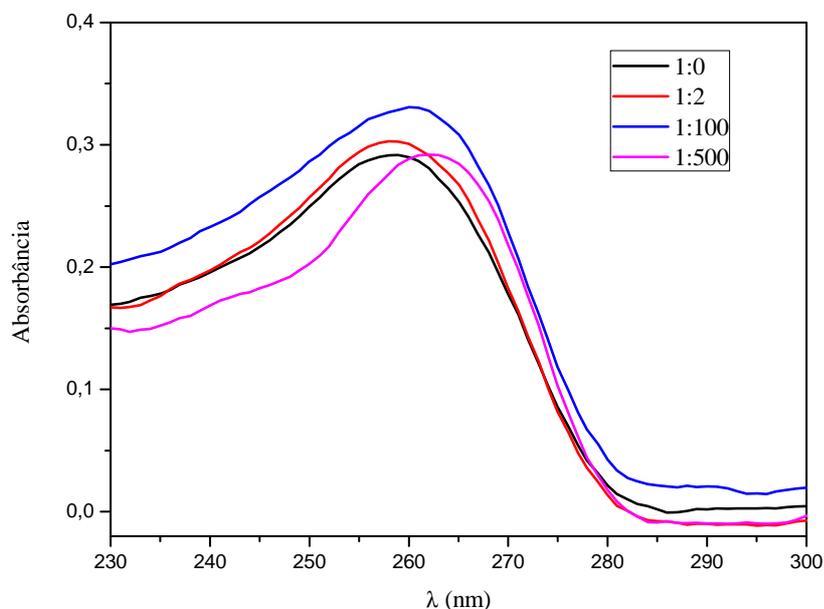


Figura 11 Variação da absorbância da PQ (25 μM) na presença de HPCD, em diferentes razões molares

Na Figura 11 observa-se que, à medida que a concentração de ciclodextrinas aumenta, ocorre um deslocamento do comprimento de onda de máxima absorção da PQ para valores mais elevados de comprimentos de onda. Para a PQ livre (1:0), o λ max foi de 259 nm, na proporção de 1:100 houve um aumento no comprimento de onda para 260 nm e na razão molar de 1:500, foi para 262 nm.

Em relação à intensidade de absorção com proporções ascendentes de HPCD, observou-se um aumento dessa intensidade, exceto para a proporção 1:500. Esse resultado reflete alterações no ambiente químico em que as moléculas de PQ estão presentes e indicam a transferência do fármaco do meio aquoso para a cavidade das ciclodextrinas (DODZIUK, 2006; VENTURINI,

2005). Devido à presença de deslocamentos batocrômicos (aumento do λ) significativos, pode-se sugerir a formação do complexo PQ:HPCD

Conhecendo-se o perfil de variação do espectro de absorção UV-vis da molécula de PQ em função da polaridade do meio, comparou-se o efeito da presença de ciclodextrinas no meio contendo PQ. Na Figura 12, pode-se observar o comportamento da molécula de PQ em diferentes meios, em água, em uma mistura de 20% de água e 80% de etanol ($\epsilon=32,8$) e na presença de HPCD, razão molar 1:1.

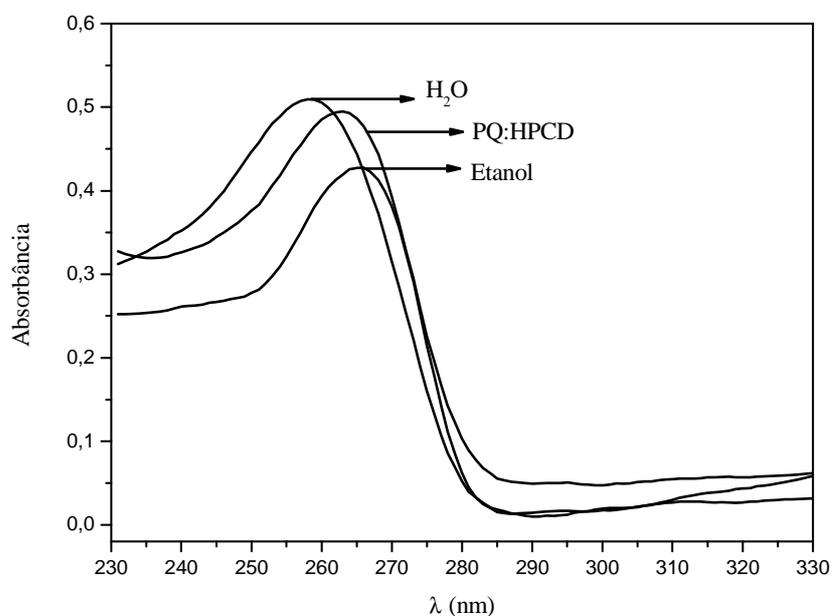


Figura 12 Variação da absorbância da PQ (25 μM) em água, em uma mistura água:etanol 20:80, v/v e em presença de HPCD

Dados da literatura demonstram que o interior da cavidade das ciclodextrinas pode apresentar diferentes constantes dielétricas, de acordo com

diferentes condições (como por exemplo, grau de hidratação da cavidade). Quando houve exposição ao ambiente hidrofóbico das ciclodextrinas, o comprimento de onda de máxima absorção da PQ apresentou comportamento hipocrômico e deslocamento para maiores comprimentos de onda. O mesmo aconteceu quando a PQ foi preparada em um ambiente menos polar, como o etanol ($\epsilon=32$), evidenciando que ocorre interação entre a molécula de PQ e a HPCD, visto que o ambiente químico da molécula se modificou (LIMA, 2010).

4.2.3 Análise por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR é bastante utilizada para se estimar a interação entre CDs e fármacos no estado sólido, caracterizando a formação do complexo de inclusão por meio de pequenas variações nas intensidades das bandas e a frequência dos espectros, comparando-se as moléculas livres e complexadas (RODRIGUES et al., 2011; CARVALHO; PINTO, 2012). Foram analisadas as bandas de absorção dos espectros da PQ e da HPCD livres, de sua mistura física e após a complexação (razão molar 1:1), conforme as Figuras 13 e 14.

No espectro de FTIR da HPCD constataram-se bandas características na região de $3.250-3.450\text{ cm}^{-1}$ e $1.000-1.100\text{ cm}^{-1}$, associadas aos estiramentos O-H e C-O-C, respectivamente, conforme consta também na literatura (BOCANEGRA-DIAZ; MOHALLEM; SINISTERRA, 2003; SILVA, 2005; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

No espectro de FTIR da PQ, encontraram-se os seguintes picos 2.968 , 1.612 , 1.469 , 1.199 , 1.051 , 958 , 815 e 518 cm^{-1} , referentes às bandas características de grupamentos CH_3 , CH_2 , C-H, C=C e C-O (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Estes resultados também estão em conformidade com os encontrados por Al-Badr, em 2005.

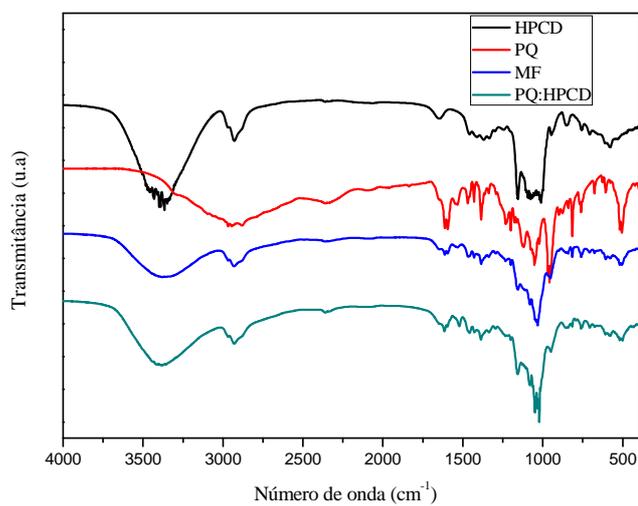


Figura 13 Espectro de infravermelho da primaquina pura (PQ), da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD), da mistura física (MF) e do complexo (PQ:HPCD)

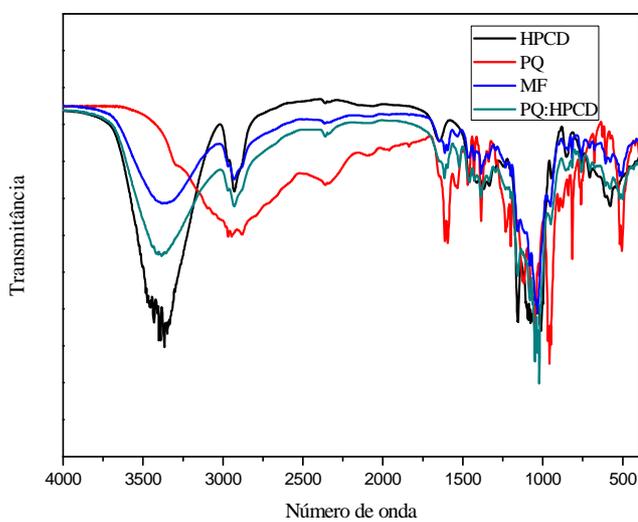


Figura 14 Espectro de infravermelho de superposição da primaquina pura (PQ), da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD), da mistura física (MF) e do complexo (PQ:HPCD)

A análise de espectros de infravermelho pode ser realizada comparando-se as bandas que representam a molécula hóspede, a CD e a mistura física com as que representam o complexo. Normalmente, o espectro da mistura física é a superposição da molécula hóspede e da CD, embora as bandas que representam a molécula hóspede sejam menos evidentes, devido à menor interação (TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012b).

Na análise da mistura-física das Figuras 13 e 14, notam-se alguns picos semelhantes ao espectro do complexo de inclusão, porém, menos intensos. Isso sugere que pode ter havido alguma interação fármaco:HPCD em estado sólido.

A análise do espectro do complexo de inclusão PQ:HPCD mostrou uma forte semelhança com o espectro da HPCD. Segundo Takahashi, Veiga e Ferraz (2012b), quando ocorre a complexação, os picos podem mudar de posição, diminuir ou, mesmo, desaparecer, sendo a modificação de algumas das bandas da molécula convidada indicativo de que apenas uma parte da molécula foi complexada por CD e o restante inalterado é responsável pela parte não encapsulada.

Na Figura 14 pode-se observar que, no complexo PQ:HPCD, as bandas características da PQ em 2.968, 1.612, 1.469, 815 e 518 cm^{-1} tiveram uma redução de intensidade comparada aos espectros isolados da PQ e da mistura física, indicando que, possivelmente, estes grupos estão participando da formação do complexo (AGUIAR et al., 2014). Percebe-se também um pequeno estreitamento nos modos de vibração do complexo comparado à HPCD pura, na região de 1.000-1.100 cm^{-1} . Pôde-se comparar, ainda, a intensidade dos picos e bandas das quatro amostras, observando-se uma diferença principalmente na região de 3.250 a 3.500 cm^{-1} , em que houve uma diminuição da HPCD livre em relação ao seu complexo e mistura física, talvez devido à ruptura de ligações de hidrogênio, depois de interagir com a molécula hóspede, devido à liberação da água de inclusão (RODRIGUES et al., 2011; CARVALHO; PINTO, 2005).

A caracterização da formação do complexo pode ser avaliada principalmente nos deslocamentos que ocorreram nas bandas da HPCD. Isso sugere que houve alguma interação entre átomos da PQ e da CD.

4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada para analisar qualitativamente a formação de complexos de inclusão, comparando-se as amostras morfologicamente. Normalmente, a mistura física apresenta os dois componentes distintos. Já no complexo de inclusão aparece apenas um, diferente morfologicamente das formas livres (TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012a).

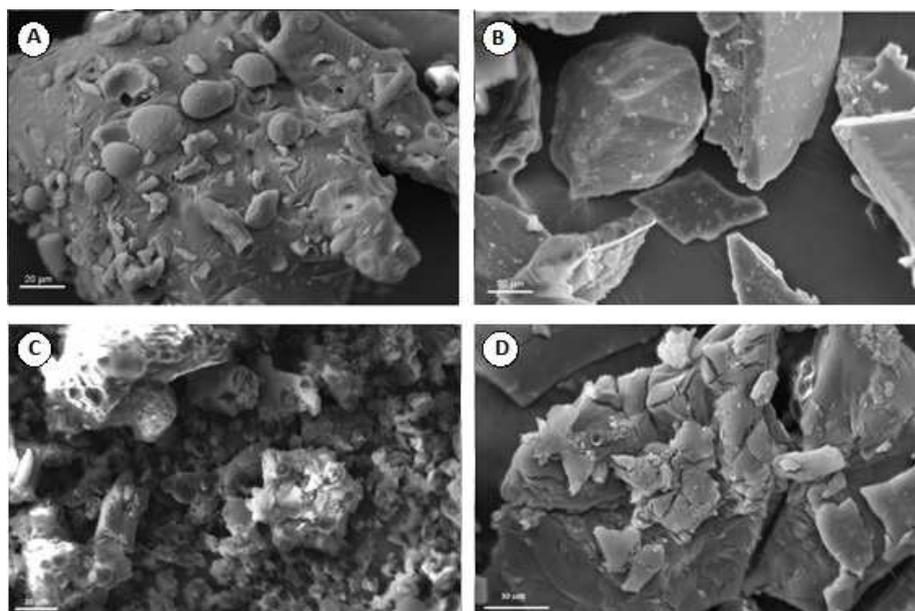


Figura 15 Micrografia eletrônica de varredura da HPCD (A), da PQ (B), da mistura física (C) e do complexo PQ:HPCD (D), com aumento de 1.500x

Na Figura 15(A) é possível observar que os cristais de HPCD apresentam uma estrutura arredondada e bem definida, como já reportado na literatura por MELO et al. (2007) e GUILHERME et al. (2010). Para a PQ livre foram observados cristais cúbicos-retangulares (Figura 15B). A mistura física PQ/HPCD revelou algumas semelhanças com a morfologia da HPCD livre, porém, em tamanhos menores, talvez pelo processo de masseração (Figura 15C). Já para o complexo de inclusão (Figura 15D), pode-se observar uma estrutura apresentando cristais com formas e tamanhos diferentes das estruturas puras, mostrando alterações nas quais a morfologia original dos cristais foi perdida, indicando que a complexação altera a estrutura original dos cristais dos fármacos, como descrito na literatura para outros compostos (GUILHERME et al., 2010; PINTO et al., 2005; MORAES et al., 2007; MELO et al., 2007).

4.2.5 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN)

O RMN é uma técnica amplamente empregada para determinar a formação de complexos de inclusão, tendo a vantagem de ser capaz de revelar a estrutura do complexo, permitindo visualizar de forma direta as interações que ocorrem entre as moléculas hóspedes e as CDs, identificando a parte da molécula convidada que se encontra incluída na cavidade da CD (LYRA et al., 2010; TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012b).

Seis prótons da CD podem ser utilizados na análise dos espectros de ^1H RMN, quatro localizados na superfície exterior (H1, H2, H4 e H6) e dois na cavidade H3, localizado próximo à cavidade mais larga e H5, localizado no lado mais estreito, conforme Figura 16. Geralmente, as mudanças no espectro de RMN das CDs são nos hidrogênios H3, H5 e H6, dependendo da profundidade em que a molécula hóspede entra na cavidade da CD. O fármaco convidado também apresenta alterações nos sinais correspondentes aos átomos que

penetraram na cavidade das CDs (LYRA et al., 2010; TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012b).

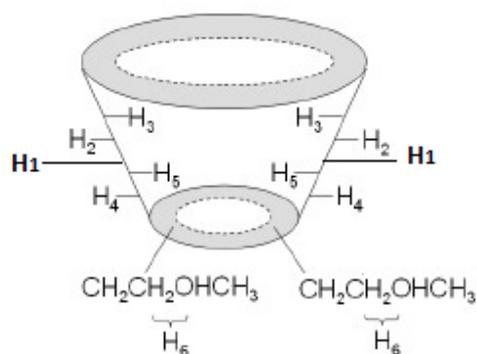


Figura 16 Representação dos hidrogênios da ciclodextrina

Foram obtidos espectros unidimensionais para a atribuição dos sinais dos hidrogênios das espécies individuais (PQ e HPCD) e, posteriormente, do complexo PQ:HPCD, a fim de avaliar a sua formação, observando possíveis alterações nos ambientes químicos dos hidrogênios após a formação do complexo. A atribuição de cada sinal em relação aos hidrogênios das moléculas de HPCD está representada na Figura 17.

No espectro ¹H RMN da HPCD observaram-se seis picos identificáveis e somente o pico do próton anomérico H1 apareceu em frequência maior que 4 ppm; os outros picos, H2, H3, H4, H5 e H6, apareceram entre 3,5 e 4,0 ppm. Portanto, os resultados encontrados para a HPCD estão de acordo com dados já relatados na literatura (ARAÚJO et al., 2008; GARNERO et al., 2010; GRILLO et al., 2008; ONNAINTY; LONGHI; GRANERO, 2011).

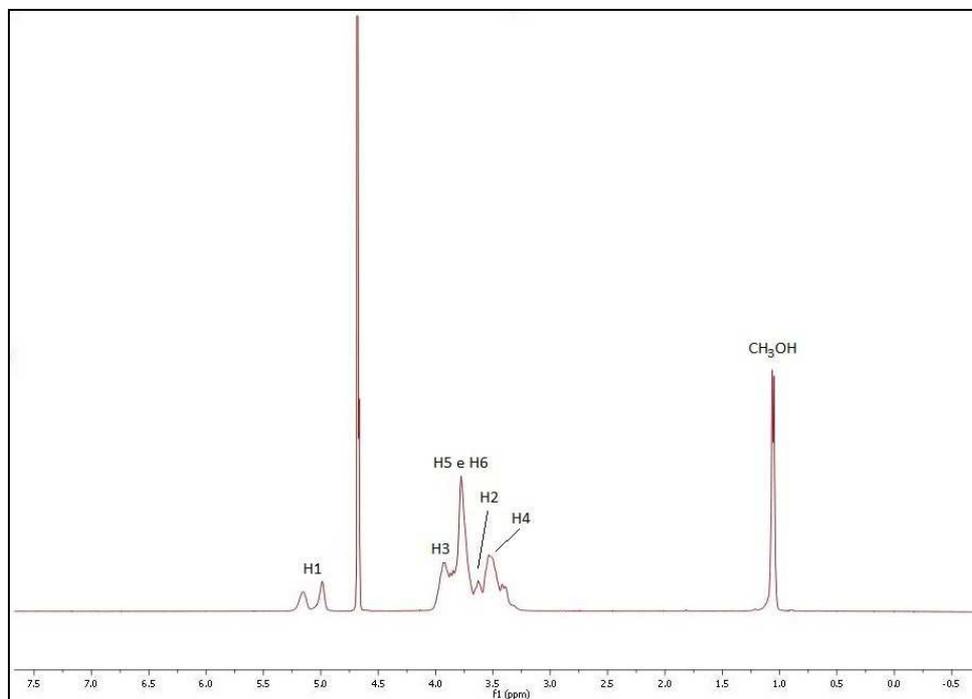


Figura 17 Espectro de ^1H RMN da hidroxipropil- β -ciclodextrina

Os sinais dos hidrogênios relacionados à molécula de PQ estão representados na Figura 18.

O espectro da PQ apresentou algumas regiões que são muito características, o que facilitou a atribuição, como, por exemplo, as regiões dos hidrogênios dos anéis aromáticos (6 a 8 ppm) e picos referentes à cadeia lateral. Entretanto, nem todas as regiões são tão características a ponto de se concluir a atribuição dos picos da PQ apenas com um espectro ^1H RMN monodimensional. De acordo com a Figura 18, os hidrogênios da molécula de primaquina puderam ser atribuídos em ótima concordância com os dados de literatura (KRISTENSEN et al., 1993; BLAU et al., 2008).

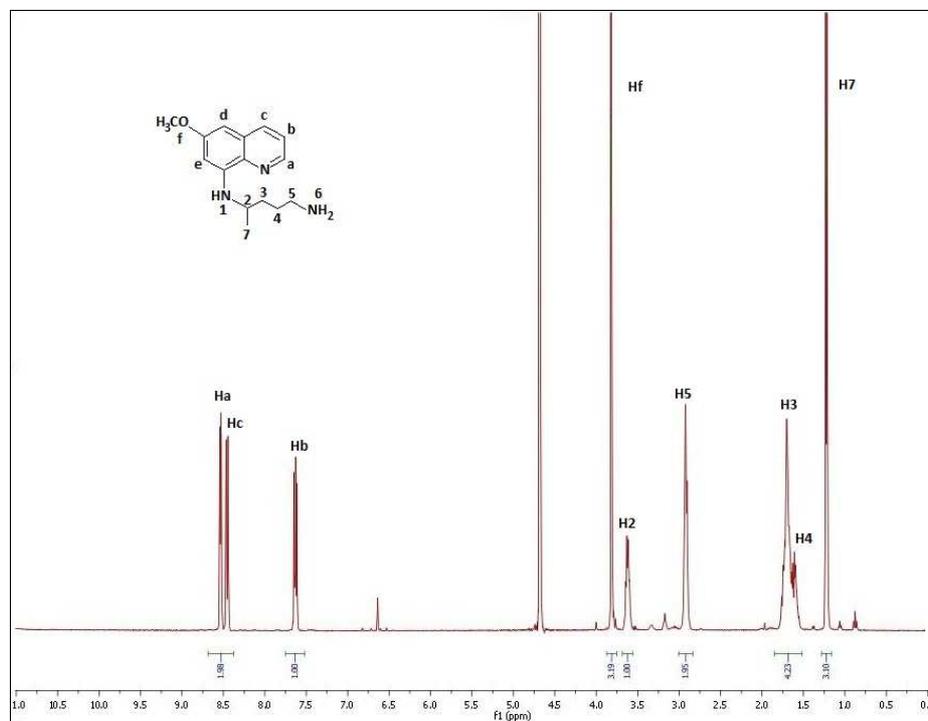


Figura 18 Espectro de ¹H RMN da primaquina

Para obter informações sobre a interação da PQ com a molécula de HPCD, foi observado o efeito da presença do fármaco no deslocamento químico dos sinais da HPCD por meio dos espectros da Figura 19. A partir destes dados, construíram-se as Tabelas 3 e 4, sendo possível observar o efeito da complexação no deslocamento químico dos hidrogênios da molécula de HPCD e PQ.

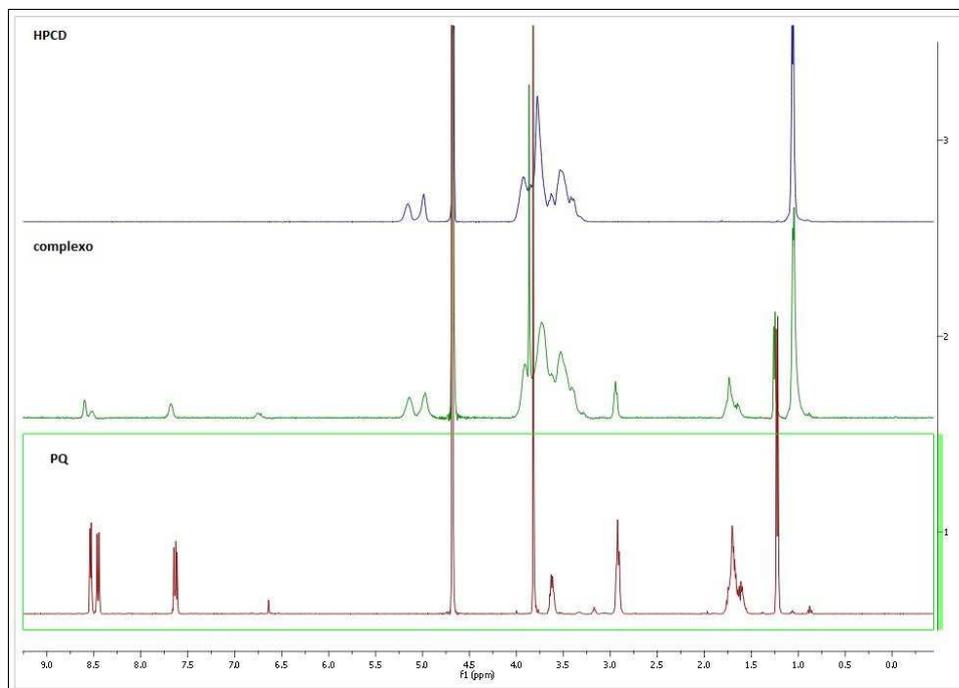


Figura 19 Espectro de ^1H RMN da HPCD, da PQ livre e do complexo PQ:HPCD

É possível notar, na Figura 19 e na Tabela 3, que a presença da PQ causa um deslocamento mínimo em praticamente todos os hidrogênios relativos à HPCD, sendo um pouco mais acentuada somente nos hidrogênios H1 e H2. Seria esperado um deslocamento maior, principalmente nos hidrogênios H3 e H5, pois a formação de complexos de inclusão com pequenas moléculas causa um efeito sobre a molécula de ciclodextrina, como se aumentasse a nuvem eletrônica sobre os hidrogênios da mesma, causando, assim, deslocamentos químicos nos prótons presentes no interior da ciclodextrina (SCHNEIDER et al., 1998).

Tabela 3 Atribuição e deslocamentos químicos dos prótons da HPCD, antes e após complexação com PQ

Atribuição	HPCD (ppm)	HPCD em PQ:HPCD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H1	5,00	4,96	-0,04
H2	3,70	3,62	-0,08
H3	3,90	3,90	0,0
H4	3,55	3,52	-0,03
H5	3,75	3,72	-0,03
H6	3,75	3,72	-0,03

Tabela 4 Atribuição e deslocamentos químicos dos prótons da PQ, antes e após complexação com HPCD

Atribuição	PQ (ppm)	PQ em PQ/HPCD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
Ha	8,6	8,59	-0,01
Hb	7,8	7,68	-0,12
Hc	8,5	8,52	+0,02
Hd	ND	ND	ND
He	ND	ND	ND
Hf	3,8	3,87	+0,07
H1	ND	ND	ND
H2	3,6	3,49	-0,11
H3	1,6	1,73	+0,13
H4	1,5	1,27	-0,23
H5	2,9	2,95	+0,05
H6	ND	ND	ND
H7	1,2	1,05	-0,15

ND: valor não determinado, devido ao fato de os hidrogênios se intercambiarem muito rápido com a H₂O.

Em relação à variação de deslocamento químico da PQ (Tabela 4), observou-se que a maior variação deste deslocamento se deu em sua cadeia lateral, indicando ser esta a parte que interage mais fortemente com a ciclodextrina. Isto está de acordo com os dados teóricos obtidos por Elbashir et al. (2010), que concluíram que os complexos mais estáveis foram obtidos quando a cadeia lateral butilamino da PQ é inserida dentro da cavidade das ciclodextrinas, pois o grupamento metoxi-quinolina é muito volumoso para se

ajustar na cavidade da mesma. O grupo concluiu, ainda, que as principais forças que contribuíram para a estabilidade desse complexo foram as forças de van der Waals e as forças eletrostáticas, tendo as ligações de hidrogênio também contribuído na energia de estabilização do complexo formado. A ligação de hidrogênio forte ocorreu entre a amina primária que se localiza em posição que permite a interação favorável com os átomos de oxigênio, localizados nas paredes interiores da molécula hospedeira.

A interação da cadeia lateral de PQ com a ciclodextrina pode indicar, ainda, a possibilidade de a primaquina formar um complexo de não inclusão, ou seja, se ligar à parte externa da ciclodextrina, o que faz sentido, já que a molécula de primaquina é bastante hidrofílica. Resultados parecidos foram encontrados por de Jesus e colaboradores (2012), em seus estudos sobre complexos entre riboflavina e ciclodextrinas. Estes estudos demonstraram que a interação entre riboflavina e β -CD ou HPCD, em baixas concentrações, parece ocorrer por meio de ligações de hidrogênio entre o flavonoide e o aro externo de ambas as CDs. Independentemente do mecanismo de complexação, estes resultados indicaram que os complexos de riboflavina e ciclodextrina aumentaram significativamente a solubilidade e potencializaram o efeito antitumoral do fármaco.

Os estudos de FTIR indicaram uma alteração nas intensidades das bandas características tanto da cadeia lateral quanto dos anéis aromáticos da molécula de PQ, indicando que pode haver uma interação do fármaco com a ciclodextrina tanto externamente (complexo de não inclusão) quanto incluso na cavidade da HPCD.

Para comprovar a suspeita da formação de complexos de não inclusão da primaquina com ciclodextrina, serão necessários estudos mais aprofundados, como, por exemplo, outras técnicas de ressonância magnética nuclear, como

ROESY, DOSY, medidas do tempo de relaxamento longitudinal (T_1), análises térmicas, difratometria de raios X e cálculos teóricos.

Na Figura 20 apresenta-se o resultado obtido pelo JobPlot para o H1 da HPCD (os outros hidrogênios estão muito próximos e amplos para fazer as medições com precisão e, portanto, não foram mostrados). O ponto de máxima variação no JobPlot foi obtido na razão molar $r=0,3$, o que indica que a complexação tem estequiometria de 1:2, ou seja, 1 molécula de PQ para duas moléculas de HPCD.

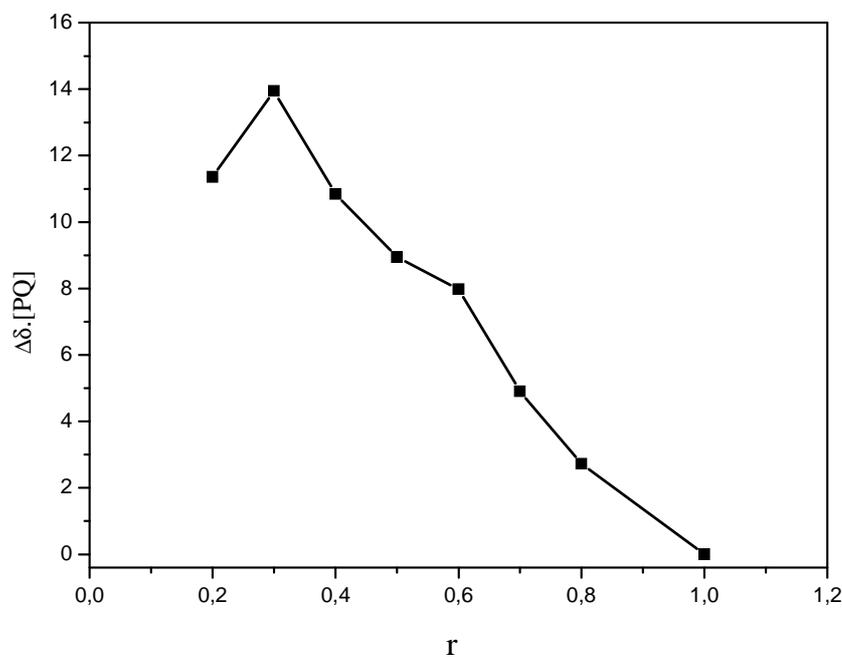


Figura 20 Gráfico de JobPlot do complexo PQ:HPCD

4.3 Testes *in vitro*

4.3.1 Teste de liberação *in vitro*

Os sistemas de liberação controlada devem modificar o perfil de concentração do fármaco, quando comparado à molécula livre, ou seja, devem apresentar liberação mais lenta ao longo do tempo. Assim, os testes de liberação *in vitro* permitem observar e avaliar a permeação de fármacos através de membranas, em que as formulações que apresentam menores taxas de liberação têm, possivelmente, maior constante de estabilidade na interação fármaco/CD (MORAES et al., 2007; GRILLO et al., 2008).

O teste de liberação realizado possibilitou avaliar a permeação do fármaco através da membrana. Neste ensaio, o fármaco tem a capacidade de atravessar os poros da membrana, pois apresenta massa molar de 455,35 Da, menor que o poro da membrana 1.000 Da, mas as moléculas de HPCD (massa molar 1.480 Da) são maiores e não a atravessam e, dessa forma, é possível observar o efeito da complexação na velocidade de liberação do fármaco (GRILLO et al., 2008).

Na Figura 21 apresentam-se os perfis de liberação da droga livre e de seu complexo de inclusão com HPCD em função do tempo. Observou-se que a presença de CD modifica, mesmo que em pequena proporção, o sistema de liberação do fármaco, em comparação com a solução controle (sem a presença de CD). Pela análise das curvas, observou-se que a liberação total da PQ (100%) em solução ocorreu após 4,5 dias (6.020 minutos) de diálise e, para o complexo de inclusão, neste mesmo intervalo de tempo, a liberação foi de, aproximadamente, 96%.

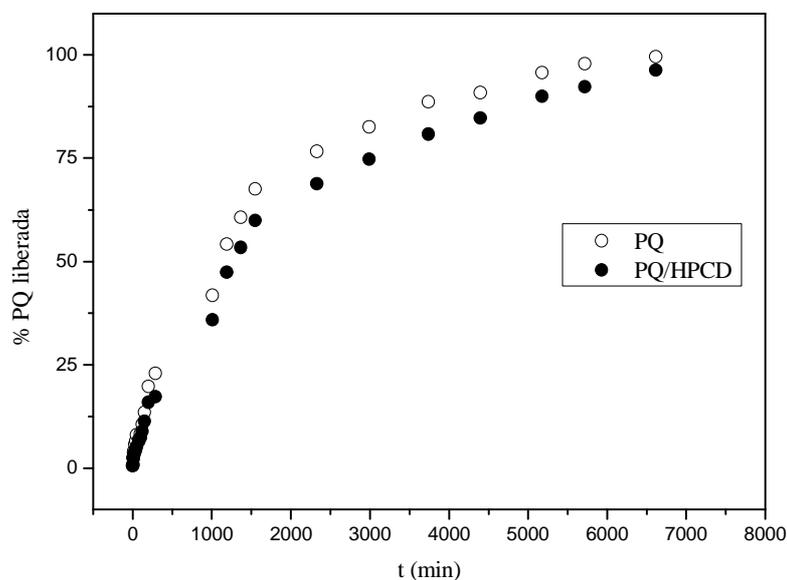


Figura 21 Curvas de liberação *in vitro* para PQ em ausência e em presença de HPCD (razão molar 1:1) à 37°C

O comportamento mais lento do complexo de inclusão pode ser explicado devido à existência do equilíbrio de complexação do fármaco com a ciclodextrina, em que o fármaco encontra-se constantemente se associando e desassociando da cavidade da ciclodextrina. No início, o fármaco que se encontra livre da cavidade da ciclodextrina apresenta uma liberação mais rápida, enquanto aquele que está associado à cavidade da ciclodextrina apresenta uma liberação mais lenta. Este mesmo comportamento já foi reportado na literatura para anestésicos locais (MORAES et al., 2007), antichagásico (GRILLO et al., 2008) e antibiótico (MELO et al., 2007). Uma vez que o poro da membrana de diálise é menor que o da HPCD, esta não atravessa a membrana e apresenta uma concentração constante ao longo do tempo, no compartimento doador. Porém, com a liberação da molécula do fármaco do interior da cavidade da CD e a

passagem do fármaco para o compartimento acceptor através da membrana, a proporção de ciclodextrina em relação ao fármaco no compartimento doador vai aumentando, fazendo com que ocorra um deslocamento do equilíbrio em função da formação de complexo, o que faz com que a liberação seja mais lenta em função do tempo, ou seja, modificada devido à complexação (GRILLO et al., 2008, MELO et al., 2007, MORAES et al., 2007).

4.3.2 Testes hemolíticos em condições isotônicas (liberação de Hb)

Na Figura 22 observa-se o efeito da HPCD, da primaquina e do complexo sobre eritrócitos, em condições de osmolaridade e pH fisiológicos (PBS 5 mM e pH 7,4). Nestes ensaios, a concentração de eritrócitos utilizada foi de 0,15%.

Na análise do perfil hemolítico, observa-se que tanto a primaquina livre quanto a complexada apresentaram efeito hemolítico em condições isotônicas nas concentrações superiores a 1 mM, tendo a porcentagem de hemólise sido maior na concentração de 2 mM. Nas concentrações superiores a 2 mM, o efeito lítico diminuiu, chegando a zero na concentração máxima utilizada (10 mM). Em baixas concentrações, inferiores a 1 mM, a membrana eritrocitária é capaz de absorver certa quantidade de “droga” sem que a lise ocorra; a partir de determinada concentração, a membrana se satura e a lise começa ocorrer. Nas concentrações superiores a 1 mM, a membrana está completamente desestruturada. Nesse caso, a hemoglobina como molécula “marcadora” é liberada em solução como sinal de saturação da membrana, seguida da sua solubilização. A hemoglobina necessita da abertura de grandes poros na membrana para a sua saída dos eritrócitos (HÄGERSTRAND; ISOMAA, 1991).

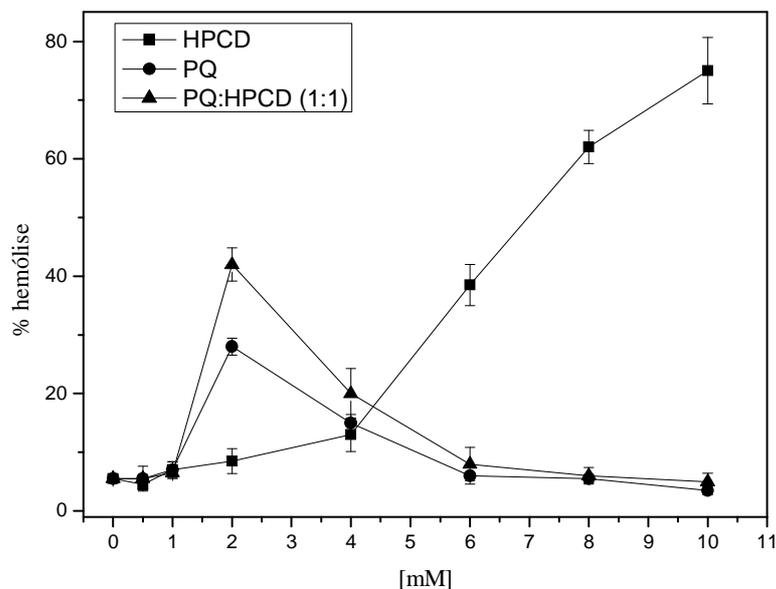


Figura 22 Efeito de concentrações crescentes de HPCD, PQ e complexo (PQ:HPCD) sobre eritrócitos íntegros (hematócrito de 0,15%), incubados em solução isotônica (PBS, pH 7,4), a 37 °C

A fim de entender o fenômeno de diminuição da porcentagem de hemólise nas concentrações superiores a 2 mM da primaquina livre e complexada, investigou-se o que poderia estar ocorrendo com a hemoglobina, já que o esperado seria um efeito dose dependente, ou seja, nas concentrações superiores a 2 mM, esperava-se um efeito lítico maior. Observou-se que, apesar de a porcentagem de hemólise na concentração de 2 mM da PQ livre (aproximadamente 30%) ser menor que da complexada (aproximadamente 40%), o efeito hemolítico, neste caso, é maior, pois a oxidação da hemoglobina diminuiu o pico de 412 nm, mascarando o efeito hemolítico. Os testes de oxidação apresentados a seguir confirmam esta hipótese.

Observou-se que, nas concentrações superiores a 2 mM, tanto da PQ livre quanto da complexada, a Hb liberada tinham coloração diferente (mais escura) e, nas concentrações acima de 4 mM de droga, havia cossedimentação da Hb, formando “botões”, indicando desnaturação proteica (BALAJI; TRIVED, 2013).

Muitos trabalhos na literatura mostram que vários compostos podem interagir com a hemoglobina, alterando suas propriedades ópticas, tornando-a inadequada à medida de lise eritrocitária. Para interpretar esse fenômeno, procuraram-se, na literatura especializada, trabalhos sobre o efeito oxidativo que a primaquina poderia causar e observou-se que a porcentagem de hemólise é alta em usuários deste fármaco (LIU et al., 2013; BURGOINE; BANCONE; NOSTEN, 2010; BALAJI; TRIVED, 2013).

Embora a primaquina seja o principal medicamento utilizado para a cura radical da infecção por *Plasmodium vivax*, infelizmente seu uso não é sem risco. Pacientes com deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase apresentam um aumento da susceptibilidade à hemólise, quando em terapia com este medicamento (BURGOINE; BANCONE; NOSTEN, 2010; ROCHFORD et al., 2013).

A hemólise aguda é um efeito colateral bem reconhecido em indivíduos em uso de PQ, principalmente aqueles com deficiência da enzima G6PD. A gravidade de hemólise está relacionada com o grau de G6PD e à dose de PQ, e pode ser exacerbada por infecções concomitantes, doenças no fígado (metabolismo reduzido da primaquina), insuficiência renal (atraso na excreção da primaquina) e a coadministração de outras drogas com potencial hemolítico, como, por exemplo, sulfonamidas (HOWES et al., 2013; GANESAN et al., 2012, ROCHFORD et al., 2013, TAYLOR; WHITE, 2004).

O efeito lítico da ciclodextrina sobre os eritrócitos foi baixo até a concentração de 4 mM, aproximadamente 10%. No entanto, nas concentrações

superiores a 4 mM, o efeito acentua-se, chegando a, aproximadamente, 80% na concentração máxima utilizada (10 mM).

4.3.3 Efeito oxidativo dos compostos sobre a hemoglobina

A Figura 23 refere-se ao controle do dano oxidativo da Hb, em que concentrações crescentes de $K_3Fe(CN)_6$ foram utilizadas. A concentração de Hb (purificada de acordo com o item 3.4.2) foi fixada em 20 μM para todos os experimentos e corresponde ao conteúdo celular de uma suspensão de hemácias de Ht 0,15%. Observa-se a alteração espectral da Hb (perda dos picos de 540 e 576 nm e aparecimento de pico em 630 nm) que acompanha a oxidação da Hb por $K_3Fe(CN)_6$, molécula utilizada como controle. Na concentração de 20 μM de Hb, observa-se que 100 μM de $K_3Fe(CN)_6$ são suficientes para oxidar completamente a oxi-Hb.

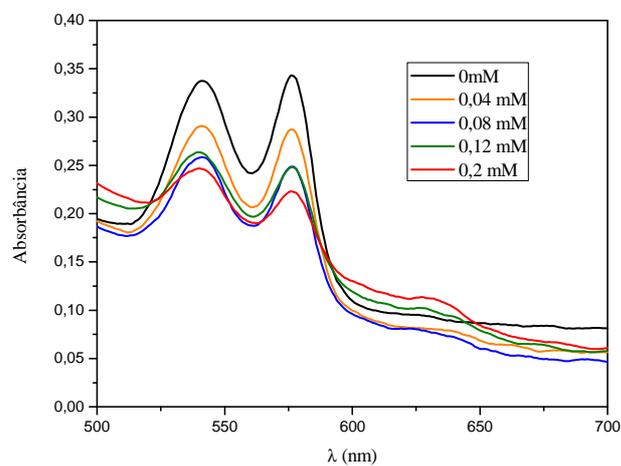


Figura 23 Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 μM) com concentrações crescentes de $K_3Fe(CN)_6$ em tampão PBS 5mM, pH 7,4, a 37°C

O pH das amostras de Hb foi monitorado e não havia variação significativa até a concentração máxima utilizada, eliminando a hipótese de efeito indireto, isto é, da alteração da estrutura da hemeproteína por efeito do pH.

4.3.4 Testes de oxidação da hemoglobina

Nas Figuras 24, 25 e 26 observa-se o efeito da ciclodextrina, da primaquina e do complexo sobre a hemoglobina purificada, conforme descrito no item 3.4.2.

A observação visual de “botões” e de coloração diferenciada da Hb (mais escura) foi o primeiro indicativo de oxidação. A oxidação da hemoglobina é a razão de não se registrar 100% de lise nos ensaios hemolíticos. A Hb oxidada deve formar hemicromos (precursores dos corpúsculos de Heiss) (PLATT; FALCONE, 1995) que são insolúveis e formam os “botões”, observados nos precipitados das amostras submetidas a altas concentrações de PQ livre e complexada. Como a hemólise é medida pela absorbância da Hb em solução, as leituras baixas (no sobrenadante) são erroneamente interpretadas como indicativas de pouca hemólise.

A análise do efeito oxidativo da PQ livre (Figura 24) e complexada (Figura 25) não mostrou diferença significativa de efeito entre a forma livre e a complexada, confirmando o efeito “levemente” maior na forma de PQ livre dos ensaios hemolíticos. O aparecimento do pico em 630 nm é o indicativo da formação de meta-hemoglobina, sendo a oxidação da hemoglobina a razão de não se registrar 100% de lise nos ensaios hemolíticos.

É importante ressaltar que a oxidação da Hb pela PQ livre e complexada não compromete a interpretação dos estudos hemolíticos. Uma alternativa para se observar o efeito hemolítico seria dosar a liberação de K^+ intracelular.

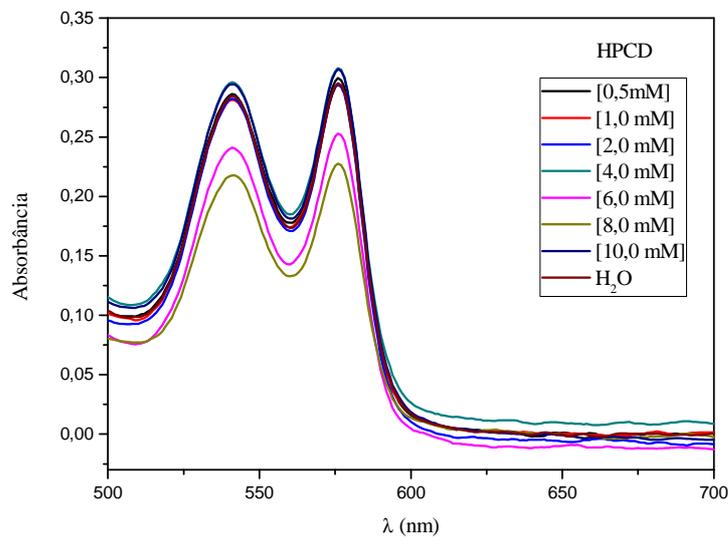


Fig
ura 24 Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 μ M) com concentrações crescentes de HPCD, em tampão PBS 5mM, pH 7,4, a 37 °C

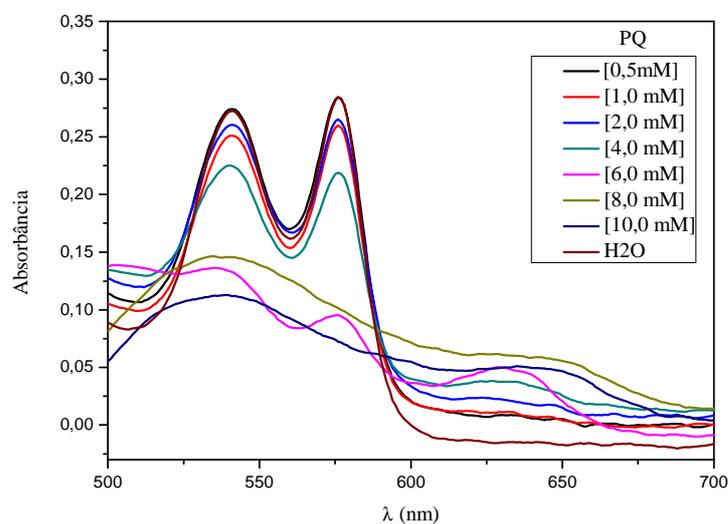


Figura 25 Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 μ M) com concentrações crescentes de primaquina, em tampão PBS 5mM, pH 7,4, a 37 °C

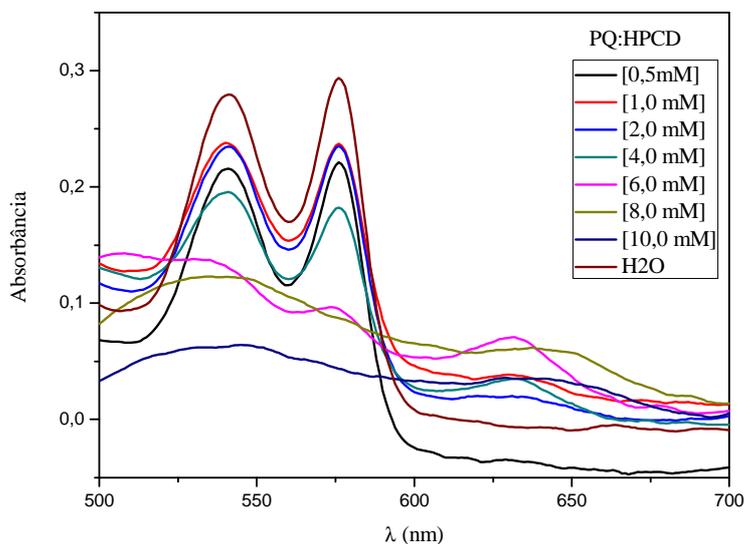


Figura 26 Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 μ M) com concentrações crescentes do complexo, em tampão PBS 5mM, pH 7,4, a 37 °C

A PQ é um agente oxidante e converte a Hb do sangue para MetHb, uma ação que é dose-dependente. Com a administração diária de primaquina, o nível médio MetHb aumenta, porém, existe uma grande variação interindividual (TAYLOR; WHITE, 2004, LIU et al., 2013). Utilizando mecânica quântica, Liu e colaboradores (2013) mostraram que tanto a PQ quanto os seus derivados não reduzem significativamente o potencial de ionização da hemoglobina.

A HPCD (Figura 24) não apresentou nenhum efeito oxidante sobre a hemoglobina nas concentrações utilizadas, confirmado que ele ocorre devido à interação da PQ com a molécula.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho foi realizado no intuito de preparar, caracterizar e avaliar a toxicidade por meio de testes de hemólise e oxidação da hemoglobina do complexo formado entre o antimalárico primaquina e hidroxipropil- β -ciclodextrina.

As caracterizações físico-químicas da formulação PQ:HPCD foram realizadas por meio da avaliação espectrofotométrica, FTIR, MEV e RMN. Por estas técnicas foi possível provar que há uma interação entre a molécula de PQ e a HPCD e prever a estequiometria mais provável de complexação (1:2 PQ:HPCD). Diante dos dados obtidos, sugere-se que seja possível que este complexo esteja se formando tanto por inclusão quanto por não-inclusão, ou seja, a PQ se ligando à parte externa da ciclodextrina. No espectro de ^1H RMN, os hidrogênios da HPCD mais afetados pela presença de PQ foram o H1 e o H2, que são externos, indicando assim, a existência de uma interação nesta porção da molécula de HPCD. É necessário realizar mais testes, a fim de se verificar qual interação específica está acontecendo entre PQ e HPCD e calcular o valor da constante de associação deste complexo.

Em relação aos testes *in vitro* realizados, concluiu-se que a presença de HPCD modificou, mesmo que em baixa extensão, o perfil de liberação do fármaco, em comparação à solução controle. Quando ocorreu a liberação total da PQ (100%), o complexo PQ:HPCD havia liberado cerca de 96%.

Em relação à hemólise, tanto a primaquina livre quanto a complexada apresentaram efeito hemolítico em condições isotônicas em concentrações superiores a 1 mM, tendo a porcentagem de hemólise sido maior na concentração de 2 mM. Na análise da oxidação da hemoglobina, a PQ livre apresentou diferença mínima em relação à complexada com HPCD.

Conclui-se assim, que houve interação entre a molécula de PQ e HPCD, porém, diante dos resultados dos testes *in vitro*, a formação do complexo aparentemente não beneficiou a molécula de PQ quanto à redução no seu efeito hemolítico, oxidativo e de liberação controlada. Para melhor análise a respeito do tipo de interação que ocorre entre PQ e HPCD, se fazem necessários estudos mais aprofundados de caracterização do complexo e outros testes de citotoxicidade, a fim de analisar o aumento da biodisponibilidade e a redução de toxicidade da molécula PQ complexada.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, U. N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de croton zehntneri com ciclodextrina. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p.50-55, 2014.

AL-BADR, A. A. Primaquine diphosphate: comprehensive profile. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, Amsterdam, v. 32, p. 153-208, 2005.

ANTONINI, E.; BRUNORI, M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. In: SURGENOR, D. M. **The red blood cell**. London: Academic Press, 1975. p. 753-797.

ARAÚJO, D. R. et al. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-cyclodextrin inclusion complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 60-71, Jan. 2008.

AREVALO-HERRERA, M. et al. Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin América. **Acta Tropica**, Basel, v. 121, n. 3, p. 303-314, Mar. 2012.

BAIRD, J. K.; HOFFMAN, S. L. Primaquine therapy for malaria. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 39, n. 9, p. 1336-1345, Nov. 2004.

BAIRD, J. K.; SURJADJAJA, C. Consideration of ethics in primaquine therapy against malaria transmission. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 11-16, Jan. 2011.

BALAJI, S. N.; TRIVED, V. Methemoglobin incites primaquina toxicity through single-electron oxidation and modification. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, London, v. 24, n. 2, p. 105-114, 2013.

BARBOSA, N. M.; MEIRELLES, N. C. Leghemoglobin: physical chemical properties. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 17, p. 183-188, 1994.

BASSO, L. G. M. et al. Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1808, n. 1, p. 55-64, Jan. 2011.

BERMAN, M.; BENESCH, R.; BENESCH, R. E. The removal of organic phosphates from Hb. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 26, p. 162-167, 1977.

BHADRA, D. et al. Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquina phosphate for liver targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 295, n. 1-2, p. 221-233, May 2005.

BLAU, L. et al. Synthesis and Total ¹H- and ¹³C-NMR Assignment of Cephem Derivatives for Use in ADEPT Approaches. **Molecules**, Basel, v. 13, n. 4, p. 841-854, Apr. 2008.

BOCANEGRA-DIAZ, A.; MOHALLEM, N. D. S.; SINISTERRA, R. D. Preparation of ferrofluid using cyclodextrin e magnetite. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 6, p. 936-941, Nov./Dez. 2003.

BOGNER, P. et al. Albumin can reverse the release of potassium from human erythrocytes treated with the non-ionic detergent, Brij 58. **Cell Biology International Reports**, London, v. 20, n. 11, p.741-749, Nov. 1996.

BUHA, S. M. et al. Líquid chromatography study on atenolol-cyclodextrin inclusion complex. **International Scholarly Research Network**, Gujarati, v. 2012, p. 1-8, 2012.

BULL, B. S.; BRETON-GORIUS, J.; BEUTLER, E. Morphology of the erythron. In: BEUTLER, E. et al. (Ed.). **Williams hematology**. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 297-316.

BURGOINE, K. L.; BANCONE, G.; NOSTEN, F. The reality of using primaquina. **Malaria Journal**, London, v. 9, p. 376, Dec. 2010.

CARDOSO-PELAEZ, F. et al. DNA damage, repair, and antioxidant systems in brain regions: a correlative study. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 28, n. 5, p. 779-785, Mar. 2000.

CARVALHO, L. B. de; PINTO, L. de M. A. Formation of inclusion complexes and controlled release of atrazine using free or silica-anchored-cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 74, n. 1-4, p. 375-381, Dec. 2012.

CAUCHEY, W. S. Porphyrin proteins and enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 36, p. 611-644, July 1967.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 26 out. 2012.

CEREDA, M. P. Ciclodextrinas: características e aplicações. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas: volume 2**. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. Cap. 17, p. 561-601.

CHI, L. M.; WU, W. G. Mechanism of hemolysis of red blood cell mediated by ethanol. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1062, n. 1, p. 46-50, Feb. 1991.

CHIU, D.; LUBIN, B.; SHOHET, S. B. Peroxidative reactions in red cell biology. In: PRYOR, W. A. **Free radicals in biology: volume 5**. (Ed.). New York: Academic Press, 1982. Chap. 5, p. 115-160.

CLEMENS, M. R.; WALLER, H. D. Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 45, n. 2-4, p. 251-268, Nov./Dec. 1987.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. **Biochemistry**, Washington, v. 35, p.895-900, July 1964.

CONNOR, J.; GILLUM, K.; SCHROIT, A. J. Maintenance of lipid assymetry in red blood cells and ghosts: effect of divalent cations and serum albumin on the transbilayer distribution of phosphatidylserine. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1025, n. 1, p. 82-86, June 1990.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

DEVAUX, P. F. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. **Biochemistry**, Washington, v. 30, n. 5, p. 1163-1173, Feb. 1991.

DINCER, Y. et al. Erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation in patients with coronary atherosclerosis. **Acta Medica Okayama**, Okayama, v. 53, n. 6, p. 259-264, Dec. 1999.

DODZIUK, H. **Cyclodextrins and their complexes**: chemistry, analitical methods, applications. Germany: Wiley-VCH, 2006.

ELBASHIR, A. A. et al. Capillary electrophoretic separation and computational modeling of inclusion complexes of cyclodextrin and 18-crown-6 ether with primaquine and quinocide. **Biomedical Chromatography**, London, v. 24, n. 4, p. 393-398, Apr. 2010.

EL-SAYED, M. A. Advantages of the incorporation of 2-hydroxyl propyl beta cyclodextrin and calixarene as ionophores in potentiometric ion-selective electrodes for rivastigmine with a kinetic study of its alkaline degradation. **Sensors and Actuators B: chemical**, Lausanne, v. 190, p. 101-110, Jan. 2014.

FERREIRA, M. E. S.; GOMES, M. S. M.; VIEIRA, J. L. F. Metahemoglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* em uso oral de Primaquina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 1, p. 113-115, jan./fev. 2011.

FRACETO, L. F. et al. Caracterização do Complexo de Inclusão Ropivacaina: β -ciclodextrina. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1203-1207, 2007.

GANESAN, S. et al. Cytochrome P₄₅₀-dependent toxic effects of primaquina on human erythrocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 241, n. 1, p. 14-22, Nov. 2009.

GANESAN, S. et al. Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: evaluation of eryptotic pathway. **Toxicology**, Limerick, v. 294, n. 1, p. 54-60, Mar. 2012.

GARNERO, C. et al. Studies on trimethoprim:hydroxypropyl-cyclodextrin: aggregate and complex formation. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 345, n. 17, p. 2550–2556, Nov. 2010.

GARRETT, R. H.; GRISHA, C. M. **Biochemistry molecular**: aspects of cell biology. New York: Saunders Colleg Pubi, 1995.

GOLDBERG, B.; STERN, A. Superoxide anion as a mediator of drug-induced oxidative hemolysis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 251, n. 20, p. 6468-6470, Oct. 1976.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2012.

GRILLO, R. et al. Caracterização físico química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil-ciclodextrina. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 290-295, 2008.

GUILHERME, A. et al. Caracterização e atividade farmacológica do diclofenaco-zinco (II) e do complexo de inclusão diclofenaco-zinco (II)-hidroxipropil-ciclodextrina. **Bioikos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 119-127, jul./dez. 2010.

GUZZO, M. R. **Estudo da complexação da Fisetina com ciclodextrinas**. 2007. 142 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.

HÄGERSTRAND, H.; ISOMAA, B. Amphiphile induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 335-347, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C. (Ed.). **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HOWES, R. E. et al. Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. **Malaria Journal**, London, v. 12, p. 418, Nov. 2013.

JESUS, M. B. de et al. Theoretical and experimental study of a praziquantel and cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and H-nuclear magnetic resonance. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 41, n. 4, p. 1428-1432, June 2006.

KAHANA, E.; STREICHMAN, S.; SILVER, B. L. The role of electrostatic forces in the interaction between the membrane and cytoskeleton of human

erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1066, n. 1, p. 1-5, July 1991.

KOGA, K.; MURAKAMI, M.; KAWASHIMA, S. Contribution of hydrophobicity of nonionic detergents to membrane lipid fluidity and disopyramide uptake by rat intestinal brush-border membrane vesicles. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 20, n. 6, p. 674-679, June 1997.

KONUKOGLU, D.; AKCAY, T.; ERDEM, T. Susceptibility of erythrocyte lipids to oxidation and erythrocyte antioxidant status in myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 31, n. 8, p. 667-671, Nov. 1998.

KRISTENSEN, S. et al. Photochemical stability of biologically active compounds: V. photochemical degradation of primaquina in an aqueous medium. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 100, n. 1-3, p. 15-23, Nov. 1993.

KUMAR, V. et al. **Patologia-bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KURATA, M.; SUZUKI, M.; AGAR, N. S. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, Oxford, v. 106, n. 3, p. 477-487, Nov. 1993.

LAURIAULT, V. V. M.; O'BRIEN, P. J. Disulfiram may mediate erythrocyte hemolysis induced by diethyldithiocarbamate and 1,4-naphthoquinone-2-sulfonate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 284, n. 1, p. 207-214, Jan. 1991.

LIMA, R. A. F. **Avaliação de formulações anestésicas de tetracaína em beta-ciclodextrina e hidroxipropil beta-ciclodextrina**. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

LIU, H. et al. Effect of antimalarial drug primaquine and its derivatives on the ionization potential of hemoglobin: a QM/MM study. **Medicinal Chemistry Communications**, Cambridge, v. 4, n. 8, p. 1145-1147, Aug. 2013.

LOFTSSON, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers. **Die Pharmazie**, Berlin, v. 53, n. 11, p. 733-740, Nov. 1998.

LUX, S. E. Hereditary in the membrane or metabolism of the red cell. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. **Cecil textbook of medicine**. 18. ed. Philadelphia: Saunders, 1988. p. 909-917.

LYRA, M. A. M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrinas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010.

MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C.; PAULA, E. de. Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 89-100, Jan. 2000.

MALHEIROS, S. V. P.; PAULA, E. de; MEIRELLES, N. C. Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1373, n. 2, p. 332-340, Sept. 1998.

MARCONI, G. et al. A circular dichroism and structural study of the inclusion complex artemisinin-cyclodextrin. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 383, n. 5-6, p. 566-571, Jan. 2004.

MARTINEZ-CAYUELA, M. Oxidative free radicals and human disease. **Biochimie**, Paris, v. 77, p. 147-161, 1995.

MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em:** alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. Maringá: Eduem, 2000.

MELO, N. F. S. et al. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxiopropil-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 1, p. 35-44, 2007.

MERZKLIKINE, A. et al. Development of machine learning models of β -cyclodextrin and sulfobutylether-cyclodextrin complication free energies. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 418, p. 207-216, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de terapêutica da malária**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during autoxidation of hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 247, p. 6960-6962, Nov. 1972.

MORAES, C. M. et al. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil -ciclodextrina. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 777-784, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

NOSSO MEIO POR INTEIRO. **Protozoários**. [S.l.: s.n.], 2011. Disponível em: <<http://nossomeioporinteiro.wordpress.com/tag/protozoarios/>>. Acesso em: 07 mar. 2014.

ONNAINTY, R.; LONGHI, M. R.; GRANERO, G. E. Complex formation of chlorhexidine gluconate with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR). **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 346, p. 1037–1046, 2011.

PÉREZ-GARRIDO, A. et al. QSPR Modelling with the topological substructural molecular design approach: β -cyclodextrin complexations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 98, n. 12, p. 4557-4575, Dec. 2009.

PEUCHANT, E. et al. Antioxidant effects of a supplemented very low protein diet in chronic renal failure. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 22, n. 1-2, p. 313-320, 1977.

PINHEIRO, M. **Avaliação farmacocinética da ropivacaína associada à sistemas de liberação sustentada**. 2012. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2012.

PINTO, L. M. A. et al. Physico-chemical characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 956–963, Oct. 2005.

PLATT, O. S.; FALCONE, J. F. Membrane-protein interactions in sickle red-blood-cells - evidence of abnormal protein-3 function. **Blood**, New York, v. 86, n. 5, p. 1992-1998, Sept. 1995.

PLATT, O. S.; LUX, S. E.; FALCONE, J. F. A highly conserved region of human erythrocyte ankyrin contains the capacity to bind spectrin. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 32, p. 24421-24426, Nov. 1993.

PUPPO, A.; HALLIWELL, B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. **Biochemical Journal**, v. 249, n. 1, p. 185-190, Jan. 1988.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

ROCHFORD, R. et al. Humanized mouse model of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency for in vivo assessment of hemolytic toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 110, n. 43, p. 17486-17491, Oct. 2013.

RODRIGUES, S. G. et al. Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl-cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 70, n. 1-2, p. 19-28, June 2011.

ROJAS-AGUIRRE, Y. et al. Effects of an antimalarial quinazoline derivative on human erythrocytes and on cell membrane molecular models. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1818, n. 3, p. 738-746, Mar. 2012.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, São Caetano do Sul, v. 37, n. 1, p. 1-17, jan./abr. 2001.

SANCHO, M. I. et al. Inclusion complex of 2-chlorobenzophenone with cyclomaltoheptaose (cyclodextrin): temperature, solvents effects and molecular

modeling. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 346, n. 13, p. 1978-1984, Sept. 2011.

SANTANA, M. S. et al. Associação de metahemoglobinemia e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária tratados com Primaquina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 5, p. 113-115, 2007.

SCHERIER, S. L. Red cell membrane biology: introduction. **Clinical Haematology**, London, v. 14, n. 1, p. 1-12, Feb. 1985.

SCHNEIDER, H. J. et al. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Chemical Reviews**, Easton, v. 98, n. 5, p. 1755-1785, July 1998.

SCHNEIDER, R. G. Review of hemoglobin-variants studied in Southwestern U.S.A. **Hemoglobin**, New York, v. 4, n. 3-4, p. 363-371, 1980.

SCHROIT, A. J.; ZWALL, R. F. A. Transbilayer movement of phospholipids in red-cell and platelet membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1071, n. 3, p. 313-329, Nov. 1991.

SEEMAN, P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 24, n. 4, p. 583-655, Dec. 1972.

SILVA, M. R. M. da. **Formulação líquida oral do acetato de hidrocortisona incluso em ciclodextrina**: desenvolvimento e validação da metodologia analítica. 2005. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

SILVA, R. T. et al. Deficiência de glicose -6-fosfatodesidrogenase em adultos. **NewsLab**, Natal, n. 79, p. 96-102, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. New York: Wiley, 2005.

SINGH, R. et al. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes: a review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, Bethesda, v. 2, n. 3, p. 171-183, 2010.

STELLA, V. J.; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**, Newark, v. 36, n. 1, p. 30-42, Jan. 2008.

STENSRUD, G. et al. Formulation and characterisation of primaquine loaded liposomes prepared by a pH gradient using experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 198, n. 2, p. 213–228, Apr. 2000.

STORCH, J.; KLEINFELD, A. M. The lipid structure of biological membranes. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 10, n. 11, p. 418-421, Nov. 1985.

STREICHMAN, S.; KAHANA, E.; SILVER, B. L. EPR study of hydrophobic interaction of spectrin with fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1066, n. 1, p. 9-13, July 1991.

TAKAHASHI, A. I.; VEIGA, F. J. B.; FERRAZ, H. G. A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization - part I: phase solubility diagram, dissolution and scanning electron microscopy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 1-6, Jan./Feb. 2012a.

TAKAHASHI, A. I.; VEIGA, F. J. B.; FERRAZ, H. G. A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization - part II: x-ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 8-15, Jan./Feb. 2012b.

TAYLOR, W. R.; WHITE, N. J. Antimalarial drug toxicity: a review. **Drug Safety**, Mairangi Bay, v. 27, n. 1, p. 25-61, 2004.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Primaquine revisited six decades after its discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 44, n. 3, p. 937-953, 2009.

VAN DEN BERG, J. J. M. et al. Direct and continuous measurement of hydroperoxide-induced oxidative stress on the membrane of intact erythrocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 11, n. 3, p. 255-261, 1991.

VENTURINI, C. G. **Estudos do comportamento de corantes solvatocrômicos em soluções de ciclodextrinas**. 2005. 77 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Regional de Blumenau, 2005.

VOET, D.; VOET, J. G. Lipids and membranes. In: VOET, D.; VOET, J. G. (Ed.). **Biochemistry**. New York: John Wiley e Sons, 1990. p. 291-295.

WINTERBOURN, C. C.; METODIEWA, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 27, p. 322-328, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2013**. Suíça: WHO, 2013.

YANG, B. et al. Artemether/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host guest system: characterization, phase-solubility and inclusion mode. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, n. 17, p. 6311-6317, Sept. 2009.

YANG, H. et al. A thermodynamic study of the cyclodextrin – UC781 inclusion complex using a HPLC method. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 72, n. 3-4, p. 459-465, Apr. 2012.