

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE MALÁRIA EXPERIMENTAL EM RATOS
WISTAR E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO NO PERFIL
FARMACOCINÉTICO E NA DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DA QUININA**

HELEN CRISTINA PEDRONI

Porto Alegre, 2005

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE MALÁRIA EXPERIMENTAL EM RATOS
WISTAR E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO NO PERFIL
FARMACOCINÉTICO E NA DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DA QUININA**

Dissertação apresentada por
HELEN CRISTINA PEDRONI para
obtenção de GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Dalla Costa
Co-orientadora: Profa. Dra. Silvia Spalding

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado/Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 21/06/2005, pela Comissão/Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Célia Gervásio Machado Chaves
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro E. Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

P372d

Pedroni, Helen Cristina

Desenvolvimento de modelo de malária experimental em ratos Wistar e avaliação da influência da infecção no perfil farmacocinético e na distribuição tecidual da quinina / Helen Cristina Pedroni – Porto Alegre: UFRGS, 2005. – xxviii, 186 p.: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Plasmodium berghei*. 2. Modelos animais: ratos Wistar. 3. Infecção Experimental. 4. Quinina. 5. Farmacocinética. I. Dalla Costa, Teresa Cristina. II. Spalding, Silvia. III Título .

CDU: 615.2.015.4

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e no Centro Bioanalítico de Medicamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com bolsa de estudos financiada pelo CNPq.

“O caminho mais seguro para chegar ao verdadeiro futuro é ir na direção em que teu medo cresce”.

Dicionário Kazar

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Teresa Dalla Costa pela orientação, aprendizado, confiança depositada e, especialmente, pelo exemplo de profissionalismo;

À Prof^a. Dr^a. Silvia Spalding pela colaboração no desenvolvimento da metodologia de infecção experimental;

Agradeço, de forma muito especial, à Clarissa Cassini Bettoni pela amizade, compreensão e, sobretudo pela dedicação incondicional a este projeto. Através de sua competência e responsabilidade foi possível a realização dos experimentos apresentados nesta dissertação;

À Ana Elisa de Oliveira pela parceria nas longas jornadas de experimentos, colaboração e incentivo;

Aos integrantes do laboratório 405, pela cumplicidade, amizade e pelos momentos de descontração proporcionados;

Aos meus grandes amigos Dani, Marcos, Marcelo, Cíntia e todos amigos PCN pelos essenciais momentos de descontração, hipóteses levantadas, discutidas e, às vezes, esquecidas. Sem vocês teria sido bem menos gratificante;

À toda minha família e, em especial, à minha mãe e irmão que, pela grande amizade e cumplicidade, exerceram papel fundamental na minha formação como ser humano;

À bioterista Rose pelo cuidado e zelo com os animais de experimentação utilizados neste estudo;

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia e do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	vii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xvii
Abreviações.....	xxi
Resumo.....	xxv
Abstract.....	xxvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo Geral.....	7
2.2. Objetivos Específicos.....	7
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3.1. Malária.....	11
3.1.1. Epidemiologia.....	11
3.1.2. Biologia do Parasita.....	12
3.1.3. Patogenia da Malária.....	13
3.1.4. Tratamento da Malária.....	15
3.1.5. Profilaxia da Malária.....	17
3.1.6. Medidas de Controle da Malária.....	18
3.2. Modelos de Infecção Experimental de Malária	19
3.3. Quinina.....	24
3.3.1. Química.....	24

3.3.2. Propriedades Farmacodinâmicas da Quinina.....	26
3.3.3. Propriedades Farmacocinéticas da Quinina.....	28
3.3.4. Resistência à Quinina.....	33
3.3.5. Terapêutica da Quinina.....	33
3.4. Microdiálise.....	34
3.4.1. Calibração das Sondas de Microdiálise.....	36
3.4.1.1. Recuperação <i>in vitro</i>	37
3.4.1.2. Recuperação <i>in vivo</i>	38
3.4.2. Microdiálise em Tecido Hepático e Muscular.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. Materiais.....	45
4.2. Equipamentos.....	46
4.3. Animais.....	47
4.4. Cepa de <i>Plasmodium berghei</i>	48
4.5. Metodologia.....	49
4.5.1. Manutenção da Cepa de <i>Plasmodium berghei</i>	49
4.5.2. Infecção Experimental.....	49
4.5.2.1. Preparo do Inóculo.....	50
4.5.2.2. Indução do Processo Infeccioso.....	50
4.5.2.3. Avaliação do Processo Infeccioso.....	51
4.5.2.4. Aferição da Temperatura Durante a Infecção Experimental.....	52
4.5.3. Adequabilidade da Metodologia de Malária Experimental.....	52
4.5.4. Estabelecimento da Dose Efetiva de Quinina.....	53
4.5.5. Metodologia Analítica para Quantificação da Quinina por CLAE.....	53
4.5.5.1. Condições Cromatográficas.....	53
4.5.5.2. Preparo da Curva Padrão e Controles de Qualidade em Plasma.....	54

4.5.5.3. Processamento das Amostras de Plasma.....	55
4.5.5.4. Validação da Metodologia Analítica por CLAE para Plasma.....	55
4.5.5.5. Validação da Metodologia Analítica por CLAE para Dialisado.....	56
4.5.6. Teste de Estabilidade das Amostras Biológicas.....	56
4.5.7. Experimentos Farmacocinéticos.....	57
4.5.7.1. Perfil Plasmático.....	57
4.5.7.2. Distribuição Tecidual.....	58
4.5.7.2.1. Recuperação das Sondas de Microdiálise <i>in vitro</i>	60
4.5.7.2.2. Recuperação das Sondas de Microdiálise <i>in vivo</i>	61
4.5.7.3. Avaliação dos Perfis Plasmático e Tecidual da Quinina.....	61
4.5.7.3.1. Análise Não Compartmental.....	61
4.5.7.3.2. Análise Compartmental.....	64
4.5.7.4. Análise Estatística.....	65
4.5.8. Ligação da Quinina às Proteínas Plasmáticas.....	65
4.5.9. Determinação da Concentração de Albumina Sérica.....	67
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1. Infecção Experimental.....	71
5.1.1. Aferição da Temperatura Durante a Infecção Experimental.....	78
5.2. Adequabilidade da Metodologia de Infecção Malárica Desenvolvida.....	80
5.3. Estabelecimento da Dose Efetiva de Quinina.....	82
5.4. Validação da Metodologia Analítica por CLAE.....	86
5.4.1. Validação da Metodologia Analítica por CLAE para Plasma.....	87
5.4.1.1. Precisão.....	88
5.4.1.2. Exatidão.....	89
5.4.1.3. Linearidade.....	90
5.4.1.4. Limite de Quantificação.....	92

5.4.2. Validação da Metodologia Analítica por CLAE para Dialisado.....	93
5.4.2.1. Precisão.....	94
5.4.2.2. Exatidão.....	95
5.4.2.3. Linearidade.....	95
5.4.2.4. Limite de Quantificação.....	97
5.5. Teste de Estabilidade das Amostras Biológicas.....	98
5.6. Ligação da Quinina às Proteínas Plasmáticas.....	100
5.7. Determinação da Concentração de Albumina Sérica.....	104
5.8. Avaliação Farmacocinética da Quinina.....	107
5.8.1. Perfil Plasmático.....	107
5.8.1.1. Análise Não-Compartimental.....	108
5.8.1.2. Análise Compartimental.....	115
5.8.2. Distribuição Tecidual.....	128
5.8.2.1. Recuperação das Sondas de Microdiálise <i>in vitro</i>	129
5.8.2.2. Recuperação das Sondas de Microdiálise <i>in vivo</i>	133
5.8.2.3. Concentrações Livres Teciduais da Quinina.....	133
6. CONCLUSÕES.....	143
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
8. ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição da malária no mundo.....11
- Figura 2.** Ciclo vital do *Plasmodium* e local de ação dos fármacos antimaláricos....13
- Figura 3.** Fórmula estrutural da quinina.....25
- Figura 4.** Mecanismo de entrada da quinina para os eritrócitos e transferência para o vacúolo parasitóforo.....27
- Figura 5.** Perfil plasmático médio obtido após administração oral de dicloridrato de quinina (10 mg/kg) a pacientes em fase aguda de malária e após recuperação.....30
- Figura 6.** Perfil parasitêmico médio obtido após inoculação intraperitoneal de 10^5 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* a ratos Wistar de 10 semanas.....72
- Figura 7.** Perfil de sobrevivência cumulativa de ratos Wistar de 5 semanas infectados com 10^7 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* pela via i.v. e i.p.....75
- Figura 8.** Perfil de sobrevivência cumulativa de ratos Wistar de 5 semanas infectados com 10^8 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* pela via i.v. e i.p.....75
- Figura 9.** Perfil parasitêmico médio obtido após inoculação i.p. e i.v. de 10^8 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* em ratos Wistar de 5 semanas.....76

Figura 10. Perfil de temperatura retal de ratos Wistar sadios e de ratos de 5 semanas infectados pela via i.v. com 10^7 hemáceas parasitadas por <i>Plasmodium berghei</i>	79
Figura 11. Parasitemia média obtida após tratamento com 30 mg/kg/dia de cloroquina ou quinina nos dias 7-9 pós-inoculação i.v. de 10^8 hemáceas parasitadas por <i>Plasmodium berghei</i> em ratos Wistar de 5 semanas.....	81
Figura 12. Perfil de infecção de ratos Wistar de 5 semanas infectados pela via i.v. com 10^8 hemáceas parasitadas por <i>Plasmodium berghei</i> obtido após tratamento com quinina pela via oral na dose de 50 mg/kg q4h e q8h nos dias 7-9 pós-infecção.....	84
Figura 13. Perfil de infecção de ratos Wistar de 5 semanas infectados pela via i.v. com 10^8 hemáceas parasitadas por <i>Plasmodium berghei</i> obtido após tratamento com quinina pela via oral na dose de 250 mg/kg q8h nos dias 7-9 pós-infecção.....	85
Figura 14. Cromatogramas obtidos por CLAE para a quinina em amostras de plasma de rato.....	87
Figura 15. Curva padrão média da quinina em plasma de ratos determinada por CLAE.....	91
Figura 16. Cromatogramas obtidos por CLAE para a quinina em solução de Ringer.....	93
Figura 17. Curva padrão média da quinina em solução de Ringer obtida por CLAE.....	96
Figura 18. Ligação da quinina às proteínas plasmáticas em ratos sadios e infectados por <i>Plasmodium berghei</i> com baixa parasitemia e com alta parasitemia.....	101

Figura 19. Perfil plasmático médio da quinina administrada na dose de 50 mg/kg pela via intravenosa a ratos Wistar saudáveis.....	108
Figura 20. Perfil plasmático médio da quinina administrada na dose de 250 mg/kg pela via oral a ratos saudáveis e infectados por <i>Plasmodium berghei</i> com baixa e alta parasitemia.....	110
Figura 21. Perfil plasmático médio da quinina administrada pela via i.v. na dose de 50 mg/Kg a ratos Wistar saudáveis modelado para 2 compartimentos.....	116
Figura 22. Representação esquemática do modelo farmacocinético de um compartimento com duas constantes de absorção paralelas.....	121
Figura 23. Perfil plasmático médio da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/Kg a ratos Wistar saudáveis modelado para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.....	122
Figura 24. Perfil plasmático médio da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/Kg a ratos Wistar infectados com baixa parasitemia modelado para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.....	123
Figura 25. Perfil plasmático médio da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/Kg a ratos Wistar infectados por <i>Plasmodium berghei</i> com alta parasitemia modelado para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.....	123
Figura 26. Influência do fluxo de perfusão na recuperação <i>in vitro</i> das sondas de microdiálise pela técnica de ganho.....	131
Figura 27. Perfis médios de concentração livre hepática e muscular da quinina obtidos após administração oral de 250 mg/kg a ratos Wistar saudáveis.....	134

Figura 28. Perfis médios de concentração livre hepática e muscular da quinina obtidos após administração oral de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por <i>Plasmodium berghei</i> com alta infecção.....	135
Figura 29. Perfil médio de concentração livre plasmática e tecidual hepática e muscular da quinina obtido após administração oral de 250 mg/kg a ratos Wistar sadios.....	137
Figura 30. Perfil médio de concentração livre plasmática e tecidual hepática e muscular da quinina obtido após administração oral de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por <i>Plasmodium berghei</i> com alta parasitemia.....	137
Figura 31. Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via i.v. na dose de 50 mg/kg a ratos Wistar sadios modelados pelo programa Scientist® segundo modelo de 2 compartimentos abertos.....	169
Figura 32. Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar sadios modelados pelo programa Scientist® para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.....	173
Figura 33. Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por <i>Plasmodium berghei</i> com baixa parasitemia modelados pelo programa Scientist® para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.....	177
Figura 34. Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por <i>Plasmodium berghei</i> com alta parasitemia modelados pelo programa Scientist® para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.....	181

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Suscetibilidade das diferentes espécies de ratos à infecção por <i>Plasmodium berghei</i>	23
Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos relatados na literatura para a quinina em humanos e animais de experimentação sadios e infectados.....	32
Tabela 3. Experimentos realizados para estabelecer as condições ideais para o processo infeccioso de ratos Wistar com <i>Plasmodium berghei</i>	51
Tabela 4. Resultados dos experimentos realizados para estabelecer as condições ideais para o processo infeccioso de ratos Wistar com <i>Plasmodium berghei</i>	77
Tabela 5. Efetividade do tratamento com quinina por via oral nas doses de 10, 25, 50 e 250 mg/kg administradas nos dias 7 a 9 pós-infecção, a q4h ou a qh8, em ratos Wistar de 5 semanas infectados pela via i.v.com inóculo de 10^8 hemáceas parasitadas por <i>Plasmodium berghei</i>	83
Tabela 6. Desvios padrão relativos intradia e interdia das três amostras de controle de qualidade utilizadas para a curva padrão da quinina em plasma de ratos.....	89
Tabela 7. Exatidão das amostras de controle de qualidade utilizadas para a curva padrão da quinina em plasma de ratos.....	90
Tabela 8. Parâmetros das curvas padrão utilizadas na validação de metodologia analítica para quantificação da quinina em plasma de rato por CLAE.....	91

Tabela 9. Análise de variância para a linearidade das curvas padrão de quinina em plasma de rato quantificada por CLAE.....	92
Tabela 10. Concentrações das três amostras de controle de qualidade obtidas na validação simplificada do método para amostras de quinina em solução de Ringer.	94
Tabela 11. Exatidão das amostras de controle de qualidade utilizadas para a curva padrão da quinina em solução de Ringer.....	95
Tabela 12. Parâmetros das curvas padrão utilizadas na validação da quantificação de quinina em solução de Ringer por CLAE.....	96
Tabela 13. Análise de variância para a linearidade das curvas padrão de quinina em solução de Ringer determinadas por CLAE.....	97
Tabela 14. Concentrações e variação percentual em relação ao dia zero das amostras de quinina em plasma de ratos analisadas em diferentes dias após estocagem em freezer a –20 °C.....	99
Tabela 15. Concentrações e variação percentual em relação ao dia zero das amostras de quinina em solução de Ringer analisadas em diferentes dias após estocagem em freezer a –20 °C.....	99
Tabela 16. Parâmetros da avaliação matemática das curvas de ligação da quinina às proteínas plasmáticas em ratos sadios e infectados por <i>Plasmodium berghei</i> com diferentes níveis de parasitemia.....	102
Tabela 17. Concentração sérica de albumina em ratos sadios e infectados por <i>Plasmodium berghei</i> com baixa e alta parasitemia.....	105

Tabela 18. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por análise não-compartimental dos perfis plasmáticos individuais de ratos Wistar que receberam quinina na dose 50 mg/kg pela via intravenosa.....	109
Tabela 19. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por análise não-compartimental após administração de 250 mg/kg de quinina a ratos saudáveis e infectados por <i>Plasmodium berghei</i>	111
Tabela 20. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos da análise compartimental dos dados individuais de concentração plasmática por tempo após administração i.v. de quinina na dose de 50 mg/kg a ratos Wistar saudáveis.....	119
Tabela 21. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos da análise compartimental individual dos dados de concentração plasmática por tempo utilizando modelo de 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas após administração oral de 250 mg/kg de quinina a ratos Wistar saudáveis e infectados por <i>Plasmodium berghei</i> com diferentes níveis de parasitemia.....	124
Tabela 22. Recuperação das sondas de MD <i>in vitro</i> , pela técnica de ganho, para as concentrações de quinina de 0,5 e 1 µg/mL com diferentes fluxos de perfusão.....	130
Tabela 23. Razão entre a recuperação das sondas de microdiálise <i>in vitro</i> pela técnica de ganho para as concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL de quinina nos diferentes fluxos de perfusão.....	131
Tabela 24. Recuperação das sondas de microdiálise <i>in vitro</i> pelas técnicas de ganho e perda para o fluxo de 1 µL/min e concentração de quinina de 1 µg/mL.....	132
Tabela 25. Parâmetros farmacocinéticos não-compartimentais obtidos dos perfis individuais de concentração livre tecidual de quinina após administração oral de 250	

mg/kg a ratos Wistar sadios e infectados por *Plasmodium berghei* com alta parasitemia.....136

Tabela 26. Relação entre os valores de ASC₀₋₇₂₀ livre para plasma, fígado e músculo de animais sadios e infectados por *Plasmodium berghei* com alta infecção.....138

ABREVIACOES

λ	Constante de velocidade de eliminação (análise não-compartmental)
τ	Intervalo entre doses
α	Constantes de velocidade da fase de distribuição
β	Constantes de velocidade da fase de eliminação
1-ABT	1-aminobenzotriazol
“a”	Intercepto da fase de distribuição
AAG	Glicoproteína α_1 -cida
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ASC	rea sob a curva
ASC_{0-∞}	rea sob a curva do tempo zero ao infinito
ASC_{0-t}	área sob a curva do tempo zero ao tempo “t”
ASC_{ext}	área sob a curva extrapolada
ASMC	rea sob a curva do primeiro momento
ASMC_{0-∞}	rea sob a curva do primeiro momento do tempo zero ao infinito
ASMC_{0-t}	área sob a curva do primeiro momento do tempo zero ao tempo “t”
ASMC_{ext}	área sob a curva do primeiro momento extrapolada
AST	Aspartato aminotransferase
“b”	Intercepto da fase de eliminação
CI	<i>Clearance</i> ou depuração
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
C_{máx}	Concentração plasmática máxima

Cp_x	Concentração plasmática no tempo “x”
D	Dose
D.P.	Desvio padrão
D.P.R.	Desvio padrão relativo
F	Biodisponibilidade
F	Fração da dose absorvida
Fa	Fração aderida a membrana do dispositivo de ultrafiltração
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
Fu	Fração livre do fármaco
HDL	Lipoproteína de alta densidade
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
k₁₀	Constante de velocidade de eliminação do compartimento central
k₁₂	Constante de velocidade de distribuição do compartimento central para o periférico
k₂₁	Constante de velocidade de distribuição do compartimento periférico para o central
Ka	Constante de velocidade de absorção
Ke	Constante de velocidade de eliminação (análise compartimental)
LQ	Limite de quantificação
MD	Microdiálise
MRT	Tempo de residência médio
MSC	Critério de seleção do modelo
MSP	Antígenos majoritários na superfície dos merozoítos
N	Tamanho da amostra
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
pH_{aparente}	pH determinado em meio não-aquoso
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária

PMNs	Leucócitos polimorfonucleares
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
Proteína Cs	Principal antígeno de superfície de esporozoítos de <i>Plasmodium</i>
Qxh	A cada “x” horas
QN	Quinina
R	Coeficiente de correlação de Pearson
RESA	Antígeno de superfície de eritrócitos infectados com trofozoítos jovens
Rpm	Rotações por minuto
RR_{gan}	Recuperação relativa por ganho das sondas de microdiálise
RR_{per}	Recuperação relativa por perda das sondas de microdiálise
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica de Malária
t_{1/2}	Tempo de meia-vida
t_{1/2} β	Tempo de meia-vida de eliminação (compartimental)
t_{máx}	Tempo para atingir a concentração plasmática máxima
TGI	Trato gastrintestinal
v.o.	Via oral
Vc	volume de distribuição do compartimento central
Vd	Volume de distribuição
Vd_{área}	volume de distribuição área
Vd_{ss}	Volume de distribuição no <i>steady state</i>

RESUMO

Objetivos: Desenvolver modelo de malária experimental em ratos Wistar e avaliar a influência da infecção no perfil farmacocinético e na distribuição tecidual da quinina (QN). **Metodologia:** No desenvolvimento da infecção experimental de ratos Wistar por *Plasmodium berghei* foram testados diferentes inóculos pela via i.v. e i.p em animais de diferentes idades. A adequabilidade do protocolo proposto foi avaliada utilizando cloroquina. Neste modelo, as doses efetivas da QN foram estabelecidas após administração oral, utilizando protocolo de tratamento padronizado. Os perfis farmacocinéticos da QN após administração i.v. de 50 mg/kg a ratos saudáveis e oral de 250 mg/kg a ratos saudáveis e infectados por *P. berghei*, com baixa e alta parasitemia, foram avaliados após quantificação da QN através de metodologia por cromatografia em líquido de alta eficiência validada. A distribuição hepática e muscular do fármaco em ratos saudáveis e com alta parasitemia foi avaliada por microdiálise. **Resultados e Discussão:** O protocolo para desenvolver malária experimental em ratos Wistar utilizando inoculação i.v. de 10^8 hemácias parasitadas por *P. berghei* em animais de 5 semanas mostrou-se adequado quando testado com cloroquina. As doses de QN de 50 e 250 mg/kg foram efetivas na cura da malária experimental. Após administração i.v. de QN a ratos saudáveis, obteve-se volume de distribuição (Vd) de $11,6 \pm 4,1 \text{ L.Kg}^{-1}$, clearance (Cl) de $5,8 \pm 2,2 \text{ L.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e meia-vida de $2,1 \pm 1,2 \text{ h}$. Após administração oral, uma tendência de redução do Cl e aumento do Vd, proporcional ao nível parasitário, foi observada. As frações livres teciduais da QN em ratos infectados foram inferiores às obtidas em ratos saudáveis, observando-se maiores concentrações musculares do que hepáticas. **Conclusões:** As alterações farmacocinéticas da QN causadas pelos diferentes níveis de parasitemia observadas na evolução da malária devem ser levadas em consideração quando da determinação do esquema posológico do fármaco, visando garantir o sucesso terapêutico e, principalmente, a segurança para o indivíduo infectado.

Palavras-chave: *Plasmodium berghei*, malária experimental em ratos Wistar, quinina, farmacocinética, distribuição tecidual, microdiálise.

ABSTRACT

Development of an Experimental Malaria Infection Model in Wistar Rats and Evaluation of the Infection Influence on Quinine Pharmacokinetic Profile and Tissue Distribution

Purpose: To develop an experimental malaria infection model in Wistar rats and to evaluate the infection influence on quinine (QN) pharmacokinetic profile and tissue distribution. **Methodology:** For the development of *Plasmodium berghei* experimental malaria in Wistar rats, diverse inoculum sizes, administration routes and animals age were tested. The suitability of the proposed protocol was evaluated using chloroquine. In this model, QN effective doses were established after oral administration, using a standard protocol of treatment. QN pharmacokinetic profiles after i.v. administration of 50 mg/kg to healthy rats and after oral administration of 250 mg/kg to healthy and *P. berghei* infected animals, with low and high parasitemia levels, were evaluated using a validated high performance liquid chromatography method to quantify the drug. Hepatic and muscular distribution of the drug, in healthy and infected rats, with high parasitemia, was evaluated by microdialysis. **Results and Discussion:** The experimental malaria protocol developed in Wistar rats using i.v. inoculation of 10^8 *P. berghei* parasitized erythrocytes in 5 weeks-old animals showed suitable when tested with chloroquine. The 50 and 250 mg/kg QN doses were effective to cure the experimental malaria. After QN i.v. administration to healthy rats, the volume of distribution (Vd) was 11.6 ± 4.1 L.kg⁻¹, the clearance (Cl) was 5.8 ± 2.2 L.kg⁻¹.h⁻¹ and the half-life was 2.1 ± 1.2 h. After oral administration, a trend of Cl reduction and Vd increase, proportional to parasitemia level, was observed. QN free tissue levels were higher in muscle than in hepatic tissue. Free drug fractions in infected tissues were lower than those observed in healthy rats. **Conclusion:** QN pharmacokinetic alterations observed due to the evolution of malaria infection must be taken into consideration when establishing the drug dosing regimen, aiming to guarantee its therapeutical success and mainly, the infected subject safety.

Keywords: *Plasmodium berghei*, malaria infection model in Wistar rats, quinine, pharmacokinetics, tissue distribution, microdialysis.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Apesar de muito antiga, a malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública mundial (BRAGA e FONTES, 2000). No Brasil, a doença cresceu de 300 a 400 % na última década (FUNASA, 2002). A malária é caracterizada por febres recidivantes e calafrios associados à lise das hemáceas parasitadas por protozoários do gênero *Plasmodium* (KROGSTAD, 1997). O mosquito fêmea do gênero *Anopheles* é o hospedeiro definitivo e vetor dos plasmódios, enquanto que o homem é o hospedeiro intermediário (BRAGA e FONTES, 2000).

O tratamento adequado e oportuno da malária ainda é o principal alicerce para o controle da doença (BRAGA e FONTES, 2000). No entanto, a profilaxia e a quimioterapia tornaram-se mais complexas e menos satisfatórias, principalmente em razão da crescente resistência aos fármacos antimaláricos (TRACY e WEBSTER, 1996). O tratamento da parasitose visa, principalmente, a interrupção da esquizogonia sangüínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção.

A quinina é o fármaco de escolha em casos graves da doença (WINSTANLEY, 2000) atuando primariamente como esquizonticida sangüíneo. Apresenta forte ligação com o fígado e talvez a ausência de atividade sobre as formas hepáticas do parasita seja reflexo da sua baixa concentração livre no órgão. Aliado ao baixo índice terapêutico, a quinina também provoca graves efeitos adversos diretamente relacionados à presença de concentrações elevadas no plasma.

Há relatos na literatura mostrando que a farmacocinética da quinina sofre influência de vários fatores, dentre os quais a infecção malárica parece ser o mais

relevante, em decorrência das alterações que provoca no processo de metabolização de fármacos (DAVIS *et al.*, 1988; BABALOLA *et al.*, 1998; ROGER *et al.*, 2002).

A determinação precisa dos parâmetros farmacocinéticos da quinina em indivíduos infectados e a avaliação da penetração tecidual do fármaco é de fundamental importância para garantir o uso racional deste medicamento, uma vez que poucas alternativas terapêuticas têm sido propostas (HASTINGS e D'ALESSANDRO, 2000).

A microdiálise é uma técnica de amostragem *in vivo* adequada para mensurar e monitorar as concentrações livres de fármacos e substâncias endógenas em fluidos biológicos (DE LA PENÃ, LIU e DERENDORF, 2000). Em estudos farmacocinéticos, a utilização desta técnica minimiza muitos dos problemas associados aos métodos convencionais de amostragem que medem as concentrações totais dos fármacos (BENVENISTE e HÜTTEMEIER, 1990).

A avaliação da influência da infecção malárica sobre os parâmetros farmacocinéticos da quinina pode ser realizada através da indução experimental da doença em animais. Em roedores, o *Plasmodium berghei* provoca o desenvolvimento de patologia semelhante à obtida pelo *Plasmodium falciparum* em humanos, sendo geralmente utilizado como modelo experimental de malária *in vivo* (CARTER e DIGGS, 1977).

Apesar da maior parasitemia e mortalidade obtidas quando se faz uso de camundongos como animais testes para o estudo da doença, em experimentos farmacocinéticos, que requerem grande volume sangüíneo, a utilização destes roedores torna-se inapropriada. Nesse caso, a utilização de ratos infectados por *Plasmodium berghei* é crucial para a realização dos estudos (DOW, REYNOLDSON e THOMPSON, 1999). Porém, os protocolos de infecção desses animais não estão bem esclarecidos na literatura, evidenciando a necessidade de seu desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver modelo de malária experimental em ratos Wistar e avaliar a influência da infecção no perfil farmacocinético e na distribuição tecidual da quinina.

2.2. Objetivos Específicos

- ◆ Desenvolver protocolo de infecção de ratos Wistar por *Plasmodium berghei* e testar a adequabilidade da metodologia proposta;
- ◆ Estabelecer a dose efetiva da quinina no modelo de infecção experimental desenvolvido;
- ◆ Adaptar e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação da quinina em amostras biológicas (plasma e dialisado);
- ◆ Determinar as concentrações plasmáticas totais de quinina após administração oral do fármaco a ratos Wistar saudáveis e infectados por *Plasmodium berghei* bem como a penetração em tecido muscular e hepático, através de microdiálise, e comparar os parâmetros farmacocinéticos obtidos nas duas situações.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Malária

3.1.1 Epidemiologia

Apesar de muito antiga, a malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública mundial (BRAGA e FONTES, 2000; OMS, 2005). É a doença responsável pela maior mortalidade associada a infecções parasitárias (CAMARGO, 2003). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005), estima-se que a malária cause anualmente mais de 300 milhões de casos agudos e que ocorram aproximadamente um milhão de mortes ao ano em decorrência da infecção. A doença mata duas vezes mais que a SIDA e muito mais que qualquer outra doença infecciosa. Está presente em mais de 90 países (Figura 1), sendo que os mais comprometidos são a Índia, o Brasil, o Afeganistão e os países africanos e asiáticos, incluindo a China (CAMARGO, 2003).

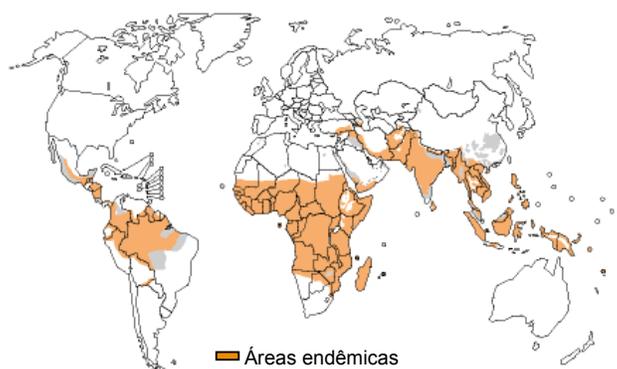


Figura 1. Distribuição da malária no mundo. Adaptado de OMS (2005).

No Brasil, a doença cresceu de 300 a 400 % na última década. Cerca de 450 mil casos são relatados todos os anos. Aproximadamente metade deles são causados pelo *Plasmodium vivax* e os outros 50 % pelo *Plasmodium falciparum*. A região Amazônica conta com mais de 95 % dos casos. Esta incidência aumentada deve-se, ao menos em parte, ao aumento da migração para o local (MARQUES e GUTIERRES, 1994; FUNASA, 2002).

3.1.2. Biologia do Parasita

Os parasitas causadores de malária pertencem ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. São conhecidas cerca de 150 espécies causadoras da malária em diferentes hospedeiros vertebrados. Destas, apenas quatro espécies parasitam o homem: *falciparum*, *vivax*, *malariae* e *ovale* (BRAGA e FONTES, 2000; OMS, 2005).

O mosquito fêmea do gênero *Anopheles* é o hospedeiro definitivo e vetor dos plasmódios, enquanto que o homem caracteriza-se como sendo o hospedeiro intermediário (OMS, 2005). O ciclo heteroxênico do *Plasmodium* (Figura 2) ocorre em duas fases: a fase sexual, também chamada de esporogonia, que ocorre no *Anopheles* e a fase assexual, denominada esquizogonia, que ocorre no homem.

O *Plasmodium falciparum* tem um ciclo eritrocitário de 48 horas no homem e produz a malária terçã maligna (febre recidiva de 3 em 3 dias). O *Plasmodium vivax* também possui um ciclo eritrocitário de 48 horas e produz a malária terçã benigna, assim denominada por ser de menor gravidade e raramente fatal. O *Plasmodium ovale* tem um ciclo eritrocitário de 48 horas e um estágio exoeritrocitário, causando uma forma rara de malária. O *Plasmodium malariae*, causador da malária quartã, possui ciclo eritrocitário de 72 horas e não possui ciclo exoeritrocitário (BRAGA e FONTES, 2000; RANG, DALE e RITTER, 2001).

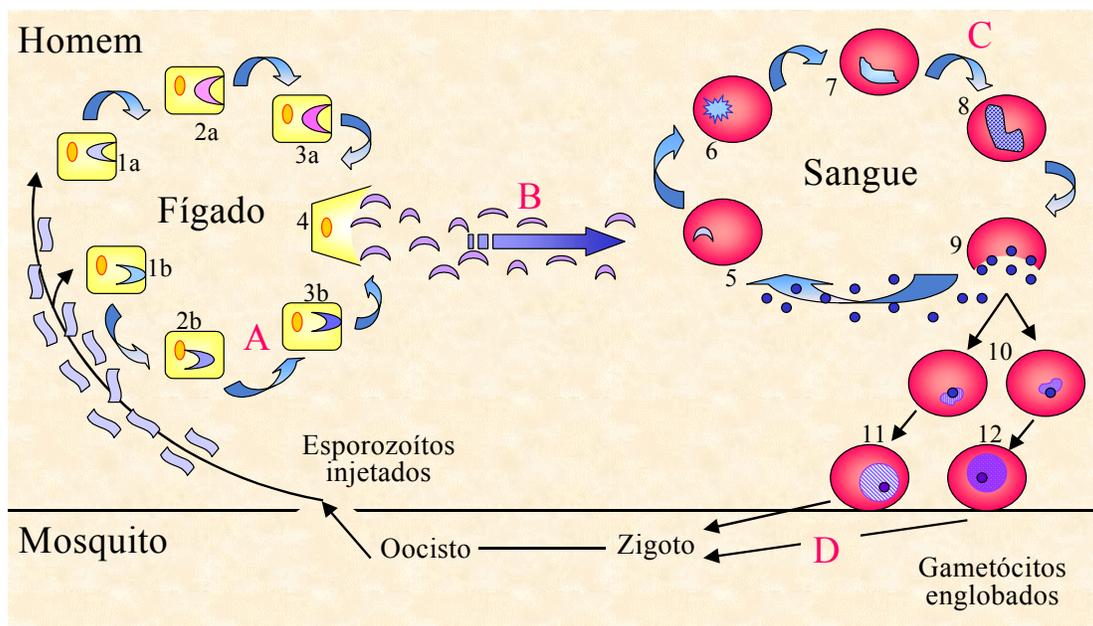


Figura 2. Ciclo vital do *Plasmodium* e local de ação dos fármacos antimaláricos. 1a) Entrada do esporozoítos no hepatócito; 2a) e 3a) Desenvolvimento do esquizonte; 4) Ruptura do hepatócito liberando merozoítos; 5) Entrada do merozoítos no eritrócito; 6) Trofozoítos na hemácia; 7 e 8) Desenvolvimento do esquizonte no eritrócito; 9) Ruptura do eritrócito liberando merozoítos; 10, 11 e 12) Penetração de merozoítos em outros eritrócitos e desenvolvimento dos gametócitos masculino e feminino; 1b) Hipnozoítos (forma em repouso hepática do parasita); 2b e 3b) Crescimento e multiplicação dos hipnozoítos. A: Fármacos que afetam os hipnozoítos exoeritrocitários (cura radical de *P. vivax* e *P. ovale*); B: Bloqueio da ligação entre os ciclos exoeritrocitário e eritrocitário (fármacos utilizados na quimioprevenção); C: Esquizontocidas sanguíneos (tratamento do ataque agudo); D Fármacos que impedem a transmissão. Esquema de autoria da Farmacêutica Gabriela Cristina da Rosa.

3.1.3. Patogenia da Malária

Os sintomas da doença aparecem cerca de 9 a 14 dias após a picada do mosquito vetor (OMS, 2005). Apenas o ciclo eritrocitário é responsável pelas manifestações clínicas e patológicas da malária, que inicialmente incluem mal-estar, cefaléia, cansaço e mialgia. Quando ocorre a ruptura das hemáceas, ao final da esquizogonia, ocorrem calafrios e sudorese, que precede a fase febril, onde o paciente pode chegar a uma temperatura corpórea de 41 °C ou mais (BRAGA e FONTES, 2000).

Os merozoítos, ao serem liberados na circulação sangüínea, ligam-se aos resíduos siálicos das moléculas de glicoforina localizadas na superfície das hemáceas através de uma molécula do parasita semelhante à lecitina. Dentro das hemáceas, multiplicam-se em vacúolos digestivos ligados à membrana, hidrolisando hemoglobina através de enzimas secretadas, que incluem polimerase heme, formando a hemozoína ou pigmento malárico que caracteriza a coloração escura do baço e fígado de indivíduos infectados (ROBINS, COTRAN e KUMAR, 1995). As hemáceas, apresentando alterações na sua superfície como protusões ou saliências, podem aderir-se ao endotélio capilar, provocando o fenômeno de citoaderência. Este fenômeno pode provocar dificuldade ou impedimento do fluxo sangüíneo, que se for extenso e em órgão importante, tal como cérebro, provocará congestão, edema, anóxia, necrose local, levando o paciente à morte (BRAGA E FONTES, 2000).

As alterações morfológicas e funcionais observadas no indivíduo com malária são conseqüências da destruição dos eritrócitos e conseqüente liberação dos parasitas e de seus metabólitos na circulação, da toxicidade resultante da liberação de citocinas, do seqüestro dos eritrócitos parasitados na rede capilar, no caso específico do *Plasmodium falciparum* e da lesão capilar por decomposição de imunocomplexos, no caso do *Plasmodium malariae* (BRAGA e FONTES, 2000).

Em linhas gerais as manifestações clínicas na malária incluem anemia, hemorragias, hipoglicemia, acidose metabólica, distúrbios hepáticos, renais e pulmonares e pode induzir até mesmo ao coma (ROBINS, COTRAN e KUMAR, 1995).

A gravidade e as manifestações características da doença são governadas pela espécie infestante, pela magnitude da parasitemia, pelos efeitos metabólicos do parasita e pelas citocinas liberadas em decorrência da infecção (KROGSTAD, 1997).

3.1.4. Tratamento da Malária

O tratamento da malária visa a interrupção da esquizogonia sangüínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção. Entretanto, pela diversidade do seu ciclo biológico, é também objetivo da terapêutica proporcionar a erradicação de formas latentes do parasita no ciclo tecidual (hipnozoítos), evitando assim as recaídas tardias. Além disso, a abordagem terapêutica de pacientes residentes em áreas endêmicas pode visar a interrupção da transmissão, pelo uso de fármacos que eliminem as formas sexuadas do parasita (OMS, 2005).

A profilaxia e a quimioterapia da malária tornaram-se mais complexas e menos satisfatórias, principalmente em razão da crescente resistência do *Plasmodium falciparum* aos fármacos antimaláricos. O ataque agudo da doença exige tratamento imediato com esquizonticida de ação rápida. A cloroquina é o fármaco de primeira escolha para malária *vivax*. Em caso de malária *falciparum*, recorre-se à quinina associada a doxiciclina e/ou clindamicina, a mefloquina e derivados de artemisinina. O uso imediato da quinina i.v. (dose de ataque 20 mg/kg), como esquizonticida de ação rápida nas formas graves de malária de cepas multirresistentes, pode salvar vidas (TRACY e WEBSTER, 1996; WINSTANLEY, 2000).

Logo após a sua introdução na terapêutica, as sulfonamidas demonstraram possuir atividade antimalárica. As sulfonas também demonstraram ser eficazes e a primeira experiência com a dapsona foi feita contra o *Plasmodium falciparum* em 1943. Deu-se pouca atenção aos dados então obtidos, devido à superioridade dos outros fármacos, mas o interesse atual de sua utilização tem origem na associação com a pirimetamina, contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum*. Quando se investigou a atividade antimalárica de antibióticos, as tetraciclina e o cloranfenicol foram experimentados clinicamente e, embora sua ação como esquizonticida seja lenta, sua atividade contra parasitas maláricos resistentes tem-se mostrado útil (TRACY e WEBSTER, 1996).

Devido ao aumento da resistência aos fármacos antimaláricos, é necessário que se desenvolvam novas estratégias de tratamento (BROWN, 1992).

O albendazol, um antiparasitário utilizado no tratamento de infecções por nematódeos e em giardíase, teve sua atividade *in vitro* demonstrada contra *Plasmodium falciparum* por Dieckmann-Schuppert e Franklin (1989). Baseando-se nesses estudos *in vitro*, a atividade *in vivo* do albendazol foi testada por Dow, Reynoldson e Thompson (1998) em ratos e camundongos infectados por *Plasmodium berghei*. O fármaco foi administrado oralmente em suspensão aquosa em dose de 100 e 200 mg/kg/dia. Sua eficácia foi avaliada através do monitoramento da parasitemia. O antiparasitário se mostrou eficiente na redução da parasitemia em ratos (97%), porém não em camundongos. Segundo os autores, esta atividade antimalárica *in vivo* levanta a possibilidade do uso do albendazol na clínica para tratamento da malária. No entanto, sabe-se que ratos são mais resistentes ao parasita, levando à cura espontânea, o que poderia explicar a eficácia do fármaco observada nesses animais. A ausência de grupo controle no estudo com ratos dificulta a avaliação da real eficácia do fármaco.

Certas espécies de plantas da família Simaroubaceae são utilizadas, principalmente em países africanos, no tratamento contra a malária (KIM *et al.*, 2000). No Brasil, algumas plantas desta família foram estudadas com promissores resultados. Entre elas, incluem-se plantas do gênero *Pothomorphe*. Essas plantas, abundantes na região Amazônica, são indicadas popularmente para a supressão dos sintomas clínicos da malária (CRUZ, 1985). Usando testes *in vivo*, Amorim e colaboradores (1988) demonstraram a eficácia do tratamento com administração oral e subcutânea de extratos etanólicos preparados com folhas de *Pothomorphe umbellata*.

Outra alternativa para aumentar o arsenal terapêutico contra a doença é a síntese de fármacos. Ram e colaboradores (2000) sintetizaram chalconas e bischalconas oxigenadas e avaliaram sua atividade antimalárica contra *Plasmodium berghei* cloroquina-sensível e cloroquina-resistente. Dos 12 compostos obtidos por

diferentes rotas sintéticas, 5 apresentaram atividade antimalárica significativa em parasitas sensíveis a cloroquina na dose de 100 mg/kg.

Outras estratégias de tratamento têm sido propostas na literatura (WILAIRATANA *et al.*, 2002), porém, devido ao baixo investimento das indústrias farmacêuticas na obtenção de medicamentos contra a malária, outras alternativas de controle da disseminação da doença têm tomado importância, dentre as quais destaca-se a adoção de medidas profiláticas e de medidas de controle.

3.1.5. Profilaxia da Malária

Como não se dispõe de fármaco profilático causal para a malária, a ação esquizotóxica sangüínea de alguns antimaláricos tem sido usada como forma de prevenir as suas manifestações clínicas. Entretanto, a progressiva extensão da resistência e o potencial de toxicidade dos antimaláricos disponíveis, fizeram com que a quimioprofilaxia da malária passasse a representar um tema polêmico nos últimos anos. No Brasil, a política adotada atualmente baseia-se apenas nas medidas de proteção individual. Como medida de curto prazo, a quimioprofilaxia pode ser recomendada apenas para viajantes internacionais e grupos especiais. O único fármaco que pode ser usado como profilático no Brasil é a mefloquina, que deve ser iniciada uma semana antes do deslocamento para o local de destino e interrompida após quatro semanas do regresso à área de origem (BRAGA e FONTES, 2000; OMS, 2005).

Com base no conhecimento da imunidade naturalmente adquirida, muito se tem feito no sentido de identificar antígenos do parasita que seriam responsáveis pela indução da imunidade protetora através de vacinas. A busca de vacinas eficazes tem sido realizada através de estudos com as muitas formas evolutivas do parasita, como esporozoítos (proteína CS, principal antígeno da superfície dos

esporozoítos), as formas hepáticas, as formas assexuadas eritrocíticas (MSP, antígenos majoritários na superfície dos merozoítos e RESA, o antígeno de superfície de eritrócitos infectados com trofozoítos jovens) e os gametócitos. Algumas dessas vacinas foram testadas em voluntários humanos com resultados promissores, porém, a dependência de altas doses de imunógeno as torna impraticáveis para a vacinação em massa. Além disso, não se sabe exatamente qual a extensão dos efeitos protetores observados (BRAGA e FONTES, 2000).

3.1.6. Medidas de Controle da Malária

As medidas de controle da malária objetivam evitar a mortalidade e reduzir a morbidade, assim como as perdas econômicas e sociais causadas pela doença. Incluem medidas de proteção individual (como a utilização de repelentes e mosquiteiros em áreas que contém o mosquito vetor da doença) e medidas de proteção coletiva (controle e combate do vetor, combate às larvas, medidas de saneamento básico e medidas para melhorar as condições de vida da população) (OPAS, 2000).

Considerando-se o número alarmante de casos de malária no mundo, percebe-se que controlar a transmissão da malária nos países em desenvolvimento continua sendo um grande desafio e um projeto a longo prazo. Sendo assim, objetivando implementar uma bem-sucedida estratégia de controle da malária, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2000) juntamente com a Organização Mundial da Saúde, criou um movimento social denominado “Iniciativa Fazer Retroceder a Malária”, durante a Conferência Ministerial de Amsterdã realizada em outubro de 1992. Integram este movimento os países cuja prevalência de malária é elevada. Esta estratégia visa prevenir a mortalidade e aliviar as perdas sociais e econômicas produzidas pela doença, através do fortalecimento dos níveis regionais e locais de atenção à saúde. Os objetivos devem ser alcançados através de diagnóstico precoce e tratamento imediato dos casos, uso de medidas seletivas

contra vetores, detecção oportuna de epidemias e avaliação regular da situação local da malária.

Desde 1993, o Brasil vem colocando em prática a estratégia global de controle integrado. Através da implementação desta estratégia, observou-se um decréscimo de 62 % no número total de mortes registradas no Brasil de 1994 a 1998 (OPAS, 2000). Baseando-se nos bons resultados obtidos na Região Amazônica do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), foi criado, em 2002, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) na perspectiva de manter a malária em níveis aceitáveis no País. O programa propõe-se a fornecer as diretrizes para os governos federal, estadual e municipal e em parceria com a sociedade organizada, desenvolver as atividades necessárias para o controle da doença (SVS/MS, 2003). Com esse objetivo, a Secretaria de Vigilância Sanitária implantou, no ano de 2003, o Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica de Malária (SIVEP-Malária), visando melhorar o fluxo, a qualidade e a oportunidade de informações entre os municípios e estados. Esse sistema permite a entrada e análise de dados por meio da internet, o que possibilita agilidade na análise das informações epidemiológicas para a adoção de medidas de controle adequadas e oportunas (SVS/MS, 2005).

3.2. Modelos de Infecção Experimental de Malária

Os modelos de infecção experimental em animais são descritos na literatura e têm sua importância reconhecida pelo papel fundamental que exercem nos estudos de eficácia e avaliação de fármacos. Muito do conhecimento sobre a malária provém da descoberta e do uso de modelos animais (LANDAU e CHABAUD, 1994). Entretanto, a falta de protocolos claros para a prática deste tipo de estudo é uma grande dificuldade.

As pesquisas envolvendo fármacos antimaláricos, novas estratégias de tratamento e elucidações das características da malária exigem o estabelecimento de modelos animais compatíveis com os objetivos dos experimentos a serem realizados e com a infra-estrutura laboratorial disponível. Segundo Fagundes e Taha (2004), faz-se necessário o conhecimento dos fenômenos envolvidos na infecção destes animais, bem como sua relação com a doença em humanos.

O *Plasmodium berghei* é uma das espécies de parasitas que infectam mamíferos, à exceção de humanos. Roedores infectados com este parasita são um modelo prático para o estudo de malária, pois essa espécie fornece analogias estruturais, fisiológicas e de ciclo de vida com as espécies que provocam a doença em humanos e outros primatas (CARTER e DIGGS, 1977).

Desde a descoberta do parasita *Plasmodium berghei*, o modelo de experimentação de roedores tem sido empregado como uma ferramenta útil para os estudos de fármacos antimaláricos (FERREIRA-DA-CRUZ *et al.*, 2000).

Seres humanos picados pelo mosquito infectado com esporozoítos em suas glândulas salivares representam o curso natural da malária, além das transfusões sangüíneas e infecções congênitas. No entanto, para a infecção experimental, esse método não é usado, porque seria impossível estimar o número de esporozoítos introduzidos no animal de experimentação, e dessa forma, padronizar os experimentos. Para a infecção experimental, esporozoítos das glândulas salivares do mosquito infectado são coletados e injetados nesses animais por diferentes vias. Outra forma de infecção é a inoculação de hemáceas retiradas de roedores parasitados (VANDERBERG, 1975 *apud* MATSOUKA *et al.*, 2002)¹.

O curso da infecção normalmente é monitorado pela análise do sangue infectado através de esfregaços de lâminas coradas com corante Giemsa (MONS *et*

¹ VANDERBERG, J.P. Development of infectivity by the *Plasmodium berghei* sporozoite. *Journal of Parasitology*, v. 61, p. 43-50, 1975 *apud* MATSOUKA, H. *et al.* A rodent malaria, *Plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, *Anopheles stephensi*. *Parasitology International*, v. 51, n. 1, p. 17-23, 2002.

al., 1985; MANSOR *et al.*, 1990). São observadas 3 fases durante o estágio sangüíneo da infecção (MONS *et al.*, 1985):

✓ Primeira fase: tanto em ratos como em camundongos, observa-se uma multiplicação média do parasita de 10 x por ciclo assexual (24 horas). Ao final desta fase, o animal atinge uma parasitemia de 1 % a 3 %;

✓ Segunda fase: após a primeira fase, a razão da multiplicação do parasita decresce brevemente como resultado da escassez de reticulócitos. Nesta fase, a percentagem de células infectadas aumenta significativamente. Os eritrócitos invadidos com mais de dois parasitas não permitem seu desenvolvimento normal, por isso ocorre um decréscimo na razão da multiplicação nesta fase;

✓ Terceira fase: depois da fase da queda da multiplicação do parasita, a parasitemia pode aumentar como resultado da invasão de outras células sangüíneas vermelhas ou como resultado da produção de reticulócitos pelo hospedeiro. Esta fase de infecção é menos previsível por uma série de fatores, dentre os quais destacam-se a porcentagem de reticulócitos, a presença do elevado número de eritrócitos invadidos, as complicações cerebrais e outras complicações patológicas e imunológicas.

O modelo induzido de doença, em que a condição a ser investigada é induzida experimentalmente, como na infecção malárica, é a única categoria de modelos animais que teoricamente permite a escolha livre de espécies (FAGUNDES e TAHA, 2004).

Normalmente, para a avaliação pré-clínica de fármacos antimaláricos, faz-se uso de camundongos como animais de experimentação, por serem mais suscetíveis a infecção por *Plasmodium* e por desenvolverem uma infecção fulminante com alta parasitemia e mortalidade (JANSE *et al.*, 1994). Porém, em experimentos farmacocinéticos que requerem grande volume sangüíneo ou quando são testadas

algumas classes de fármacos, o uso de camundongos como modelos animais torna-se impraticável ou inapropriado (DOW, REYNOLDSON e THOMPSON, 1998 e 1999).

Os estudos com *Plasmodium* em ratos podem ser realizados com diversas espécies. Sabe-se que as diferentes espécies apresentam susceptibilidade diferenciada à infecção (VREDEN *et al.*, 1995), bem como a idade desses animais pode interferir no curso da doença. Ratos idosos são relativamente refratários à infecção por *Plasmodium berghei* (CARTER e DIGGS, 1977), desenvolvendo baixa parasitemia (DOW, REYNOLDSON e THOMPSON, 1998).

Baseando-se nessas diferenças, Dow e colaboradores (1999) avaliaram o curso da infecção em ratos de diferentes linhagens e idades. Ratos de 4-5 semanas receberam intraperitonealmente 2×10^6 hemáceas parasitadas com *Plasmodium berghei* e os resultados da parasitemia foram comparados com ratos Wistar de 13 semanas, para se avaliar a influência da idade dos animais no curso da infecção provocada pelo parasita. A parasitemia foi determinada por esfregaço de sangue e análise das hemáceas coradas. A Tabela 1 mostra os resultados dos experimentos realizados.

Pode-se observar que, reduzindo-se a idade dos animais, a infecção foi mais fulminante. Este efeito pode ser indesejável porque o uso de animais jovens reduz o tempo dos experimentos em estudos farmacocinéticos (devido ao pequeno tamanho); e também porque as seqüelas neurológicas são mais comuns em animais jovens, o que pode prejudicar alguns experimentos (KAMIYAMA *et al.*, 1987).

Em experimentos envolvendo relação dose-efeito de fármacos, no entanto, faz-se necessária infecção fulminante com elevada parasitemia, uma vez que a avaliação do efeito dos fármacos é dada pela redução da mesma. Nesses experimentos, opta-se pela utilização de animais jovens, que são mais susceptíveis a infecção por *Plasmodium berghei*.

Tabela 1. Suscetibilidade das diferentes espécies de ratos à infecção por *Plasmodium berghei* *

Espécie ^a	Parasitemia (%) ^b	Mortalidade (%) ^c	Sinais neurológicos
Wistar 13 semanas (n=10)	1,3-5,2 (5-7)	0	Não
Wistar 5 semanas (n=10)	7-67 (8-14)	30 (7, 14, 15)	Não
Sprague-Dawley (n=5)	11-74 (7-14)	60 (12,13,14)	Não
WKY (n=5)	20-47 (12)	0	Não
WF (n=10)	Não calculada	70 (6,6,6,6,6,7,9)	Sim
PVG/c (n=5)	69-91 (14-20)	20 (19)	Não
F344 (n=4)	25-53 (14-20)	0	Não
LEW/SSN (n=5)	52-74 (14-16)	60 (15,16, 16)	Não
LOU/M (n=5)	Não calculada	80 (5,5,5,5)	Sim

* Tabela adaptada de Dow, Reynoldson e Thompson (1999).

^a Espécie do rato e, entre parênteses, o número de animais testados. Os animais sem referência tem 4-5 semanas de idade.

^b Maiores picos de parasitemia e, entre parênteses, o dia em que ocorreram.

^c Mortalidade e seus respectivos dias entre parênteses.

Baseando-se nos resultados demonstrados na Tabela 1, os autores concluíram que ratos LEW/SSN de 4-5 semanas infectados por *Plasmodium berghei* podem ser usados como modelos de infecção experimental *in vivo*, por desenvolverem elevada parasitemia em período de tempo adequado (14-16 dias) e não apresentarem sinais neurológicos. No entanto, nenhuma das espécies testadas apresentou mortalidade de 100 % após a indução do processo infeccioso.

Devido à variabilidade interespecies, para o sucesso dos experimentos que utilizam modelos de malária experimental, é fundamental a validação dos mesmos com fármacos antimaláricos convencionais, antes de sua utilização para avaliar a farmacodinâmica e farmacocinética de outros compostos. Nos estudos de Dow e colaboradores (1999), a avaliação da adequabilidade da infecção de ratos LEW/SSN de 4-5 semanas foi realizada através da administração oral de cloroquina em diferentes dosagens. Os animais se curaram quando receberam doses de 6 e 30 mg/kg/dia.

Com a linhagem Fischer F344, Pierrot e colaboradores (2003), demonstraram infecção fulminante em 16 ± 3 dias após a inoculação intraperitoneal de 10^7 eritrócitos parasitados em ratos de 4 semanas. Testando o mesmo tamanho de inóculo, foi observada diminuição da mortalidade em função da idade dos animais. Os animais de 6 semanas apresentaram 90 % de mortalidade e os de 8 e 12 semanas, 0 % de mortalidade (n = 5-7 animais/grupo).

Esses dois estudos (DOW, REYNOLDSON e THOMPSON, 1999; PIERROT *et al.*, 2003), evidenciam a influência da idade e também do tamanho do inóculo no curso da infecção malárica experimental.

Considerando a elevada utilização de ratos Wistar e a disponibilidade desta espécie no Brasil, aliada a falta de protocolos claros de indução experimental de malária, fica evidenciada a necessidade de desenvolvimento de metodologia de infecção malárica experimental nesta espécie de animal.

3.3. Quinina

3.3.1. Química

A quinina é o principal alcalóide da cinchona, a casca da árvore da quina. Sua descoberta data do final do século XVI e início do século XVII, durante a conquista do Império Inca pelos espanhóis na região do Peru. Teve seu primeiro registro escrito em um livro religioso em 1633 e publicado na Espanha em 1639. O primeiro reconhecimento oficial da cinchona foi feito em 1677, quando foi incluída numa edição da *London Pharmacopoeia* como “Cortex Peruanus” (TRACY e WEBSTER, 1996).

Em 1820, os químicos franceses Joseph Pelletire e Joseph Caventou isolaram a quinina da cinchona, identificando-a como um alcalóide e a partir de então, seu uso cresceu rapidamente. Embora tenha sido sintetizada por Woodward e Doering em 1945, o processo de síntese é complexo e sua obtenção ainda é totalmente de fontes naturais (TRACY e WEBSTER, 1996).

Quimicamente, a quinina (Figura 3) é denominada (8- α ,9R)-6'-metoxicinchon-9-ol, apresentando peso molar de 324,42 e fórmula molecular de $C_{20}H_{24}N_2O_2$ (SMITH, 2001). É formada por um grupo quinolina ligado através de um álcool secundário a um anel de quinuclidina. Possui uma cadeia lateral metóxi ligada ao anel quinolina e um grupo vinil ligado a quinuclidina. A quinina e a quinidina possuem a mesma estrutura, exceto pela configuração espacial do grupo álcool secundário (quinidina C8R; C9S e quinina C8S; C9R) (TRACY e WEBSTER, 1996; FOLEY e TILLEY, 1998).

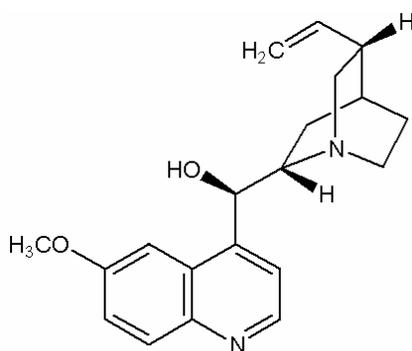


Figura 3. Fórmula estrutural da quinina (SMITH, 2001).

A quinina apresenta-se como um pó cristalino branco inodoro, possuindo um intenso sabor amargo (FULLERTON, 1998). É fotossensível e apresenta características fluorescentes. Um grama dissolve em 1900 mL de água, em 0,8 mL de álcool e em 1,2 mL de clorofórmio (SMITH, 2001). O cloridrato de quinina, sal da quinina utilizado para administração intravenosa, é solúvel em água e em álcool, já o sulfato de quinina, é fracamente solúvel em água (BRITISH PHARMACOPOEIA,

1999). A quinina assume dois valores de pka: 5,07 e 9,7 (SMITH, 2001) e, em condições fisiológicas, encontra-se monoprotionada (FOLLEY e TILLEY, 1998).

Na tentativa de descrever o efeito parasiticida da quinina e possibilitar a otimização da terapia, há necessidade de se conhecer melhor sua farmacocinética e descrever seu efeito farmacodinâmico em função das concentrações plasmáticas flutuantes. A avaliação da penetração tecidual dos fármacos antimaláricos, bem como a determinação precisa de parâmetros farmacocinéticos em indivíduos infectados é de fundamental importância para garantir o uso mais racional destes fármacos, uma vez que poucas alternativas terapêuticas têm sido propostas (HASTINGS e D'ALESSANDRO, 2000).

3.3.2. Propriedades Farmacodinâmicas da Quinina

A quinina atua primariamente como esquizonticida sangüíneo, exercendo pouco efeito sobre os esporozoítos ou as formas pré-eritrocitárias dos parasitas da malária (TRACY e WEBSTER, 1996; RANG, DALE e RITTER, 2001). O alcalóide é também gametocida para *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*, mas não para *Plasmodium falciparum* (TRACY e WEBSTER, 1996).

A quinina é lipofílica e associa-se especificamente com o polipeptídio apoA-1 e circula pelo sangue ligada às lipoproteínas de alta densidade (HDL), sendo transportada pelo soro através dessas lipoproteínas. Os eritrócitos utilizam-se das partículas de HDL circulantes para obtenção de lipídios; dessa forma, a ligação da quinina com apoA-1 pode facilitar sua entrada nos eritrócitos parasitados (FOLEY e TILLEY, 1997).

As lipoproteínas de alta densidade interagem com a banda 7.2b da proteína de membrana eritrocítica estomatina, que está envolvida no transporte de cátions.

Dessa forma, ocorre a transferência de fosfolípidios e de fármacos lipofílicos (como a quinina e mefloquina) para o eritrócito. Uma série de translocases e proteínas de transferência de lipídeos estão envolvidas na transferência dessas moléculas hidrofóbicas para o parasita da malária (Figura 4) (FOLEY e TILLEY, 1998).

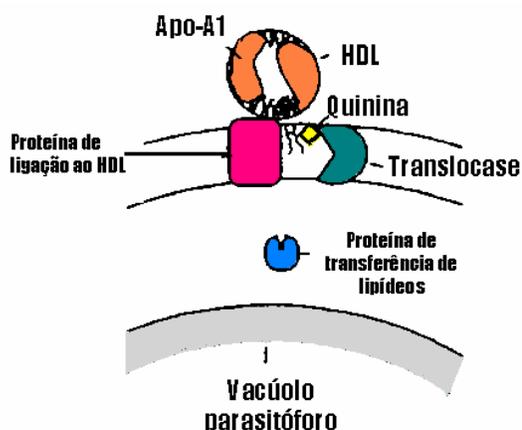


Figura 4. Mecanismo de entrada da quinina para os eritrócitos e transferência para o vacúolo parasitóforo. Adaptado de Foley e Tilley (1997).

Inicialmente, postulava-se que a quinina atuava por intercalação no DNA do parasita, inibindo a incorporação de nucleotídeos pela enzima polimerase. Dessa forma, ocorreria inibição na síntese protéica, acarretando na morte do parasita (DYKE *et al.*, 1969; LANTZ e DYKE, 1971).

Porém, o mecanismo de ação da quinina ainda não é bem elucidado. Muitas hipóteses consideram que a destruição do parasita seja em decorrência de sua localização no vacúolo digestivo, de sua interação com a polimerização ou detoxificação do heme e de sua associação com a hemozoína (BACHHAWAT *et al.*, 2000).

O parasita intra-eritrocitário ingere o citosol da hemácia que contém hemoglobina. A degradação da hemoglobina por proteases no vacúolo do parasita

fornece os aminoácidos para sua síntese protéica, bem como gera sub-produtos tóxicos do heme como a ferriprotoporfirina IX que é convertida em β -hematina. O parasita protege-se contra a toxicidade da hematina através de sua polimerização em um composto insolúvel denominado hemozoína (BACHHAWAT *et al.*, 2000; FITCH, 2004). A hemozoína é um íon férrico contendo porfirina (heme) conjugado com proteínas oriundas da degradação parcial da globina (BRAGA e FONTES, 2000).

A ação dos fármacos antimaláricos como a quinina seria baseada na sua capacidade de ligação com monômeros da hematina, impedindo sua polimerização para formação da hemozoína. O aumento da concentração desses resíduos tóxicos no vacúolo ocasionaria ruptura da membrana e conseqüente morte do parasita (BACHHAWAT *et al.*, 2000; HYDE, 2002; PORTELA *et al.*, 2003; FITCH, 2004).

Esta hipótese do mecanismo de ação da quinina foi proposta em 1980 por Chou e colaboradores e é a hipótese atualmente aceita. Segundo os pesquisadores, a hematina satisfaz todos requisitos como provável receptora de fármacos antimaláricos como a cloroquina e a quinina. O resíduo tóxico formaria complexos com os nitrogênios básicos desses fármacos (BACHHAWAT *et al.*, 2000).

3.3.3. Propriedades Farmacocinéticas da Quinina

Os parâmetros farmacocinéticos da quinina para humanos e para animais de experimentação relatados na literatura são conflitantes. Sua farmacocinética sofre influência de vários fatores, dentre os quais a infecção malárica parece ser a mais relevante em decorrência das alterações que provoca no processo de metabolização do fármaco.

Em voluntários sadios, a quinina é rapidamente absorvida por via oral ou intramuscular, tendo biodisponibilidade de cerca de 80 %. Possui meia-vida média de cerca de 11 horas e ligação às proteínas plasmáticas de 80 a 90 %. Seu volume de distribuição aparente é de cerca de 2 L/kg, sendo extensamente metabolizada no fígado (TRACY e WEBSTER, 1996). A quinina é eliminada quase exclusivamente por metabolismo hepático, apresentando baixa extração com capacidade limitada e ligação a proteína sensível. É metabolizada por oxidação no citocromo P450 3A4 em quatro metabólitos primários e cerca de 11 secundários (ROY *et al.*, 2002). Apenas 10 % é excretado de forma inalterada na urina (TAVARES, 1996; TRACY e WEBSTER, 1996). 14 % da dose é excretada na urina na forma do seu principal metabólito, a 3-hidroxiquinina (MIRGHANI, ÖRJAN e GUSTAFSSON, 1998).

Em humanos, seu perfil farmacocinético segue o modelo de 2 compartimentos sendo sua farmacocinética linear (BABALOLA *et al.*, 1997), com uma fase de distribuição rápida que gera picos de concentração plasmáticas em 1 a 3 horas após sua administração oral. As concentrações terapêuticas situam-se na faixa de 8-15 µg/mL. Após sua absorção, atinge elevada concentração em todos os líquidos e tecidos orgânicos, inclusive no interior das hemácias, onde alcança cerca de 1/3 a 1/2 da concentração plasmática (TAVARES, 1996; TRACY e WEBSTER, 1996).

A quinina não se acumula no organismo com a administração continuada. A velocidade de excreção renal dobra com a acidificação da urina em relação à urina alcalina. Atravessa a placenta, sendo encontrada em concentrações relativamente altas no cordão umbilical. É também excretada no leite materno, atingindo concentrações de aproximadamente 1/3 da concentração presente no plasma materno (TAVARES, 1996).

Informações a respeito da farmacocinética deste fármaco a partir de voluntários sadios podem levar a conclusões errôneas, pois as concentrações plasmáticas são mais elevadas em presença da infecção malárica aguda (DAVIS *et al.*, 1988; BABALOLA *et al.*, 1998; ROGER *et al.*, 2002) como pode ser observado na Figura 5.

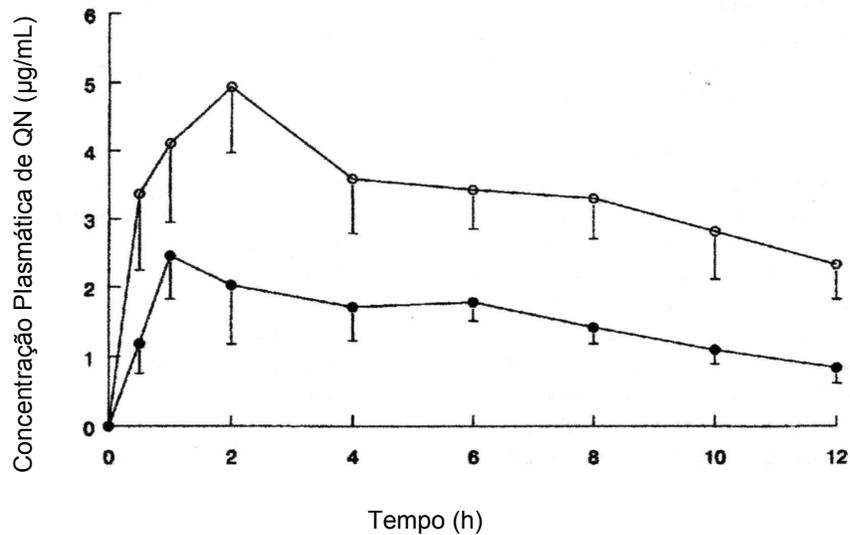


Figura 5. Perfil plasmático médio obtido após administração oral de dicloridrato de quinina (10 mg/kg) a pacientes em fase aguda de malária (°) e após recuperação (●). Adaptado de Babalola e colaboradores (1998).

As alterações significativas na farmacocinética da quinina são observadas em função da patologia. O volume de distribuição e o *clearance* diminuem, havendo relatos de que o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e a área sob a curva (ASC) aumentam conforme a gravidade da doença (WHITE *et al.*, 1982; DAVIS *et al.*, 1988; TRACY e WEBSTER, 1996; BABALOLA *et al.*, 1998). Um dos fatores aparentemente responsáveis por tais alterações é que o fígado, principal sítio de metabolização da quinina, é também um dos alvos da infecção pelo *Plasmodium*. O acúmulo de hemozoína neste órgão parece estar relacionado, principalmente, com a cronicidade da doença e não com a parasitemia. Além disso, a deposição de produtos de degradação do heme no tecido hepático parece conduzir à diminuição do acúmulo de quinina no órgão, levando à redução no *clearance* (Cl). Propõe-se que alterações patológicas decorrentes da malária, como o aumento de globulinas às quais o fármaco se liga, sejam responsáveis pela diminuição no volume de distribuição (MANSOR, WARD e EDWARDS, 1991).

A farmacocinética da quinina também pode variar em função da idade. Wanwimolruk e colaboradores (1991) avaliaram o efeito da idade de voluntários sadios jovens ($n = 12$) e idosos ($n = 8$) nos parâmetros farmacocinéticos do fármaco após administração de dose única de 600 mg por via oral. Não houve diferença na concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e no tempo para atingir esta concentração ($t_{máx}$). No entanto, observaram redução significativa no *clearance* dos voluntários idosos ($0,062 \text{ L.h.kg}^{-1}$) em relação aos voluntários jovens ($0,084 \text{ L.h.kg}^{-1}$). Essa redução no *clearance* resultou em significativo aumento no $t_{1/2}$ no grupo de voluntários idosos (de $10,5 \pm 1,6 \text{ h}$ para $18,4 \pm 5,7 \text{ h}$), demonstrando uma debilidade no processo de eliminação desse grupo de indivíduos. A excreção urinária da quinina na forma inalterada foi significativamente menor nos indivíduos jovens em relação aos idosos (de $11,2 \pm 2,5 \%$ para $16,6 \pm 3,7 \%$).

Davis e colaboradores (1988), investigando o potencial de toxicidade da administração rápida de quinina via i.v., observaram diminuição significativa no volume de distribuição (V_d) de pacientes com malária cerebral ($n = 7$). Baseados nesses resultados, sugeriram que a administração da dose terapêutica padrão para a via intravenosa resultaria em concentrações tóxicas em indivíduos com malária severa.

Em ratos, são relatados $t_{1/2}$ que variam de 0,8 a 15,9 h e *clearance* de 0,062 a $10,98 \text{ L.h.kg}^{-1}$ (WATARI, WAKAMATSU E KANENIWA, 1989; MANSOR, WARD e EDWARDS, 1991; WANWIMOLRUK *et al.*, 1993). Também existem relatos de parâmetros farmacocinéticos da quinina em camundongos e coelhos (HASAN, HASSAN e RAWASHDEH, 1990; PUSSARD *et al.*, 2003). Segundo Watari e colaboradores (1989), o perfil farmacocinético da quinina em ratos após administração pela via intravenosa também segue o modelo de dois compartimentos com farmacocinética linear nas doses de 5 a 20 mg/kg.

A Tabela 2 sumariza os parâmetros farmacocinéticos encontrados na literatura para a quinina tanto em humanos como em animais de experimentação sadios e infectados.

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos relatados na literatura para a quinina em humanos e animais de experimentação sadios e infectados.

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

C_{máx} = Concentração máxima; t_{máx} = tempo para atingir C_{máx}; t_{1/2} = tempo de meia-vida; Cl = clearance; Vd = Volume de distribuição; Vd_{ss} = Volume de distribuição no *steady-state*; f = biodisponibilidade. (* Valores normalizados)

3.3.4. Resistência à Quinina

O primeiro relato de resistência à quinina ocorreu em 1910, 278 anos após sua introdução como fármaco antimalárico. Embora existam relatos do aparecimento de resistência no Brasil há 100 anos atrás, observações clínicas surgiram somente em meados dos anos 60. Atualmente, a resistência clínica da monoterapia com quinina ocorre esporadicamente no sudeste da Ásia e oeste da Oceania. Dados de experimentos *in vitro* indicam que a resistência é menos freqüente na América do Sul e na África. O uso difundido da quinina na Tailândia no início dos anos 80, devido ao aparecimento de resistência à sulfadoxima-pirimetamina, resultou na diminuição da sensibilidade desse fármaco, fazendo com que seu uso neste país fosse reservado a casos de malária severa (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

A resistência do protozoário *Plasmodium falciparum* a quinina parece estar associada a uma mutação ocorrida no gene *pfindr1*, localizado no cromossomo 5 e codificador da proteína homóloga da glicoproteína P. Nesse gene ocorre substituição do ácido aspártico do códon 86 por uma tirosina. Outras mutações também estão associadas ao gene *pfindr1* e podem ser relacionadas à resistência contra a quinina. Através de modificações estruturais, a proteína mutante não permite a entrada da quinina no vacúolo digestivo, diminuindo, dessa forma, a sensibilidade do parasita ao fármaco (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

3.3.5. Terapêutica da Quinina

A quinina foi relegada a fármaco de segunda escolha quando a cloroquina foi introduzida, mas, com o surgimento e disseminação da resistência à cloroquina, a quinina novamente adquiriu importância terapêutica (RANG, DALE e RITTER, 2001).

É o fármaco de escolha para o tratamento da crise clínica aguda por *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina, administrada por via oral em associação com outros fármacos ou isoladamente como o diidrocloridrato ou gluconato, se for necessária a administração parenteral. Não é usada para quimioprofilaxia (RANG, DALE e RITTER, 2001; FOLEY e TILLEY, 1997).

O sal de quinina mais comumente utilizado é o sulfato, disponível em comprimidos como Plasquinin[®] (Cristália), Quinina[®] (Eurofarma), IVB-Quinina[®] (Inst. Vital Brasil) e Sulfato de Quinina[®] (Laboratório Químico Farmacêutico do Exército) (ANVISA, 2005). Quando administrado isoladamente, a dose oral habitual de sulfato de quinina para adultos é de 650 mg, três vezes ao dia, durante 7 a 10 dias. Este esquema pode ser reduzido para 3 a 7 dias quando a quinina é administrada juntamente com outros antimaláricos (TRACY e WEBSTER, 1996). A administração retal também é uma forma de facilitar a aceitabilidade do fármaco, especialmente entre crianças (PAROLA e MILLER, 2002).

Sua administração deve ser, preferencialmente, por via oral. A infusão intravenosa é reservada para situações críticas, como a malária grave ou cerebral. Um esquema posológico adequado para adultos consiste numa dose de ataque de 20 mg/kg em 300 a 500 mL de solução salina infundidos nas primeiras 4 horas, seguidos de 10 mg/kg na forma de infusão de 4 horas de duração, a cada 8 horas (WHITE *et al.*, 1982).

3.4. Microdiálise

A microdiálise (MD) é uma técnica de amostragem *in vivo* adequada para mensurar e monitorar as concentrações livres de fármacos e substâncias endógenas em fluidos biológicos (DE LA PENÃ, LIU e DERENDORF, 2000).

A técnica consiste em mimetizar a função de um capilar sanguíneo, perfundindo-se uma sonda de diálise implantada no tecido com um líquido fisiológico. Um gradiente de concentração é criado causando difusão da substância de interesse do espaço intersticial para dentro da membrana da sonda de MD (BENVENISTE e HÜTTEMEIER, 1990). O dialisado é analisado quimicamente e reflete a composição do fluido extracelular no tempo (DE LA PENÃ, LIU e DERENDORF, 2000).

Em estudos farmacocinéticos, a utilização desta técnica minimiza muitos dos problemas associados com métodos convencionais de amostragem, que medem as concentrações totais do fármaco. Com a MD, determina-se a concentração da fração livre do fármaco, que é a responsável pela ação terapêutica; isso porque é considerada uma técnica “limpa” de amostragem *in vivo*, permitindo a coleta do fluido extracelular com a exclusão de macromoléculas (WEISS e LUNTE, 2000).

Além da pureza das amostras e pequena lesão tecidual que causa, a MD possibilita o monitoramento simultâneo, no mesmo animal, de mais de um tecido ou órgão, além de possibilitar a avaliação concomitante de mais de uma substância no mesmo local ou em diferentes locais do organismo do mesmo animal (JOHANSEN, NEWMAN e MADDEN, 1997).

Não existem limitações quanto ao número de amostras a serem retiradas, uma vez que, pela aplicação da técnica, não há perda do fluido corpóreo (DE LA PENÃ, LIU e DERENDORF, 2000), diferentemente das técnicas convencionais que envolvem a coleta dos fluidos, limitando o número de amostra, especialmente em pequenos animais (WEISS e LUNTE, 2000).

Uma das dificuldades encontradas na técnica é a determinação da capacidade de recuperação da membrana, uma vez que esta é influenciada por muitos fatores, dentre os quais cita-se o fluxo de perfusão, a área superficial da membrana, a temperatura e as propriedades do líquido de perfusão e do fármaco sob investigação (BENVENISTE e HÜTTEMEIER, 1990).

O fluxo de perfusão deve ser estabelecido preliminarmente. Fluxos muito altos podem romper os tecidos, enquanto fluxos muito lentos podem remover grandes quantidades do soluto de interesse no local analisado, provocando mudanças extremas nos processos fisiológicos locais. Geralmente se trabalha com uma faixa de fluxo que varia de 1 a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Também devem ser considerados o pH e isotonicidade do líquido de perfusão, que devem mimetizar os líquidos intersticiais (DAVIES, 1999).

3.4.1. Calibração das Sondas de Microdiálise

A MD trabalha em condição *sink*, não permitindo o equilíbrio entre os meios externo e interno. Obtém-se a condição *sink* pela renovação constante do líquido perfundido através da membrana. Desta forma, a concentração do fármaco dialisado representa uma fração da concentração livre no espaço extracelular. Conseqüentemente, o conhecimento da recuperação relativa das sondas de MD é um pré-requisito para o cálculo das concentrações extracelulares do fármaco no tecido (DE LA PENÃ, LIU e DERENDORF, 2000).

A recuperação relativa é definida como a fração da concentração do composto de interesse no dialisado e pode ser determinada *in vitro* ou *in vivo* (BENVENISTE e HÜTTEMEIER, 1990).

3.4.1.1. Recuperação *in vitro*

A recuperação das sondas de microdiálise *in vitro* normalmente é determinada através da técnica de recuperação por ganho ou por perda. Na primeira técnica, a sonda é inserida em um recipiente contendo uma solução de concentração conhecida da substância a ser quantificada, sob temperatura e agitação controlada. O líquido de perfusão é então irrigado continuamente na sonda. O dialisado é quantificado, determinado-se a taxa de ganho do fármaco pela sonda através da Equação 1:

$$RR_{\text{gan}} = \frac{C_{\text{dial}}}{C_{\text{in}}} \quad (1)$$

onde RR_{gan} é a recuperação relativa por ganho da sonda; C_{dial} é a concentração da substância no dialisado, e C_{in} é a concentração da substância no recipiente (WEISS e LUNTE, 2000).

Na recuperação por perda, a sonda é inserida em recipiente contendo solução sem o fármaco e ocorre perfusão de um líquido com concentração conhecida do mesmo. A taxa de recuperação por perda é calculada pela Equação 2:

$$RR_{\text{per}} = \frac{C_{\text{in}} - C_{\text{dial}}}{C_{\text{in}}} \quad (2)$$

onde RR_{per} é a recuperação relativa por perda da sonda; C_{dial} é a concentração da substância após a passagem pelo meio e C_{in} é a concentração da substância no líquido de perfusão (WEISS e LUNTE, 2000).

3.4.1.2. Recuperação *in vivo*

Devido a diferença da matriz onde se encontra o fármaco, Benveniste e colaboradores (1989) demonstraram que a recuperação relativa *in vitro* não é uma estimativa confiável da recuperação *in vivo*. Nos órgão ou tecidos, a tortuosidade, o transporte microvascular e a eliminação ativa do fármaco através do metabolismo podem alterar o transporte do fármaco do meio intersticial para a sonda de MD. Devido a essa complexidade da matriz biológica, a recuperação *in vivo* é geralmente menor, ou, no máximo, igual àquela observada *in vitro*.

Esta diferença torna-se ainda maior quando o tecido ou órgão avaliado possui qualquer tipo de patologia, que pode alterar de modo substancial as características teciduais e o aporte de substâncias para a biofase sob investigação (DINIZ, 2000).

Devido a diferença na recuperação das membranas *in vitro* e *in vivo*, há necessidade de se avaliar a capacidade de recuperação das mesmas sob condições similares àquelas onde serão utilizadas, em cada desenho experimental (BENVENISTE e HÜTTEMEIER, 1990).

A recuperação das sondas *in vivo* de compostos exógenos usualmente é feita através da técnica de retrodiálise ou do método do fluxo líquido zero (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997).

Na técnica de retrodiálise, o líquido de perfusão contém uma concentração conhecida do fármaco ou de um análogo (calibrador) e essa concentração é nula no líquido intersticial. Nesse método, assume-se que a taxa de perda do fármaco é igual a taxa de ganho (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997). Ou seja, admite-se que a difusão é bidirecional e linear (STENKEN, 1999). A determinação da recuperação é feita pela Equação 2.

No método referido como método do fluxo líquido zero (*no net flux*) desenvolvido por Lönnroth e colaboradores (1987), a recuperação das sondas *in vivo* é estimada através da perfusão do soluto de interesse em diversas concentrações, mantendo-se a concentração extracelular *in vivo* constante. Esta situação é obtida pela administração do fármaco sob a forma de infusão contínua, que garanta concentrações constantes (*steady state*) no plasma e nos tecidos. Após obtido o *steady state*, perfunde-se a sonda de MD com soluções contendo diferentes concentrações do fármaco de interesse. No momento em que não ocorrer transporte de líquido (fluxo líquido zero), a concentração do perfundido será igual a do dialisado refletindo a concentração livre intersticial do fármaco. A estimativa do fluxo líquido zero por regressão linear gera uma reta (concentração recuperada menos concentração no líquido de perfusão \times concentração no líquido de perfusão), cuja inclinação representa a recuperação relativa da membrana.

O valor real das concentrações teciduais livres é obtido pela correção dos dados obtidos utilizando-se a técnica de microdiálise com a taxa de recuperação de cada membrana usada nos experimentos.

3.4.2. Microdiálise em Tecido Hepático e Muscular

Embora a técnica de microdiálise tenha sido inicialmente utilizada na neurociência para quantificação de neurotransmissores diretamente no sistema nervoso central, rapidamente teve sua utilização ampliada a estudos farmacocinéticos, monitorando concentrações de fármacos em outros órgãos e tecidos, dentre os quais cita-se os tecidos muscular e adiposo, o fígado, os pulmões, os rins, o trato gastrointestinal, a glândula adrenal e o sangue (BENVENISTE e HÜTTEMEIER, 1990).

Kurata e colaboradores (1993) usaram a técnica de microdiálise para quantificar antipirina em fígado e sangue de ratos. Foram implantadas sondas no tecido hepático e na veia jugular direita. Após administração de 50 mg/kg de antipirina pela via intraperitoneal, a concentração do fármaco no dialisado hepático e sangüíneo foi comparada com a concentração observada no sangue coletado pela veia jugular esquerda. Os autores não observaram diferença significativa no tempo de eliminação do fármaco no sangue coletado, dialisado hepático e dialisado sangüíneo concluindo que a técnica de microdiálise é adequada para quantificação dos níveis de antipirina no fluido extracelular hepático.

A utilização da microdiálise para monitorar concentrações hepáticas de fármacos poderia ser considerada inadequada, uma vez que a presença da sonda no fígado poderia alterar o metabolismo e, conseqüentemente, a farmacocinética do fármaco em estudo (DE LA PENÃ, LIU e DERENDOR, 2000).

Davies e colaboradores (1995) estudaram o dano tecidual causado pela inserção da sonda de microdiálise no fígado através de exames histológicos. Avaliaram os tipos de sonda, bem como as técnicas de implantação. Com a utilização de uma sonda linear de sílica fundida, observaram os menores danos teciduais por um período de 48 horas. Infiltração de células inflamatórias, predominantemente leucócitos polimorfonucleares (PMNs) foi evidenciada próximo ao local de inserção em aproximadamente 8 horas. Após 18 horas, além de PMNs, observaram a presença de muitos macrófagos. Em 48 horas, ainda havia presença de infiltrado inflamatório. Após 12 horas do início do experimento, evidenciaram o aparecimento de células necróticas no local da implantação.

Mediante as alterações causadas pela inserção das sondas, poderiam ocorrer alterações no metabolismo dos fármacos. Stenken e colaboradores (1997) avaliaram a possibilidade de mudanças na recuperação pela implantação das sondas de microdiálise em fígado de ratos através da avaliação da inibição dos processos metabólicos. Fenacetina e antipirina foram utilizadas como substâncias a serem quantificadas. A inibição do metabolismo desses fármacos foi avaliada

através da administração i.v. *bolus* de um substrato suicida do citocromo P450 (1-aminobenzotriazol - 1-ABT). O 1-ABT inibiu o metabolismo de 90 % da fenacetina. Não houve diferença estatística na recuperação da fenacetina através da microdiálise no fígado dos animais controle e dos animais com inibição induzida do metabolismo, demonstrando que a microdiálise hepática não altera a farmacocinética da substância sob investigação.

A MD em tecido muscular é utilizada para determinação de substâncias endógenas como glicerol e lactato (YANG *et al.*, 1995 *apud* DE LA PENÃ, LIU e DERENDORF, 2000)² e substâncias exógenas como antibióticos (DALLA COSTA *et al.*, 1998; DINIZ, 2000; JOUKHADAR *et al.*, 2001; TEGEDER *et al.*, 2002; BELLMANN *et al.*, 2004) e outros fármacos como L-dopa, 3-O-metildopa (DELEU *et al.*, 1991) e diclofenaco (MÜLLER *et al.*, 1997).

Os estudos em musculatura esquelética são realizados tanto em tecido sadio como em tecido comprometido por um processo inflamatório gerado de uma infecção. A inflamação pode acarretar no aumento do fluxo sanguíneo tecidual com o aumento da permeabilidade dos vasos, em alterações no pH local e no conteúdo do fluido intersticial (WARREN, 1997). Além disso, indivíduos com comprometimento tecidual decorrente do processo infeccioso apresentam modificações no metabolismo protéico e balanço líquido (LIPMAN *et al.*, 2001). Todas essas alterações fisiopatológicas podem interferir na distribuição tecidual de fármacos.

No choque séptico, situação em que ocorre alteração na permeabilidade capilar, observa-se um extravasamento das proteínas plasmáticas para o espaço extravascular no tecido, ocasionando alterações hemodinâmicas teciduais. Joukhadar e colaboradores (2001) investigaram, através da técnica de MD, as concentrações teciduais de piperacilina em músculo de indivíduos septicêmicos

² YANG, W. P. *et al.* Effects of daily voluntary running on *in vivo* insulin action in rat skeletal muscle and adipose tissue as determined by the microdialysis technique. *Int. J. Sports Med*, v. 16, n. 2, p. 99-104, 1995 *apud* DE LA PENÃ, A.; LIU, P.; DERENDORF, H. Microdialysis in Peripheral Tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 45, p. 189-216, 2000.

obtidas após administração pela via i.v. de 4 g do β -lactâmico. Observaram uma redução nas concentrações teciduais em relação a fração livre plasmática nos indivíduos com sepse em relação aos sadios (n = 6/grupo), demonstrando redução da fração farmacologicamente ativa da piperacilina nesses indivíduos. Essas modificações poderiam influenciar a resposta clínica do tratamento com o antimicrobiano.

Concentrações subinibitórias também foram relatadas em musculatura esquelética de pacientes com infecções graves (n = 6) em relação a indivíduos sadios após administração do antimicrobiano imipenem pela via intravenosa (TEGEDER *et al.*, 2002).

O estudo da penetração de levofloxacino 500 mg i.v. em tecido adiposo sadio e em tecido muscular inflamado foi realizado por Bellmann e colaboradores (2004). Utilizando a técnica de MD, os pesquisadores não observando diferença na penetração tecidual no tecido inflamado comparado com o tecido adiposo utilizado como referência. Estes resultados podem ser atribuídos ao pequeno número de indivíduos (n = 6) e a alta variabilidade interindividual, que resultou em coeficientes de variação de cerca de 80 % para $ASC_{\text{tecido}}/ASC_{\text{plasma}}$.

A utilização da técnica de MD para a quinina limita-se ao estudo de suas interações com os níveis de neurotransmissores (MIRANDA *et al.*, 2000; TREESUKOSOL *et al.*, 2003), não sendo relatada na literatura sua utilização em tecidos periféricos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

- ◆ Cloridrato de quinina (Sigma[®], St Louis, USA);
- ◆ Difosfato de cloroquina (Galena, São Paulo, BR)
- ◆ Corante Giemsa (Merck[®], Schuchardt, Alemanha);
- ◆ Cloreto de sódio p.a. (Merck[®], Schuchardt, Alemanha);
- ◆ Solução de Ringer (BENVENISTE e HÜTTEMEIER, 1990):
 - Cloreto de sódio (Merck[®]).....8,702 g
 - Cloreto de cálcio (Reagen[®]).....225 mg
 - Cloreto de potássio (Reagen[®]).....298 mg
 - Água destilada q.s.p.....1000 mL
- ◆ Água tamponada (NEVES, 2000):
 - Ⓐ Fosfato de sódio bibásico (QM[®], ACS).....11,866 g
 - Água destilada q.s.p.....1000 mL
 - Ⓑ Fosfato de potássio monobásico (Nuclear[®]).....9,073 g
 - Água destilada q.s.p.....1000 mL
- (Ⓐ 72,5 mL : Ⓑ 27,5 mL)
- ◆ Ácido fosfórico (Merck[®], Schuchardt, Alemanha);
- ◆ Ácido tricloroacético (Merck[®], Schuchardt, Alemanha);
- ◆ Carbamato de etila - Urethane[®] (Acros Organics, New Jersey, USA);

- ◆ Éter etílico (Nuclear[®]);
- ◆ Tetrahidrofurano p.a. (Merck[®], Schuchardt, Alemanha);
- ◆ Trietilamina p.s. (Merck[®], Schuchardt, Alemanha);
- ◆ Heparina sódica 5.000 UI/mL (Liquemine[®], Roche);
- ◆ Acetonitrila grau CLAE (Omnisolv[®], Gibbstown, USA);
- ◆ Metanol grau CLAE (Omnisolv[®], Gibbstown, USA);
- ◆ Câmara de Neubauer (Herka[®], Alemanha);
- ◆ Sonda descartável uretral siliconizada número 4 (Mark Med[®]);
- ◆ Filtros Centrifree[®] (Millipore[®]);
- ◆ Membranas de filtração hidrofílica HV em PVDF de 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore[®]);
- ◆ Sonda para microdiálise CMA/20 BAS (CMA/Microdialysis AB) com membrana de policarbonato de porosidade de 20.000 Daltons e 4 mm de comprimento de membrana.

4.2. Equipamentos

- ◆ Termômetro Clínico Digital TH 186 (Pro Check[®]);
- ◆ Agitador de tubos Mod. 251 Fanem;
- ◆ Centrífuga refrigerada 5417 R Eppendorf;
- ◆ Centrífuga refrigerada Sigma 4K15;
- ◆ Potenciômetro Micronal B 374;

- ◆ Ultra-som (Transsonic 460, Elma®);
- ◆ Equipamento para microdiálise composto de:

Bomba MD-1020 Bee Hive Controller, Módulo para seringa MD-1001 Baby Bee Syringe Drive e seringas MD-0050 500 µL Bee Stinger Gastight Syringes (BAS);
- ◆ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) composto por:

Bomba LC-10ADVP, Controlador de Fluxo FCV-10ALVP, Controlador de Sistema SCL-10AVP, Autoinjeter SIL-10ADVP, Detector de Fluorescência RF-10AXL, Degaseificador DGU-14A e Software Shimadzu CLASS-VP (Versão 6.12).
- ◆ Coluna Waters µBondapak™ C18 (125 Å 10µm) 3,9 x 300 mm;
- ◆ Pré-coluna com material de enchimento µBondapak™ C18/Corasil (37-50 µm, Waters, Millipore®);
- ◆ Programa Excel® v. 7.0 2000 (Microsoft® – USA);
- ◆ Programa de Regressão não-linear Scientist® v. 2.0 (MicroMath®, Salt Lake City, Utah, USA).

4.3. Animais

Os experimentos, aprovados pelo Comitê de Ética da UFRGS sob número 2003235 (Anexo 1), foram conduzidos em animais de laboratório convencionais heterogênicos. Foram utilizados ratos machos Wistar e camundongos *Mus domesticus domesticus* fêmeas, linhagem CF₁, obtidos no Biotério da Divisão de Experimentação Animal (DPEA) do Departamento de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (DDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).

Previamente aos experimentos, os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia, com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (07:00 – 19:00). Tiveram livre acesso a água e alimentação (ração certificada Nuvilab CR1[®]), com exceção dos grupos de animais que receberam o fármaco pela via oral, que foram mantidos em jejum *overnight*. Todos os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo cinco animais.

Após a contaminação com *Plasmodium berghei*, os animais foram mantidos no laboratório de pesquisa, em condições de temperatura controlada e isolados dos demais.

Ao término dos experimentos, os animais foram sacrificados por decapitação e o material biológico, devidamente acondicionado, foi destinado à coleta especial pelo Departamento Municipal de Limpeza Urbana (DMLU).

As normas do Conselho Canadense de Proteção aos Animais foram seguidas, de acordo com as condições laboratoriais (CCAC, 1993).

4.4. Cepa de *Plasmodium berghei*

A cepa de *Plasmodium berghei* ANKA foi originalmente cedida pelo Laboratório de Pesquisas em Malária da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ), onde se encontrava criopreservada em nitrogênio líquido. Para a ativação da cepa, a amostra de sangue foi descongelada à temperatura ambiente e submetida à centrifugação a 400 g por 5 minutos. Posteriormente, foi lavada com solução salina até não haver mais sinal de hemólise e foi ressuspensa em solução salina. Um volume de 200 μL da suspensão obtida foi

inoculado pela via i.p. em camundongos receptores para a manutenção da cepa *in vivo*³.

4.5. Metodologia

4.5.1. Manutenção da Cepa de *Plasmodium berghei*

A cepa de *Plasmodium berghei* foi mantida *in vivo* em camundongos fêmeas através de passagens sucessivas de sangue infectado. Semanalmente, 5 µl de sangue coletado da porção terminal da cauda do camundongo doador foi ressuspenso em 1500 µL de solução salina. Um volume de 500 e 1000 µl dessa suspensão foi inoculado pela via intraperitoneal a dois camundongos receptores, respectivamente.

4.5.2. Infecção Experimental

A metodologia de infecção de ratos Wistar por *Plasmodium berghei* foi desenvolvida adaptando-se protocolo de infecção descrito para camundongos. A rotina da infecção dos ratos, objetivando obter 100 % de mortalidade, foi estabelecida desde a fase de preparo do inóculo até a avaliação do processo infeccioso.

³ A ativação da cepa de *Plasmodium berghei* foi realizada pela Bolsista de Iniciação Científica Sabrina Mioranza.

Foram testadas as melhores condições de infecção experimental, avaliando-se a influência da idade dos animais, do tamanho de inóculo de infecção e da via de inoculação.

4.5.2.1. Preparo do Inóculo

O inóculo para a infecção dos ratos foi preparado a partir de sangue de camundongos fêmeas infectados. Inicialmente, o número total de hemáceas do camundongo foi determinado por contagem em câmara de Neubauer (WAYNFORTH e FLECKNELL, 1992). Através deste valor, o volume de sangue a ser coletado para obtenção de suspensão de concentração adequada de hemáceas infectadas foi determinado.

O sangue, coletado do camundongo doador por punção cardíaca após anestesia com éter etílico, foi ressuspenso em solução salina e essa suspensão foi administrada aos ratos.

4.5.2.2. Indução do Processo Infeccioso

Um volume de 400 μL da suspensão contendo hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* foi inoculado em ratos de diferentes idades (4, 5 e 10 semanas) por diferentes vias (intravenosa e intraperitoneal). Foram testados os inóculos de 10^5 , 10^7 e 10^8 hemáceas parasitadas. A inoculação intravenosa foi realizada pela veia lateral caudal.

Na Tabela 3 podem ser visualizados os experimentos realizados para determinar as condições ideais para obtenção do processo infeccioso experimental em ratos Wistar.

Tabela 3. Experimentos realizados para estabelecer as condições ideais para o processo infeccioso de ratos Wistar com *Plasmodium berghei*.

Idade (semanas)	Via de Inoculação	Número de animais	Peso (g)	Inóculo (Hemáceas Infectadas por <i>Plasmodium berghei</i>)
10	i.p.	4	182,2 ± 6,7	10 ⁵
4	i.p.	2	89,3 ± 2,3	10 ⁵
4	i.p.	4	85,3 ± 3,6	10 ⁷
5	i.p.	4	108,9 ± 5,4	10 ⁷
	i.v.	4	108,5 ± 5,3	10 ⁷
5	i.p.	6	98,5 ± 7,6	10 ⁸
	i.v.	6	94,8 ± 8,6	10 ⁸

4.5.2.3. Avaliação do Processo Infeccioso

O processo infeccioso foi avaliado pela determinação da parasitemia. Através de corte na porção terminal da cauda do rato, foi realizada a colheita de uma gota de sangue utilizada para fazer esfregaço em camada delgada em lâminas de microscopia. As hemáceas foram fixadas com metanol e coradas com corante Giemsa (WILCOX, 1960). A porcentagem de hemáceas parasitadas foi determinada por análise microscópica, utilizando aumento de 1000 ×, após contagem de aproximadamente 500 eritrócitos.

O curso da infecção foi avaliado até a erradicação completa da malária experimental ou até a morte dos animais e a mortalidade foi monitorada durante um período de 4 semanas após a indução do processo infeccioso.

4.5.2.4. Aferição da Temperatura Durante a Infecção Experimental

Objetivando-se elucidar o ciclo de vida do protozoário *Plasmodium berghei* em ratos, os animais de experimentação, apresentando parasitemia em torno de 15 %, tiveram sua temperatura retal monitorada. A temperatura foi aferida a cada hora por um período de 30 horas. Paralelo ao grupo de animais infectados (n = 5), também foi realizada a aferição em um grupo de animais controle (n = 3). A média da temperatura obtida a cada hora para os animais controle e infectados foi comparada pelo teste t de Student ($\alpha = 0,05$).

4.5.3. Adequabilidade da Metodologia de Malária Experimental

A adequabilidade do protocolo de infecção de ratos Wistar por *Plasmodium berghei* desenvolvido foi avaliada pelo tratamento dos animais infectados com cloroquina, fármaco antimalárico padrão, em dose curativa (30 mg/kg/dia). Os animais inoculados pela via i.v. com inóculo de 10^8 hemáceas infectadas por *Plasmodium berghei* foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo (n = 7), recebeu cloroquina oralmente como solução aquosa em duas doses diárias nos dias 7, 8 e 9 após a inoculação (DOW, REYNOLDS e THOMPSON, 1999). O segundo grupo serviu como controle (n = 3) e foi infectado nas mesmas condições, porém não recebeu tratamento com fármaco. A esse grupo de animais, foi administrado volume equivalente de solução salina p.o. q12h no 7°, 8° e 9° dias de infecção.

A efetividade do tratamento foi monitorada diariamente pela determinação da parasitemia.

4.5.4. Estabelecimento da Dose Efetiva de Quinina

Através dos experimentos farmacodinâmicos, objetivou-se selecionar uma dose efetiva da quinina para a realização dos experimentos farmacocinéticos.

Os animais inoculados com 10^8 hemáceas parasitadas via i.v. (n = 3-6/grupo) receberam cloridrato de quinina oralmente como solução aquosa a cada 4 ou 8 horas nos dias 7, 8 e 9 após a inoculação. Foram avaliadas as doses de QN de 10, 25, 50 e 250 mg/kg. Os tratamentos foram monitorados pela determinação da parasitemia e os esquemas posológicos foram comparados com o tratamento com cloroquina descrito em 4.5.3.

4.5.5. Metodologia Analítica para Quantificação da Quinina por CLAE

A concentração da quinina nas amostras biológicas (plasma e dialisado) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. A metodologia utilizada para a quantificação da quinina foi validada pela adaptação da metodologia descrita por Mirghani e colaboradores (1998).

4.5.5.1. Condições Cromatográficas

A fase móvel constituída de tampão fosfato pH 2,2, acetonitrila, ácido fosfórico 1 M, tetrahidrofurano e trietilamina nas proporções 46:3:2:1:0,8 (v/v), teve o pH_{aparente} final ajustado a 2,7 com ácido fosfórico puro e foi utilizada num fluxo de 1 mL/min. A detecção por fluorimetria foi realizada com excitação e emissão de 350 e 450 nm, respectivamente.

Após o preparo, a fase móvel foi filtrada em filtro de membrana Millipore® e desgaseificada por 10 minutos com o auxílio de banho de ultra-som.

Para as análises das amostras de plasma, foi utilizado cromatógrafo com sensibilidade baixa, ganho de 4 vezes e resposta 3. 50 µL do plasma processado foram injetados através de injeção automática. Para as amostras de dialisado, foi utilizada sensibilidade média, ganho de 16 vezes e resposta 4 e, manualmente, foram injetados 20 µL de amostra.

4.5.5.2. Preparo da Curva Padrão e Controles de Qualidade em Plasma

Foram pesados, analiticamente, 15,1 mg de cloridrato de quinina e, transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL. O volume do balão foi completado com água Milli-Q, e manteve-se a solução sob agitação por 15 minutos, obtendo-se concentração final de 500 µg/mL de quinina base livre.

A partir desta solução, foram realizadas diluições obtendo-se soluções de concentrações entre 1 e 125 µg/mL. Da diluição correspondente, foram transferidos 10 µL para tubo contendo 90 µL de plasma, obtendo-se as concentrações finais da curva padrão: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 12,5 µg/mL.

As amostras de controle de qualidade nas concentrações de 0,9; 7,5 e 10 µg/mL, foram preparadas similarmente, a partir de nova solução-mãe.

As amostras da curva padrão e de controle de qualidade foram submetidas a vórtex por 10 segundos e, posteriormente processadas conforme descrito em 4.5.5.3.

4.5.5.3. Processamento das Amostras de Plasma

Às amostras de plasma, adicionou-se 100 µL de ácido tricloroacético 5 % para precipitar as proteínas plasmáticas presentes. Agitou-se por 10 segundos e a mistura foi submetida à centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, a 25 °C. O sobrenadante foi quantificado por CLAE.

4.5.5.4. Validação da Metodologia Analítica por CLAE para Plasma

A metodologia analítica por CLAE para amostras de plasma foi validada através da linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e limite de quantificação do método. Os parâmetros de performance analítica foram avaliados através de curvas padrão e controles de qualidade de amostras de plasma contendo concentrações conhecidas de quinina, conforme descrito nas normas da Food and Drug Administration (FDA, 2001).

A precisão e exatidão do método foram determinadas pela análise em triplicata por três dias consecutivos de três diferentes concentrações de quinina (0,9; 7,5 e 10 µg/mL). A linearidade foi avaliada pela análise em triplicata de sete concentrações (0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 12,5 µg/mL) por três dias consecutivos. As curvas padrão foram obtidas pela análise de regressão dos mínimos quadrados considerando a área do pico da quinina em função da concentração teórica. A linearidade e desvio da linearidade das curvas padrão foram analisadas estatisticamente através da análise de variância (ANOVA). Na especificidade do método, avaliou-se a existência de picos interferentes no tempo de retenção da quinina.

4.5.5.5. Validação da Metodologia Analítica por CLAE para Dialisado

Conforme descrito no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos (FDA, 2001), a validação parcial de métodos é possível quando são realizadas modificações em um método previamente validado. Dentre estas modificações, cita-se a troca da matriz biológica.

Baseando-se na alteração da matriz de plasma para solução de Ringer, a metodologia analítica por CLAE para amostras de dialisado foi validada através dos parâmetros analíticos linearidade, repetibilidade, exatidão e limite de quantificação do método.

A precisão e exatidão do método foram determinadas pela análise em triplicata das três amostras de controle de qualidade preparadas em solução de Ringer (17; 75 e 375 ng/mL). A linearidade foi avaliada pela análise em triplicata de seis concentrações de quinina preparadas em solução de Ringer (10; 25; 50; 100; 250 e 500 ng/mL) por um dia. As curvas padrão e linearidade foram obtidas e analisadas da mesma maneira descrita na validação das amostras de plasma descrita no item 4.5.5.4.

4.5.6. Teste de Estabilidade das Amostras Biológicas

As amostras biológicas foram avaliadas quanto à estabilidade em baixas temperaturas, uma vez que, após a coleta, permaneceram armazenadas até quantificação.

Quantidade conhecida de quinina foi adicionada a amostras de plasma, obtendo-se concentração final de 5 µg/mL. Após homogeneização e centrifugação, o plasma foi armazenado em freezer -20 °C para subseqüentes análises por um

período de 4 meses. Em diferentes dias (0, 6, 8, 21, 23, 48, 57, 76, 91, 96 e 119), após descongelamento, as amostras foram submetidas ao processamento descrito em 4.5.3.3 e quantificação por CLAE.

Amostras de 100 ng/mL de quinina em solução de Ringer foram submetidas ao mesmo teste, porém por período de 2 meses, com análise nos dias 0, 9, 15, 23, 29, 34, 36, 43, 47, 56, 72 e 85.

No perfil cromatográfico, foi avaliada a existência de picos adicionais aos observados nas amostras biológicas, bem como a exatidão obtida nos diferentes dias de análise frente à curva padrão do dia.

4.5.7. Experimentos Farmacocinéticos

Os experimentos farmacocinéticos foram conduzidos em ratos machos Wistar sadios e em ratos infectados por *Plasmodium berghei*, anestesiados com carbamato de etila pela via intraperitoneal na dose de 1,25 g/kg com peso entre 115 e 135 g. O perfil plasmático da quinina em animais sadios e infectados em diferentes níveis (baixa e alta parasitemia) foi determinado após coleta de sangue em tempos pré-determinados (n = 10 ratos/grupo). A distribuição tecidual do fármaco no fígado e músculo foi avaliada, através da técnica de microdiálise, em animais sadios e infectados com alta parasitemia (n = 10 ratos/grupo).

4.5.7.1. Perfil Plasmático

Os animais com baixa parasitemia ($9,9 \pm 2,1$ %) foram submetidos a avaliação do perfil plasmático após $8,0 \pm 0,7$ dias de infecção. Os animais com alta

parasitemia ($37,4 \pm 8,7 \%$) foram submetidos aos experimentos após período de $12,10 \pm 0,88$ dias da indução do processo infeccioso.

Logo após a verificação completa da anestesia do animal, foi administrado 250 mg/kg de quinina pela via oral, através de gavagem, a animais sadios e infectados com baixa e alta parasitemia, submetidos a jejum *overnight*.

Para determinar a biodisponibilidade do fármaco, foi administrado 50 mg/kg de quinina em solução isotônica, via i.v. *bolus* a animais sadios ($n = 10$). O volume máximo administrado foi de 2 e 1 mL para as vias oral e intravenosa, respectivamente, respeitando os valores preconizados na literatura (WAYNFORTH e FLECKNELL, 1992).

Foram coletadas amostras de sangue ($\pm 200 \mu\text{L}$) pela veia lateral caudal utilizando butterfly 27G previamente ambientado com solução fisiológica heparinizada. Os tempos de coleta foram de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 480, 720 e 1440 minutos para a via oral e de até 720 min para a via intravenosa. Após as coletas, as amostras de sangue acondicionadas em tubos de reação heparinizados, foram submetidas à centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O plasma foi separado e congelado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento do processamento (4.5.3.3) e análise.

4.5.7.2. Distribuição Tecidual

A técnica de microdiálise foi utilizada para determinar as concentrações livres teciduais da quinina em fígado e músculo de ratos sadios e infectados com alta parasitemia ($38,2 \% \pm 12,6 \%$) após administração oral do fármaco na dose de 250 mg/kg.

Os animais, após jejum *overnight* e anestesia, foram imobilizados na posição supina e tiveram o fígado e músculo expostos através de procedimento cirúrgico. O fígado foi exposto após incisão de aproximadamente 2 cm abaixo do processo xifóide. A sonda de microdialise foi diretamente inserida no lobo direito do órgão. Na seqüência, foi retirada a pele que recobre o músculo tibial-cranial da pata posterior esquerda e a sonda de microdialise foi inserida no músculo com o auxílio de uma cânula guia. Para evitar o ressecamento dos tecidos, os mesmos foram cobertos com gaze embebida em solução salina a 0,9 %.

Para a coleta das amostras, as sondas de microdialise CMA/20 BAS foram perfundidas com solução de Ringer num fluxo de 1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$, selecionado a partir de estudos preliminares de determinação da recuperação relativa das sondas *in vitro* (4.5.7.2.1.).

Após a administração da quinina, as amostras de dialisado foram coletadas a cada 10 minutos no período inicial do experimento (30 min) e posteriormente a cada 30 minutos por um período de 12 h. O dialisado, que representa a concentração média do intervalo de tempo de coleta, foi determinado como a concentração no tempo médio deste intervalo. As amostras de dialisado foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o doseamento.

O *lag-time* devido ao volume morto entre o local de amostragem nos tecidos e o local de coleta do dialisado foi calculado como sendo aproximadamente 30 segundos. Considerando este valor negligenciável, não foi realizada correção nos tempos de coleta.

Para que as concentrações livres teciduais da quinina no líquido intersticial pudessem ser estimadas corretamente através da concentração no dialisado, as sondas de microdialise tiveram seu desempenho avaliado previamente a cada experimento através da determinação da taxa de recuperação *in vitro*. Para o tecido muscular, foi utilizado fator de ajuste da recuperação *in vitro/in vivo*.

4.5.7.2.1. Recuperação das Sondas de Microdiálise *in vitro*

A recuperação relativa das sondas de microdiálise *in vitro* pelo método de ganho foi determinada através da perfusão de diferentes fluxos (1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 $\mu\text{L}/\text{min}$) de solução de Ringer. Foram avaliadas 4 sondas de microdiálise que foram imersas em solução de quinina em concentrações de 0,5 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 37 °C. Cada concentração foi avaliada nos diferentes fluxos citados e, a cada mudança de fluxo e de concentração, foi deixado período de 20 minutos de estabilização. Após esse período, três coletas de 30 μL foram realizadas, sucessivamente.

A recuperação relativa *in vitro* por ganho foi determinada pela Equação 1.

Também foram realizados estudos de recuperação *in vitro* por perda, através da perfusão de solução de quinina em Ringer na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com fluxo de 1,0 em 4 sondas de microdiálise imersas em solução de Ringer a 37 °C. As 3 coletas de 30 μL de dialisado também foram realizadas após ambientação de 20 minutos. A recuperação relativa *in vitro* por perda foi determinada pela Equação 2.

As amostras de dialisados, das soluções perfundidas e das soluções de quinina contidas no recipiente para imersão das sondas foram congeladas até análise por CLAE.

Previamente a cada experimento com os animais, as sondas de microdiálise tiveram sua taxa de recuperação determinada *in vitro* por perda e o valor da recuperação foi utilizado para corrigir a concentração real livre no tecido.

4.5.7.2.2. Recuperação das Sondas de Microdiálise *in vivo*

A calibração das sondas *in vivo* foi realizada pelo método de retrodiálise. As sondas foram inseridas no fígado e no músculo de animais saudáveis e em fígado de animais infectados (n = 4/tecido), conforme descrito em 4.5.7.2. As sondas foram perfundidas com uma solução de quinina em Ringer na concentração de 1 µg/mL e fluxo de 1,0 µL/min. Após ambientação da sonda por uma hora, três amostras sucessivas de dialisado foram coletadas nos tempos 30, 60 e 90 minutos. As amostras de dialisado e da solução perfundida foram congeladas até análise por CLAE.

A recuperação relativa *in vivo* por retrodiálise foi determinada pela Equação 2 e a relação da recuperação *in vitro/in vivo* foi determinada para os tecidos investigados.

4.5.7.3. Avaliação dos Perfis Plasmático e Tecidual da Quinina

Os perfis de concentração plasmática total e livre tecidual foram analisados por modelos não-compartimentais e compartimentais, utilizando-se os programas de computador Excel[®] v. 7.0 (Microsoft[®]) e Scientist[®] v. 2.0 (MicroMath[®]), respectivamente.

4.5.7.3.1. Análise Não Compartimental

Os parâmetros farmacocinéticos da quinina, abordagem não compartimental, foram obtidos a partir do perfil plasmático individual utilizando as equações descritas por Gibaldi e Perrier (1982).

A constante de velocidade de eliminação (λ) foi estimada pela inclinação da fase terminal da curva log-linear da concentração plasmática *versus* tempo. A partir deste valor, foi estimado o valor do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) conforme Equação 3:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda} \quad (3)$$

A área sob a curva foi calculada pelo método trapezoidal somando-se a área sob a curva do tempo zero até o último tempo de coleta (ASC_{0-t}) com a área sob a curva extrapolada (ASC_{ext}) conforme Equações 4 e 5:

$$ASC_{0-t} = \left(\frac{Cp_0 + Cp_1}{2} \right) \cdot \Delta t + \left(\frac{Cp_1 + Cp_2}{2} \right) \cdot \Delta t + \dots + \left(\frac{Cp_{(t-1)} + Cp_t}{2} \right) \cdot \Delta t \quad (4)$$

$$ASC_{ext} = \frac{Cp_t}{\lambda} \quad (5)$$

onde Cp_0 , Cp_1 , Cp_2 são as concentrações plasmáticas no tempo zero e nos tempos subsequentes de coletas. $Cp_{(t-1)}$ é a concentração no penúltimo tempo de coleta e Cp_t no último tempo de coleta do plasma

A biodisponibilidade (F) da quinina foi calculada pela Equação 6:

$$F = \frac{ASC_{0-\infty(oral)} \cdot D_{i.v.}}{ASC_{0-\infty(i.v.)} \cdot D_{oral}} \quad (6)$$

Também foram estimados os parâmetros *clearance* total (Cl_{total}) e volume de distribuição no *steady state* (Vd_{ss}) pelas Equações 7 e 8:

$$Cl_{total} = \frac{F \cdot D}{ASC_{0-\infty}} \quad (7)$$

$$Vd_{ss(i.v.)} = MRT_{i.v.} \cdot Cl_{total} \quad (8)$$

onde D é a dose administrada.

A concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e o tempo para atingir esta concentração ($t_{máx}$) foram estimados pela análise do perfil gráfico.

O parâmetro definido pela teoria do momento estatístico área sob a curva do primeiro momento ($ASMC_{0-\infty}$) foi calculado pelo método trapezoidal somando-se a ASMC do tempo zero até o último tempo de coleta ($ASMC_{0-t}$) com a área sob a curva extrapolada ($ASMC_{ext}$), conforme Equações 9 e 10:

$$ASMC_{0-t} = \left(\frac{(Cp_0 \cdot t_0) + (Cp_1 \cdot t_1)}{2} \right) \cdot \Delta t + \dots + \left(\frac{(Cp_{(t-1)} \cdot t_{(t-1)}) + (Cp_t \cdot t_t)}{2} \right) \quad (9)$$

$$ASMC_{ext} = \left(\frac{Cp_t \cdot t}{\lambda} \right) + \left(\frac{Cp_t}{\lambda^2} \right) \quad (10)$$

O tempo de residência médio (MRT) foi estimado a partir dos valores de ASC e ASMC (Equação 11):

$$\text{MRT} = \frac{\text{ASMC}_{0-\infty}}{\text{ASC}_{0-\infty}} \quad (11)$$

A partir dos perfis teciduais individuais foram estimados os parâmetros área sob a curva ($\text{ASC}_{0-t(\text{tec})}$), área sob a curva do primeiro momento ($\text{ASMC}_{0-t(\text{tec})}$) e tempo de residência médio ($\text{MRT}_{(\text{tec})}$) utilizando as Equações descritas acima.

4.5.7.3.2. Análise Compartmental

Para a análise compartmental dos dados plasmáticos foi realizada modelagem matemática utilizando o programa de regressão não linear Scientist[®] versão 2.0 (MicroMath[®]).

O modelo compartmental e as respectivas equações utilizadas para determinar os parâmetros individuais foram selecionados considerando o melhor ajuste gráfico e correlação dos pontos experimentais aos perfis calculados, a menor soma dos quadrados dos desvios entre os pontos experimentais e o perfil calculado e o maior Critério de Seleção do Modelo (MSC) do programa. Foram testados modelos de 1 e 2 compartimentos para a via oral e modelos de 1, 2 e 3 compartimentos para a via intravenosa.

4.5.7.4. Análise Estatística

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos do modelo não-compartimental e do modelo compartimental foram comparados estatisticamente, utilizando-se a análise de variância. Os parâmetros determinados com os dados de animais sadios e infectados também foram comparados por ANOVA ($\alpha = 0,05$). As diferenças significativas foram determinadas por Tukey, assumindo-se α de 0,05.

O procedimento de Tukey foi escolhido como complemento da ANOVA pois visa identificar quais as médias que, tomadas duas a duas, diferem significativamente (CALLEGARI-JACQUES, 2004). Dessa forma, todos os grupos experimentais foram comparados entre si.

4.5.8. Ligação da Quinina às Proteínas Plasmáticas

A ligação da quinina às proteínas plasmáticas foi determinada utilizando-se a técnica de ultrafiltração. O plasma de ratos sadios, infectados com baixa e infectados com alta parasitemia ($n = 7$ animais/grupo) foi coletado formando um *pool* de plasma para cada grupo de animais. A 900 μL do *pool* de plasma foram adicionados 100 μL de quantidades conhecidas de quinina, obtendo concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Após homogeneização e incubação por 10 min a 37 °C, 100 μL das amostras foram submetidos a processamento conforme descrito em 4.5.5.3. e quantificadas por CLAE (C_T).

Os 900 μL restantes foram adicionados ao dispositivo de filtração Centrifree[®] (Millipore[®]) e submetidos a ultrafiltração. Procedeu-se a centrifugação a 3060 rpm (2000 g), por 20 minutos e 25 °C e o ultrafiltrado foi quantificado por CLAE utilizando o mesmo processamento de amostras descrito em 4.5.5.3.

A fração livre (f_u) foi calculada pela razão entre a concentração no ultrafiltrado (C_U) e a concentração total (C_T), conforme Equação 12:

$$f_u = \frac{C_u}{C_T} \quad (12)$$

A afinidade da quinina pela membrana de filtração foi investigada através das mesmas condições empregadas para as amostras de plasma. Foram utilizados 900 μL de solução aquosa de quinina nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Após centrifugação, o ultrafiltrado foi quantificado e a fração aderida à membrana (f_a) foi calculada como a diferença entre a fração total e a razão entre a concentração do ultrafiltrado (C_U) e a concentração inicial adicionada ao dispositivo (C_T), conforme Equação 13:

$$f_a = 1 - \frac{C_u}{C_T} \quad (13)$$

A aderência ao dispositivo foi utilizada para correção dos resultados, somando-se a quantidade retida no filtro à fração livre determinada.

A faixa de concentração investigada contempla os níveis plasmáticos esperados para a quinina quando administrada nas doses e vias que foram testadas nos experimentos farmacocinéticos. Os experimentos foram realizados em triplicata para todas as concentrações investigadas.

Os valores obtidos foram comparados por ANOVA e as diferenças significativas foram determinadas por Tukey, assumindo $\alpha=0,05$.

4.5.9. Determinação da Concentração de Albumina Sérica

A determinação da concentração de albumina nas amostras de soro dos ratos sadios e infectados foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS utilizando metodologia colorimétrica do verde de bromocresol (MOURA, 1982).

A albumina tem a propriedade de se ligar a uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes. Quando presente na amostra, reage com o verde de bromocresol em meio ácido, formando um complexo colorido que é quantificado espectrofotometricamente. A absorvância do complexo formado, medida em 630 nm, é diretamente proporcional à concentração da albumina na amostra analisada (HENRY, 1999).

O sangue de ratos sadios e infectados com baixa ($10,7 \pm 1,7$ %) e alta parasitemia ($29,4 \pm 5,4$ %) foi coletado em tubos sem agente anticoagulante (n = 4 animais/grupo). Após centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm, o soro foi separado e congelado até o momento das análises. Os resultados individuais dos animais foram analisados em triplicata e foram utilizados para calcular a média da concentração de albumina sérica em cada grupo experimental. Os valores obtidos foram comparados por ANOVA e as diferenças significativas determinadas por Tukey, assumindo α de 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Infecção Experimental

A indução da malária em caráter experimental tem sua importância reconhecida pelo papel que exerce nas pesquisas de desenvolvimento de fármacos e elucidação das características da doença (LANDAU e CHABAUD, 1994). Normalmente, camundongos são utilizados como animais de experimentação para o estudo desta infecção por serem mais suscetíveis ao *Plasmodium* (JANSE *et al.*, 1994). Porém, em experimentos farmacocinéticos que requerem grande volume de sangue, a utilização de camundongos torna-se inapropriada, sendo mais adequado o uso de ratos (DOW, REYNOLDSON e THOMPSON, 1998 e 1999). No entanto, a falta de protocolos claros de infecção experimental de malária em ratos, evidencia a necessidade do desenvolvimento de um protocolo compatível com as necessidades experimentais.

Os experimentos de desenvolvimento de modelo de infecção de malária em ratos Wistar foram delineados com o intuito de abranger as variáveis que influenciam o processo infeccioso como idade dos animais, tamanho do inóculo de infecção e via de inoculação (CARTER e DIGGS, 1977; DOW, REYNOLDSON e THOMPSON, 1998 e 1999; PIERROT *et al.*, 2003), conforme Tabela 3. Através da metodologia utilizada, objetivou-se provocar infecção nos ratos que levasse a 100 % de mortalidade. Deste modo, ao testar-se a quinina, poder-se-ia afirmar que a cura obtida era decorrente do tratamento e não da remissão espontânea da infecção.

A cepa de *Plasmodium berghei* ANKA foi mantida *in vivo* em camundongos durante a realização deste trabalho devido a perda da viabilidade celular dos parasitas quando armazenados a baixas temperaturas. Nas passagens sucessivas de sangue infectado, observou-se que a infecção para camundongos era fulminante

e que os mesmos apresentam elevada parasitemia em curto intervalo de tempo, desenvolvendo sintomas de malária cerebral como tremores intensos e debilidade física conforme descrito por Carvalho e colaboradores (2000).

Para a infecção de ratos, inicialmente foram utilizados animais adultos de 10 semanas, por ser esta a idade dos animais convencionalmente utilizados em experimentos farmacocinéticos.

Através da inoculação intraperitoneal de 10^5 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* em ratos Wistar de 10 semanas ($n = 4$), observou-se aumento da parasitemia até o 12º dia ($\pm 3,6$ dias) atingindo um pico parasitêmico de $8,0 \pm 6,7$ %. Após esse período, ocorreu um declínio na parasitemia e, após 20-23 dias de infecção, todos os animais se curaram do processo infeccioso.

Na Figura 6 pode ser visualizado o perfil médio de infecção dos ratos Wistar de 10 semanas que receberam inóculo de 10^5 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* pela via intraperitoneal.

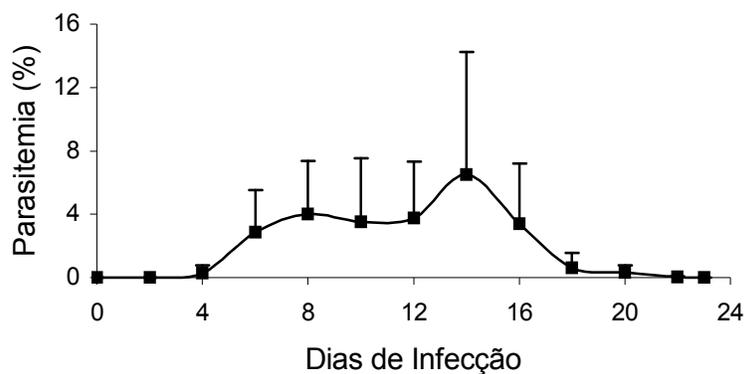


Figura 6. Perfil parasitêmico médio obtido após inoculação intraperitoneal de 10^5 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* a ratos Wistar de 10 semanas ($n = 4$) (Média \pm D.P.).

Os resultados obtidos para ratos de 10 semanas foram compatíveis com os observados por Pierrot e colaboradores (2003) que, usando a espécie Fischer, também obtiveram cura completa dos ratos de 12 semanas após inoculação de 10^5 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei*. Os pesquisadores observaram pico parasitêmico entre os dias 12 e 15 pós-infecção e, após 20 ± 3 dias, a malária havia sido completamente erradicada.

Conforme descrito por Carter e Diggs (1977), a idade dos animais influencia diretamente o curso da infecção malárica. Ratos idosos são relativamente refratários à infecção por *Plasmodium berghei*, desenvolvendo baixa parasitemia.

Estudos sugerem que a imunidade protetora à malária é mais rapidamente desenvolvida em adultos que em crianças (BAIRD, 1995) e que, tanto a resposta celular como a humoral são requeridas no controle da infecção. Análises imunológicas de roedores demonstraram que as células T CD4+ e CD8+ e também as células B estão associadas com a proteção contra a malária (TAYLOR-ROBINSON, 1995).

Adam e colaboradores (2003) investigaram o curso da infecção e resposta imune contra *Plasmodium berghei* em ratos Fischer de 4 e 8 semanas. Observaram elevados níveis parasitêmicos nos animais de 4 semanas resultando em 100 % de mortalidade após inoculação de 10^5 hemáceas parasitadas. Para os ratos de 8 semanas, 22-25 dias pós-infecção, observaram a sobrevivência de todos os animais. Um dos fatores atribuídos à cura desses animais foram os níveis de citocinas circulantes após infecção. Para os animais resistentes, observaram níveis aumentados de interferon- γ e um aumento de interleucina-10 foi observado nos ratos susceptíveis à infecção.

Frente ao exposto e, objetivando obter 100 % de mortalidade nos ratos Wistar, a idade dos animais de experimentação foi reduzida. Os ratos jovens normalmente são incapazes de controlar a infecção devido à hiperparasitemia obtida

e à falência de múltiplos órgãos resultante das anormalidades metabólicas como hipoglicemia e acidose láctica (HOLLOWAY, KRISHNA e WHITE, 1991).

Considerando a infecção fulminante obtida em ratos Fischer de 4 semanas após inoculação de 10^5 hemáceas parasitadas (ADAM *et al.*, 2003), realizou-se um estudo piloto nestas condições experimentais com ratos Wistar ($n = 2$). No entanto, observou-se cura espontânea de todos animais, comprovando a diferença no perfil do processo infeccioso para as diferentes espécies usadas. Essas diferenças são atribuídas especialmente às variações genômicas associadas às espécies dos modelos animais (NUSSENZWEIG, COCHRANE e LUSTIG, 1978; NAHREVANIA e DASCOMBRE, 2001).

Com a inoculação i.p. de maior inóculo, 2×10^6 hemáceas parasitadas com *Plasmodium berghei*, Dow e colaboradores (1999) observaram mortalidade de 30 % em ratos Wistar de 5 semanas. Dessa forma, ainda utilizando animais de 4 semanas ($n = 4$), foi testado um inóculo maior de 10^7 hemáceas parasitadas. A infecção desenvolvida foi fulminante para todos os animais e o pico parasitêmico foi observado nos dias 14-20 pós-infecção, com níveis de $61,2 \pm 9,0$ %. No entanto, as limitações da utilização de animais desse tamanho em experimentos farmacocinéticos levou-nos a testar o inóculo de 10^7 hemáceas parasitadas em ratos de 5 semanas. Nesta investigação, foram testadas as vias de inoculação i.p. e i.v.

Após inoculação de 10^7 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* em ratos Wistar de 5 semanas, observou-se mortalidade de 25 e 50 % para as vias i.p. e i.v., respectivamente, conforme pode ser visualizado na Figura 7. A parasitemia máxima não diferiu para as duas vias de inoculação testadas onde foram obtidos valores de $29,1 \pm 14,0$ % e $36,2 \pm 10,7$ % para as vias i.p. e i.v., respectivamente. O pico parasitêmico ocorreu nos dias 11-14 e 11-17 pós-infecção intraperitoneal e intravenosa, respectivamente, e, também não diferiu significativamente entre as vias.

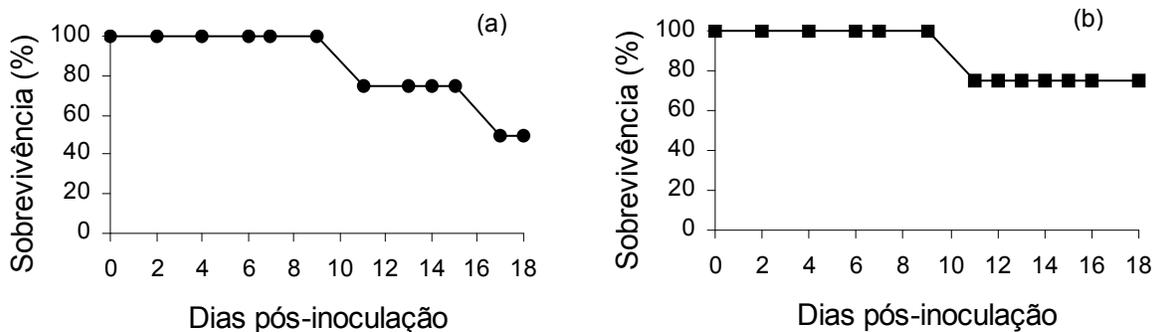


Figura 7. Perfil de sobrevivência cumulativa de ratos Wistar de 5 semanas infectados com 10^7 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* pela via i.v. (a) (●) e i.p. (b) (■) (n = 4 ratos/grupo).

Apesar da mortalidade de 100 % obtida em animais de 4 semanas, optou-se pela utilização de animais de 5 semanas por serem maiores e, portanto, de mais fácil manipulação. Além disso, é importante que o animal de experimentação tenha o maior volume sanguíneo possível para que, com as coletas seriadas de amostras, a retirada de fluido influencie minimamente na avaliação farmacocinética.

Para obter infecção fulminante nos ratos de 5 semanas, testou-se o aumento do inóculo para 10^8 hemáceas parasitadas (n = 6 ratos/via). Após a inoculação, a infecção mostrou-se fatal para 100 % dos animais após 13-16 dias para a via i.v. e 13-18 dias para a via i.p. Na Figura 8, são apresentados os resultados da sobrevivência cumulativa obtidos.

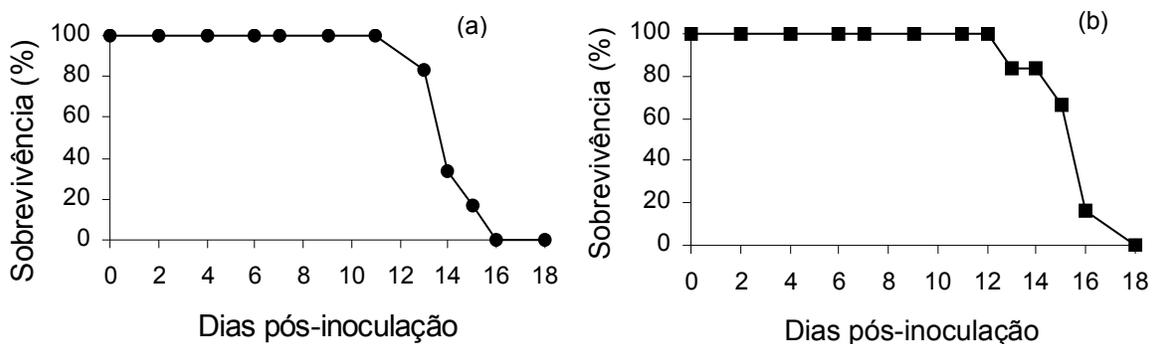


Figura 8. Perfil de sobrevivência cumulativa de ratos Wistar de 5 semanas infectados com 10^8 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* pela via i.v. (a) (●) e i.p. (b) (■) (n = 6 ratos/grupo).

A parasitemia máxima obtida foi de $41,5 \pm 20,0$ % e $59,2 \pm 12,5$ % para as vias i.p. e i.v., respectivamente, não diferindo significativamente ($\alpha = 0,05$). Na Figura 9 são mostrados os perfis de infecção para as duas vias de inoculação investigadas.

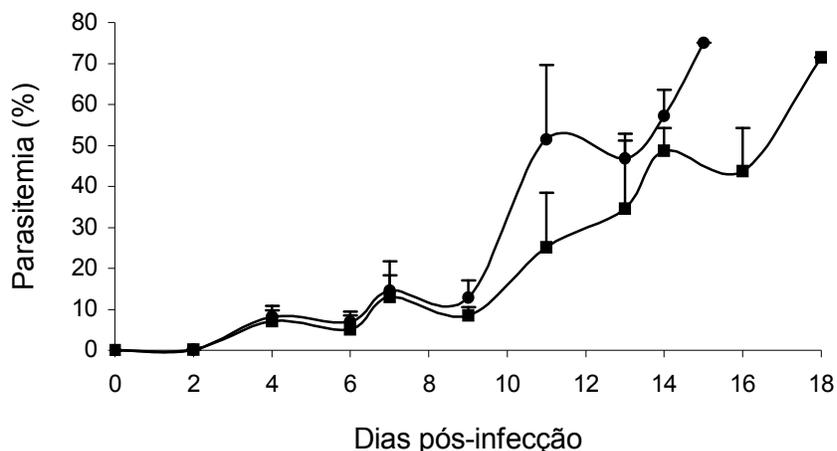


Figura 9. Perfil parasitêmico médio obtido após inoculação intraperitoneal (■) e intravenosa (●) de 10^8 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* em ratos Wistar de 5 semanas ($n = 6$ ratos/grupo) (Média \pm D.P.).

A menor dispersão dos dados de parasitemia pela via i.v. pode ser observada pelos baixos desvios padrão obtidos nos tempo de amostragem. Na inoculação intraperitoneal, os maiores desvios padrão observados podem estar associados à absorção errática desta via. Ferreira-da-Cruz e colaboradores (2000) já haviam relatado alta variabilidade no perfil parasitêmico após inoculação pela via intraperitoneal de 10^7 hemáceas parasitadas em camundongos. Observaram dois perfis distintos de parasitemia: perfil padrão em que a parasitemia aumentou crescentemente desde o 1° dia de infecção e perfil lento, onde o início do crescimento da parasitemia foi observado no 4° dia pós-infecção. Para a via intravenosa, no entanto, os resultados obtidos pelos autores foram mais homogêneos gerando níveis parasitêmicos médios superiores aos obtidos após inoculação intraperitoneal.

Para facilitar a visualização, na Tabela 4 estão sumarizados os resultados dos experimentos de desenvolvimento de metodologia para infecção de ratos Wistar por *Plasmodium berghei*.

Tabela 4. Resultados dos experimentos realizados para estabelecer as condições ideais para o processo infeccioso de ratos Wistar com *Plasmodium berghei*.

Idade (semanas)	Via de Inoculação	Número de animais	Inóculo	Pico de Parasitemia (dias)	Pico de Parasitemia (%)	Mortalidade (%)
10	i.p.	4	10 ⁵	12,0 ± 3,6	8,0 ± 6,7	0
4	i.p.	2	10 ⁵	nd	nd	0
4	i.p.	4	10 ⁷	17,5 ± 2,6	61,2 ± 9,0	100
5	i.p.	4	10 ⁷	12,3 ± 1,5	29,1 ± 14,0	25
	i.v.	4	10 ⁷	13,0 ± 3,2	36,2 ± 10,7	50
5	i.p.	6	10 ⁸	15,7 ± 1,6	41,5 ± 20,0	100
	i.v.	6	10 ⁸	14,3 ± 1,0	59,2 ± 12,5	100

nd = não determinado

Através da metodologia de infecção de ratos Wistar por *Plasmodium berghei* desenvolvida, obteve-se mortalidade de 100 % após inoculação de 10⁸ hemáceas parasitadas em ratos Wistar de 5 semanas, atingindo o objetivo proposto. Os perfis de parasitemia pela inoculação nas diferentes vias (i.v. e i.p.) foram similares. Porém, através da inoculação intravenosa, observou-se maior homogeneidade no percentual de parasitemia entre os animais testados.

Dessa forma, as condições selecionadas para a indução de malária experimental em ratos Wistar foram inoculação pela via intravenosa de 10⁸ hemáceas parasitadas em ratos de 5 semanas. Devido ao aumento do inóculo de infecção, fez-se necessário investigar se o processo infeccioso seria revertido por tratamento com fármaco antimalárico padrão, conforme será discutido no item 5.2.

5.1.1. Aferição da Temperatura Durante a Infecção Experimental

O pigmento malárico (hemozoína), substância pirogênica liberada durante as esquizogonias sangüíneas, parece ter um fator preponderante na gênese da febre. Durante a fase aguda da malária, a hemozoína, bem como um material glicolipídico liberado da ruptura do esquizonte, ativa e mobiliza células imunocompetentes a produzirem citocinas (ADAM *et al.*, 2003). As citocinas agem direta ou indiretamente sobre os parasitas, mas também podem ser nocivas para o hospedeiro, estando associadas à febre observada. No entanto, até hoje não se sabe com exatidão o mecanismo que provoca os característicos acessos febris observados em indivíduos infectados por parasitas do gênero *Plasmodium* (BRAGA e FONTES, 2000). Em humanos, a febre ocorre em período dependente da espécie infectante, podendo ser observada a q48h ou q72h (RANG, DALE e RITTER, 2001). Em ratos, o ciclo sangüíneo assexual do *Plasmodium berghei* é de aproximadamente 24 horas (LANDAU e BOULART, 1978). Nesse período, poderiam ser observadas elevações de temperatura.

A elevação da temperatura corpórea pode provocar alterações nos parâmetros farmacocinéticos de fármacos. Foi observado aumento da atividade das enzimas de hidroxilação do citocromo P450 (BRODIE, 1951 *apud* MANSOR, WARD e EDWARDS, 1991)⁴ e aumento do fluxo sanguíneo hepático durante a febre. O fluxo aumentado é atribuído ao aumento do ritmo cardíaco provocado pela febre (BRADLEY, 1949 *apud* MANSOR, WARD e EDWARDS, 1991)⁵. Essas alterações provocariam aumento na taxa de depuração e também alterações no volume de distribuição de fármacos.

⁴ BRODIE, B.B. *et al.* Metabolic products of cinchona alkaloids in human urine. *Journal of Biological Chemistry*, v. 188, p. 567-581, 1951 *apud* MANSOR, S.M.; WARD, S.A.; EDWARDS, G. The effect of fever on quinine and quinidine disposition in the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 43, p. 705-708, 1991.

⁵ BRADLEY, S.E. Variations in hepatic blood flow in man during health and disease. *New England Journal of Medicine*, v. 240, p. 456-461, 1949 *apud* MANSOR, S.M.; WARD, S.A.; EDWARDS, G. The effect of fever on quinine and quinidine disposition in the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 43, p. 705-708, 1991.

Não foram investigadas as possíveis mudanças farmacodinâmicas da quinina durante o processo febril, no entanto, Rowland e Tozer (1995) sugerem redução da dose usual de quinina nos casos severos de febre pois as concentrações plasmáticas encontram-se elevadas e o metabolismo encontra-se prejudicado nesta condição.

Mansor e colaboradores (1991) investigaram o efeito da febre na disposição da quinina em ratos. Em contraste com o sugerido por Rowland e Tozer (1995) observaram concentrações plasmáticas inferiores em ratos febris, aumento de 25 % no *clearance* e 47 % no volume de distribuição, comparados com os animais controle. Em consequência dessas alterações, o tempo de meia-vida da quinina em ratos febris diminui 55 %. No entanto, nesse estudo, a febre foi induzida por administração i.p. de *E. coli* e não provocada pela indução experimental de malária.

Objetivando elucidar o ciclo de vida do parasita *P. berghei* em ratos Wistar, bem como avaliar a existência de picos febris que influenciariam nos parâmetros farmacocinéticos avaliados, foi aferida a temperatura de animais sadios e infectados, a cada hora, durante um período de 30 horas.

Na Figura 10, podem ser observados os perfis de temperatura obtidos nos ratos sadios e infectados.

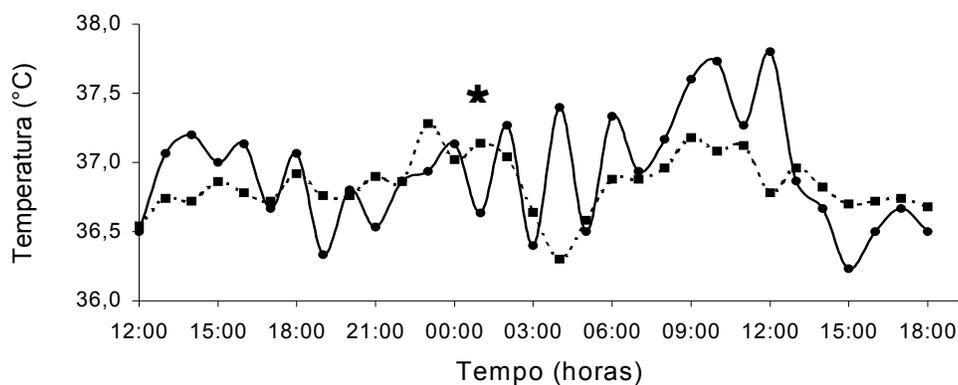


Figura 10. Perfil da temperatura retal de ratos sadios ($n = 3$) (—●—) e de ratos de 5 semanas infectados pela via i.v. com 10^7 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* ($n = 5$) (- -■- -).

*: 1:00 h – Diferença significativa ($\alpha = 0,05$).

Não houve diferença significativa entre a temperatura dos ratos sadios e dos ratos infectados ($\alpha = 0,05$), há exceção do tempo de 1:00 h (★). Nesse horário, os animais sadios apresentaram temperatura de $36,63 \pm 0,33$ °C e os animais infectados temperatura de $37,14 \pm 0,21$ °C. No entanto, a elevação da temperatura observada no grupo de animais infectados, não foi considerada uma situação de hipertermia pois a temperatura registrada não foi superior à temperatura corpórea normal de ratos, que é de 35,6 °C a 38,9 °C (WILLIAMS, 1976; CCAC, 1993).

As substâncias pirogênicas liberadas durante a infecção malárica por si só não explicam o fenômeno da febre, havendo, talvez, a intercorrência ou associação com algumas substâncias pirogênicas endógenas (BRAGA e FONTES, 2000). Talvez a ausência ou diferença na liberação dessas substâncias em ratos Wistar quando comparada com o processo que ocorre na infecção malárica em humanos justifique a ausência de picos febris observada neste trabalho.

5.2. Adequabilidade da Metodologia de Infecção Malárica Desenvolvida

Após desenvolvimento do modelo de infecção malárica em ratos que resultou em 100 % de mortalidade, foi necessário realizar o tratamento de animais infectados com doses usuais de um antimalárico padrão para investigar se, com o aumento do inóculo, o processo infeccioso ainda era passível de cura. Para a avaliação da adequabilidade do método desenvolvido, foram realizados experimentos farmacodinâmicos através da administração oral de cloroquina.

Os animais inoculados pela via i.v. com inóculo de 10^8 hemáceas infectadas por *Plasmodium berghei* foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo ($n = 7$), recebeu cloroquina oralmente (30 mg/kg/dia) como solução aquosa em duas doses diárias nos dias 7, 8 e 9 após a inoculação, conforme protocolo estabelecido por Dow e colaboradores (1999). O segundo grupo serviu como controle ($n = 3$) e foi infectado nas mesmas condições, recebendo volume equivalente de salina p.o. q12h

no 7°, 8° e 9° dias pós-infecção. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 11.

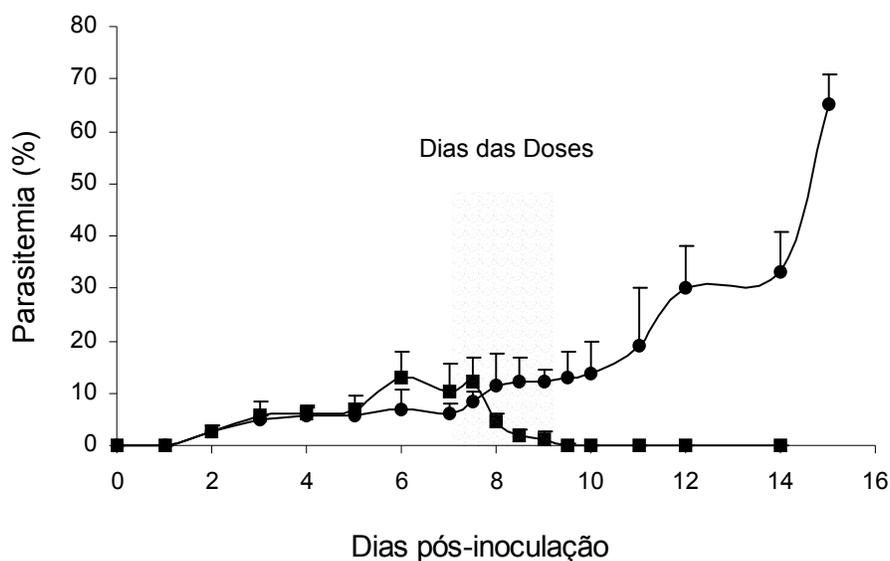


Figura 11. Parasitemia média obtida após tratamento de ratos Wistar de 5 semanas infectados por *Plasmodium berghei* pela via i.v com inóculo de 10^8 hemáceas parasitadas. Ratos tratados pela via oral com cloroquina na dose de 30 mg/kg/dia q12h nos dias 7-9 pós-inoculação (n = 7) (■) e ratos controle (n = 3) (●) que receberam salina (Média \pm D.P.).

Todos animais controle morreram devido à infecção apresentando perfil parasitêmico semelhante ao observado durante o desenvolvimento do protocolo de infecção experimental, demonstrando a reprodutibilidade do mesmo.

Os animais que receberam cloroquina tiveram a parasitemia crescente até o início do tratamento, apresentando pico parasitêmico de $13,2 \% \pm 4,4$ nos dias 6-7 pós-inoculação. O nível parasitêmico antes do início do tratamento não diferiu do observado no grupo controle ($10,1 \pm 5,4 \%$ versus $6,3 \pm 1,8 \%$).

Após o início do tratamento, no 7° dia pós-inoculação, observou-se redução significativa da parasitemia nos animais que receberam cloroquina em comparação

aos que receberam salina ($\alpha = 0,05$). A erradicação completa da doença pôde ser observada no término do tratamento ($10,4 \pm 0,5$ dias pós-infecção). Esses resultados corroboram com os obtidos por Dow e colaboradores (1999) que observaram a cura dos animais no 10 ° dia pós-infecção.

Considerando os resultados obtidos, em que a infecção induzida com inóculo maior do que o normalmente utilizado na literatura pôde ser erradicada com dose padrão do antimalárico cloroquina, a metodologia de infecção experimental de malária em ratos Wistar foi considerada adequada para a realização das investigações subseqüentes.

5.3. Estabelecimento da Dose Efetiva de Quinina

Para a escolha de uma dose adequada a ser utilizada nos experimentos de farmacocinética foi necessário estabelecer uma dose efetiva de quinina no modelo proposto, através de estudos farmacodinâmicos.

No 7°, 8° e 9° dia após a inoculação de 10^8 hemáceas infectadas com *Plasmodium berghei* pela via i.v. em ratos Wistar de 5 semanas foram conduzidos os experimentos de relação dose-efeito da quinina em 7 grupos experimentais. Foram avaliadas as doses de 10, 25, 50 e 250 mg/kg administradas por gavagem utilizando solução aquosa de cloridrato de QN. As doses de QN de 10, 25 e 50 mg/kg foram administradas a cada 4 ou 8 horas. Para a dose de 250 mg/kg foi avaliado o tratamento com intervalo entre doses (τ) de 8 horas, nos três dias consecutivos. Uma hora antes da administração do fármaco, procedia-se a retirada da ração dos animais, que era disponibilizada novamente uma hora após a administração. A efetividade do tratamento foi monitorada pelos níveis de parasitemia.

Na Tabela 5, encontram-se os resultados da efetividade do tratamento com quinina no modelo de malária experimental em ratos Wistar.

Tabela 5. Efetividade do tratamento com quinina por via oral nas doses de 10, 25, 50 e 250 mg/kg administradas nos dias 7 a 9 pós-infecção, a q4h ou a q8h, em ratos Wistar de 5 semanas infectados pela via i.v.com inóculo de 10^8 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei*.

Dose (mg/kg)	Intervalo entre doses (h)	Número de animais	Cura (%)	Mortalidade (dias)
10	4	6	50	13-18
	8	4	0	8-13
25	4	4	100	-
	8	6	67	17-20
50	4	3	100	-
	8	5	100	-
250	8	6	100	-

A dose de 10 mg/kg, equivalente a dose usual de quinina em seres humanos, foi capaz de curar 50 % dos animais infectados quando administrada a cada 4 horas, porém não resultou em cura com τ de 8 horas, sendo que todos os animais morreram 8-13 dias após a indução experimental de malária. Nos animais em que o tratamento não foi eficiente (n = 3, q4h; n = 4, q8h) não foi observado aumento significativo na sobrevivência em relação aos animais não tratados ($\alpha = 0,05$). Nos animais que não receberam quinina, a mortalidade ocorreu $14,3 \pm 1,0$ dias após indução do processo infeccioso, conforme Figura 8 (a) do item 5.1. Com o tratamento na menor dose investigada, observou-se mortalidade dos animais $13,3 \pm 3,0$ dias pós-infecção.

A dose de 25 mg/kg mostrou-se efetiva para todos os animais quando administrada a cada 4 horas. Quando administrada q8h, a sobrevivência dos animais foi de 67 %. Nessa dose, no entanto, diferente do observado para a dose de 10 mg/kg, a sobrevivência em relação aos animais não tratados foi significativamente

maior ($\alpha = 0,05$). Com a administração de 25 mg/kg de quinina q8h, a mortalidade ocorreu $18,5 \pm 2,1$ dias após a inoculação.

Observa-se na Tabela 5, que para o tratamento com as doses de 10 e 25 mg/kg, uma maior efetividade ocorre para os menores intervalos entre doses. Este resultado pode estar associado ao fator de acumulação do fármaco (SHARGEL e YU, 1993). Com menores τ são observadas concentrações plasmáticas superiores, resultando em maior efeito parasiticida da quinina.

As duas maiores doses investigadas (50 e 250 mg/kg) foram efetivas com os esquemas posológicos propostos e todos os animais se curaram do processo infeccioso após o término do tratamento. Nas Figuras 12 e 13 podem ser visualizados os perfis de infecção dos animais que receberam tratamento com essas doses.

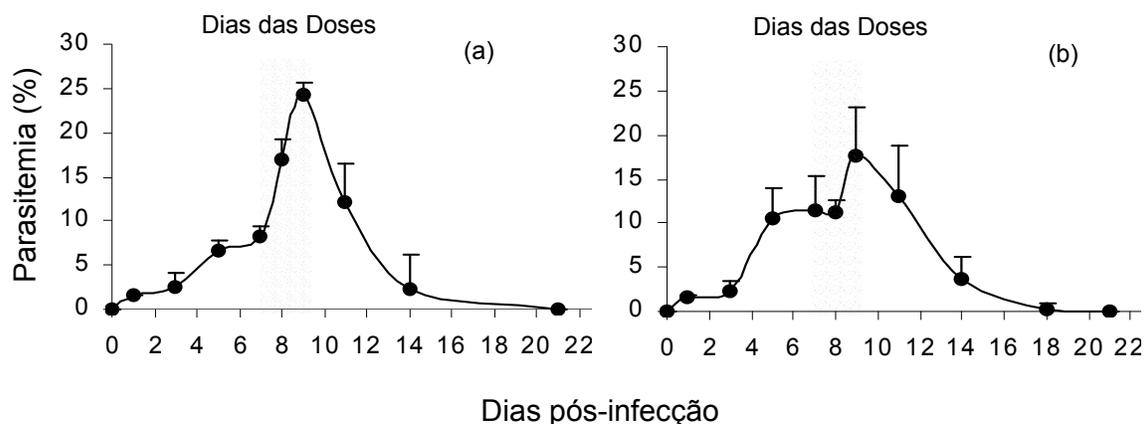


Figura 12. Perfil de infecção de ratos Wistar de 5 semanas infectados pela via i.v. com 10^8 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* obtido após tratamento com quinina pela via oral na dose de 50 mg/kg q4h (a) ($n = 3$) ou q8h (b) ($n = 5$) nos dias 7-9 pós-inoculação (Média \pm D.P.).

Os animais tratados com 50 mg/kg q4h e q8h apresentaram parasitemia máxima de $24,4 \pm 1,3$ % e de $19,5 \pm 3,2$ % no 9° dia pós-inoculação, respectivamente. Após o início do tratamento no 7° dia, o nível parasitêmico dos animais continuou aumentando e o declínio da parasitemia iniciou após o término do

tratamento. A cura completa dos animais pôde ser observada nos dias 14-21 pós-infecção.

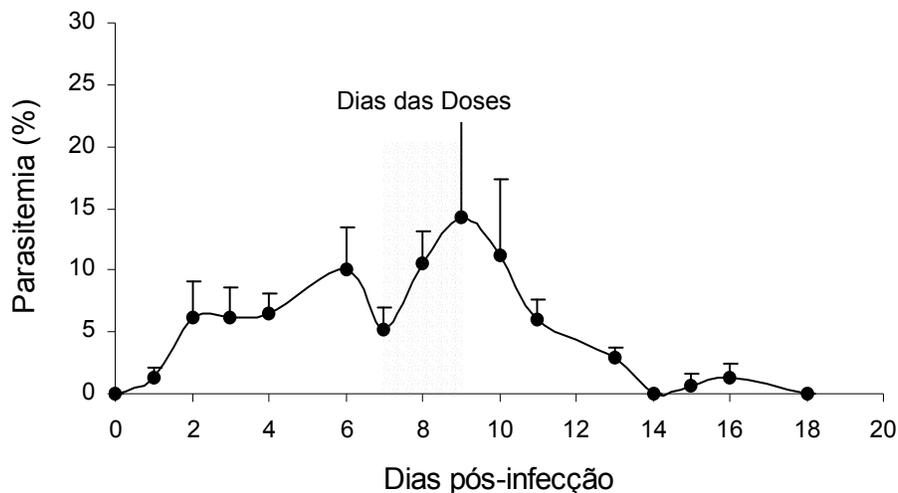


Figura 13. Perfil de infecção de ratos Wistar de 5 semanas infectados pela via i.v. com 10^8 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* obtido após tratamento com quinina pela via oral na dose de 250 mg/kg q8h (n = 6) nos dias 7-9 pós-inoculação (Média \pm D.P.).

Para a dose de 250 mg/kg a q8h, a parasitemia máxima observada no 9º dia ($8,5 \pm 1,4$) foi de $16,0 \pm 8,9$ %. O declínio no nível parasitêmico também iniciou após o término do tratamento e a cura dos animais ocorreu nos dias 15-18 pós-infecção. Apesar da dose ser 5 vezes superior a dose efetiva de 50 mg/kg, não foram observados sintomas visíveis de intoxicação dos animais.

O tratamento efetivo da quinina nas duas maiores doses investigadas apresentou a peculiaridade de que a cura dos animais iniciou após o término da administração da quinina. Esse atraso no início da resposta terapêutica demonstra a menor eficácia da quinina no combate à malária. No tratamento com a cloroquina (Figura 11), logo após o início do tratamento já era observada diminuição nos níveis de parasitas circulantes. Esses resultados são coerentes com os descritos na literatura, que descrevem que a quinina como agente supressivo e, ao mesmo tempo terapêutico, é mais tóxica e menos eficaz do que a cloroquina (TRACY e

WEBSTER, 1996). Atribui-se essas diferenças às características de basicidade dos dois fármacos. Foley e Tilley (1997) sugerem que, estando em sua forma diprotonada, a cloroquina possui maior acúmulo no vacúolo parasitóforo do *Plasmodium* quando comparada a quinina que apresenta-se na forma monoprotônica nas condições fisiológicas.

5.4. Validação da Metodologia Analítica por CLAE

A validação de um método analítico é definida como sendo um processo através do qual estudos de laboratório são utilizados para garantir que o método em questão atenda às exigências desejadas (BRITAIN, 1998). A validação é realizada para garantir que o método seja exato, específico e reprodutível, assegurando credibilidade durante seu uso rotineiro (FDA, 2001).

A quantificação da quinina em amostras biológicas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia utilizada foi adaptada da descrita na literatura por Mirghani e colaboradores (1998). O equipamento de CLAE, as características da coluna cromatográfica e o processamento das amostras foram modificados para adaptação às condições laboratoriais disponíveis.

A metodologia analítica por CLAE para amostras de plasma foi validada através da repetibilidade e precisão intermediária, exatidão, linearidade e limite de quantificação. Para dialisado, foram avaliados os parâmetros de performance analítica como repetibilidade, exatidão, linearidade e limite de quantificação do método.

5.4.1. Validação da Metodologia Analítica por CLAE para Plasma

Os cromatogramas obtidos por CLAE da quinina em plasma de ratos podem ser observados na Figura 14. O tempo de retenção do fármaco foi de aproximadamente 11,1 min, corroborando com o tempo de retenção observado por Mirghani e colaboradores (1998) que foi de aproximadamente 11,6 min.

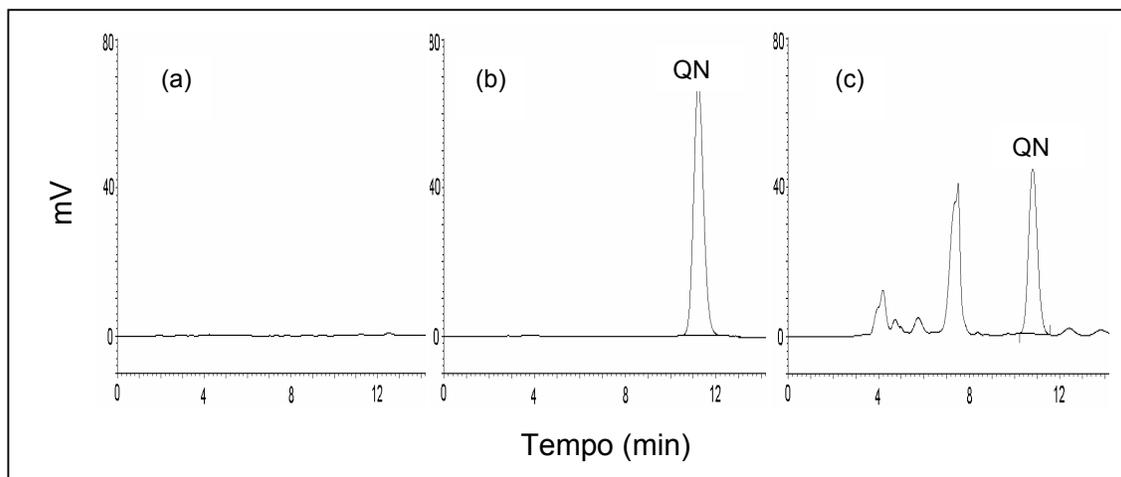


Figura 14. Cromatogramas obtidos por CLAE para a quinina em amostras de plasma de rato: a) branco de plasma; b) amostra da curva padrão na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$; c) amostra de plasma de rato obtida experimentalmente determinada como sendo 2,6 $\mu\text{g/mL}$.

A seletividade de um método analítico é considerada como a capacidade do método diferenciar e quantificar o analito em presença de outros componentes presentes na amostra (FDA, 2001). A seletividade do método pode ser observada na Figura 14 comparando-se o cromatograma do branco de plasma (a) com os cromatogramas (b) e (c). Não foram observados picos interferentes nas amostras analisadas.

Os potenciais interferentes nas matrizes biológicas incluem componentes endógenos da matriz, metabólitos, produtos de degradação, medicações concomitantes e outros xenobióticos exógenos (FDA, 2001). Os picos adicionais ao

pico da quinina observados na Figura 14 (c) referem-se aos metabólitos do fármaco, principalmente à 3-hidroxiquinina, conforme descrito por Mirghani e colaboradores (1998).

5.4.1.1. Precisão

A precisão do método analítico representa a concordância de uma série de medidas, resultantes da aplicação repetida do método a amostras homogêneas. A precisão pode ser avaliada pela repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade é a medida em função dos valores encontrados através de várias reproduções do método, nas mesmas condições, em curto intervalo de tempo. A precisão intermediária expressa o efeito de variações do método em diferentes dias, analistas e equipamentos. A reprodutibilidade se refere aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratório (FDA, 2001). A precisão deve ser investigada usando um mínimo de cinco determinações de, no mínimo, três concentrações diferentes.

A precisão do método para amostras de plasma foi avaliada através dos coeficientes de variação intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária), determinados em triplicata pela análise de três concentrações (controles de qualidade) a cada dia, durante três dias consecutivos. Os resultados da precisão podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6. Desvios padrão relativos intradia e interdia das três amostras de controle de qualidade utilizadas para a curva padrão da quinina em plasma de ratos.

Quinina ($\mu\text{g/mL}$)	Dia 1 (D.P.R.) ^a	Dia 2 (D.P.R.) ^a	Dia 3 (D.P.R.) ^a	Interdia (D.P.R.) ^b
0,9	4,37	2,63	1,20	3,82
7,5	3,71	2,98	0,70	2,88
10,0	6,17	4,98	0,72	4,19

^a Valores para n = 3 determinações

^b Valores para n = 9 determinações

D.P.R.: Desvio Padrão Relativo

Os coeficientes de variação intradia e interdias devem apresentar valores inferiores a 15 % para cada concentração, exceto para o menor limite de quantificação, que deve ser inferior a 20 % (FDA, 2001). Os valores encontrados estão de acordo com a especificação, demonstrando que o método possui repetibilidade quando executado mais de uma vez no mesmo dia e sua análise é precisa quando feita em diferentes dias.

5.4.1.2. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência (FDA, 2001). A exatidão do método foi avaliada pela análise em triplicata, por três dias consecutivos, de três concentrações diferentes de quinina.

Através dos resultados apresentados na Tabela 7, conclui-se que o método é exato, indicando que as concentrações determinadas estão próximas aos valores teóricos esperados.

Tabela 7. Exatidão das amostras de controle de qualidade utilizadas para a curva padrão da quinina em plasma de ratos.

Quinina ($\mu\text{g/mL}$)	Média ($\mu\text{g/mL}$)^a	D. P. ($\mu\text{g/mL}$)^a	Exatidão (%)^a
0,9	0,92	0,03	101,76
7,5	7,59	0,22	101,15
10,0	9,92	0,42	99,23

^a Valores para n = 9 determinações
D.P. = Desvio Padrão

5.4.1.3. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação.

A linearidade do método analítico foi avaliada através de sete níveis de concentração. Foram obtidas nove curvas padrão com faixa de concentração entre 0,1 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, em três diferentes dias. Foram determinados a inclinação, a intersecção e o coeficiente de correlação.

A curva padrão média resultante das nove curvas padrão em plasma de ratos utilizadas para a validação da metodologia analítica por CLAE, está representada na Figura 15 com a equação da reta de regressão linear e o valor do coeficiente de correlação correspondente.

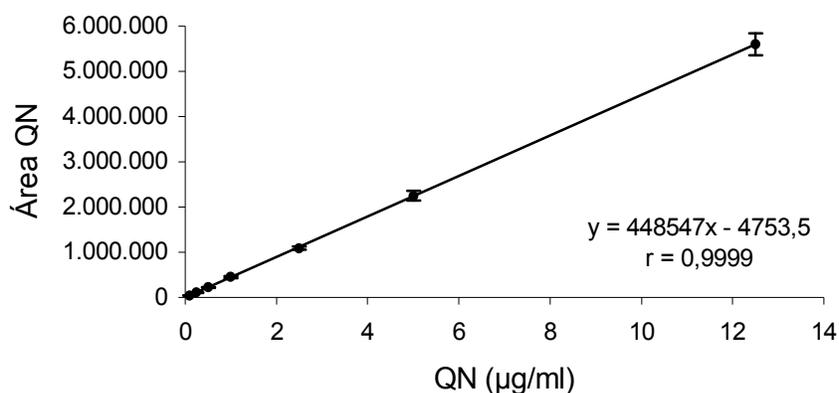


Figura 15. Curva padrão média da quinina em plasma de ratos determinada por CLAE (Média \pm D.P.).

Os coeficientes de correlação, intercepto e inclinação de cada uma das nove curvas utilizadas para a validação podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros das curvas padrão utilizadas na validação de metodologia analítica para quantificação da quinina em plasma de rato por CLAE.

		Inclinação	Intercepto	Correlação
Dia 1	Curva 1	445718,02	4294,69	1,0000
	Curva 2	430568,44	-682,56	1,0000
	Curva 3	445313,47	-3780,96	1,0000
Dia 2	Curva 4	479345,96	-14474,34	0,9999
	Curva 5	482512,02	-7004,33	0,9999
	Curva 6	446099,68	-6139,59	0,9998
Dia 3	Curva 7	442088,72	-5584,92	1,0000
	Curva 8	435914,03	-4446,29	1,0000
	Curva 9	429360,33	-4962,97	1,0000
Média (n = 9)		448546,74	-4753,47	0,9999
Desvio Padrão		19427,12	5021,20	0,0001
D.P.R. ^a		4,33		

^aD.P.R.: Desvio Padrão Relativo.

Considerando 0,95 como sendo o menor valor aceitável de correlação (FDA, 2001), observa-se na Tabela 8 a linearidade funcional entre a concentração da quinina e área do pico do fármaco obtida.

Como a linearidade está relacionada com a variação da inclinação da linha de regressão, também procedeu-se a avaliação da linearidade da curva padrão através da análise de variância (ANOVA) demonstrada na Tabela 9. O resultado evidencia a regressão linear significativa para as curvas padrão, sem desvio significativo da linearidade.

Tabela 9. Análise de variância para a linearidade das curvas padrão de quinina em plasma de rato quantificada por CLAE.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Variância	F
ENTRE	6	$2,18 \times 10^{14}$	$3,64 \times 10^{13}$	3141,99*
Regressão Linear	1	$2,18 \times 10^{14}$	$2,18 \times 10^{14}$	18850,87*
Desvio da Linearidade	5	$1,25 \times 10^{10}$	$2,50 \times 10^9$	0,216
RESÍDUO	56	$6,49 \times 10^{11}$	$1,16 \times 10^{10}$	
TOTAL	62	$2,19 \times 10^{14}$	$3,53 \times 10^{12}$	

* Significativo para $p < 0,05$ (F tabelado: 2,65).

5.4.1.4. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a concentração mais baixa da substância em análise que pode ser quantificada através da metodologia, apresentando exatidão e precisão satisfatória. Para o LQ a variação máxima aceita é de 20 % (FDA, 2001).

O LQ foi determinado pelo método visual analisando amostras de concentrações decrescentes. O valor encontrado para LQ foi de 0,1 µg/mL onde observou-se uma variação intradia de 8,54, 4,26 e 5,36 % e interdia de 9,96 %.

5.4.2. Validação da Metodologia Analítica por CLAE para Dialisado

Para amostras de dialisado foi realizada validação simplificada do método analítico considerando-se que a validação do método em matriz mais complexa (plasma) já havia sido previamente realizada utilizando condições cromatográficas semelhantes.

Na Figura 16 podem ser observados os cromatogramas da quinina em solução de Ringer obtidos por CLAE. O tempo de retenção do fármaco foi de aproximadamente 10,5 min, não diferindo, em média, do valor encontrado para as amostras de plasma.

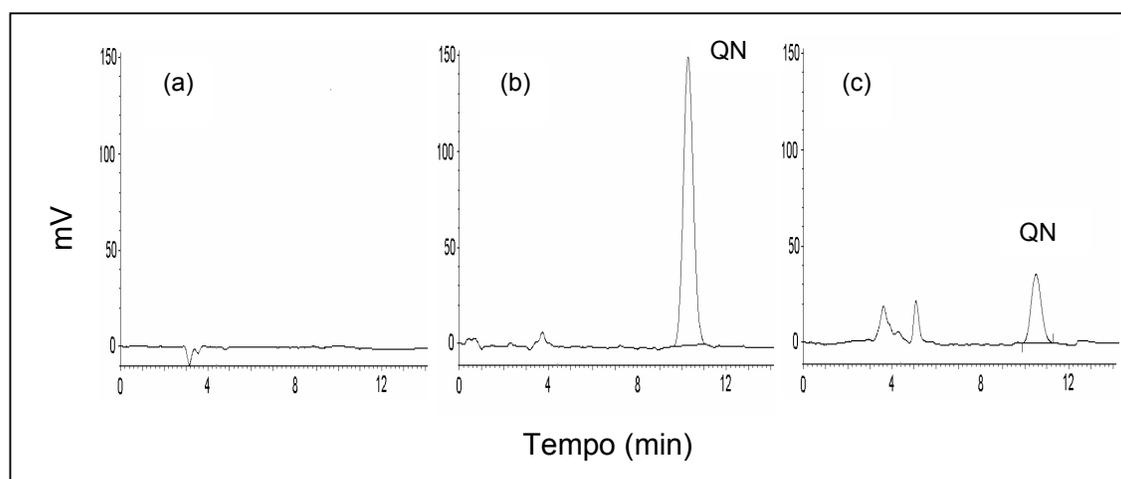


Figura 16. Cromatogramas obtidos por CLAE para a quinina em solução de Ringer: a) branco em solução de Ringer; b) amostra da curva padrão na concentração de 100 ng/mL; c) amostra de dialisado de músculo de rato sadio determinada como sendo 24,3 ng/mL.

Como observado para amostras de plasma, a seletividade do método para dialisado pode ser certificada pela ausência de picos interferentes no tempo de retenção correspondente ao pico da quinina (Figura 16).

5.4.2.1. Precisão

A precisão do método para amostras de dialisado foi avaliada pelo coeficiente de variação intradia (repetibilidade), determinado em triplicata pela análise de três diferentes concentrações. Na Tabela 10 encontram-se os resultados da repetibilidade do método.

Tabela 10. Concentrações das três amostras de controle de qualidade obtidas na validação simplificada do método para amostras de quinina em solução de Ringer.

Quinina (ng/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média ^a	D.P.R. ^a
17,0	17,1	17,4	16,4	17,0	2,93
75,0	73,0	78,6	80,7	77,4	5,09
375,0	378,4	378,6	374,8	377,3	0,57

^a Valores para n = 3 determinações
D.P.R.: Desvio Padrão Relativo

Os coeficientes de variação intradia apresentaram valores inferior a 15 % ao longo da curva padrão, estando de acordo com a especificação (FDA, 2001), demonstrando a repetibilidade do método.

5.4.2.2. Exatidão

A exatidão do método analítico para dialisado pode ser visualizada na Tabela 11 onde pode se observar o alto grau de concordância entre os resultados individuais e os valores aceitos como referência.

Tabela 11. Exatidão das amostras de controle de qualidade utilizadas para a curva padrão da quinina em solução de Ringer.

Quinina (ng/mL)	Faixa de Concentração (ng/mL)	Média ± Desvio Padrão (ng/mL) ^a	Exatidão (%) ^a
17,0	16,4 – 17,4	17,0 ± 0,50	99,97
75,0	73,0 – 80,7	77,4 ± 3,94	103,26
375,0	374,8 – 378,6	377,3 ± 2,15	100,60

^a Valores para n = 3 determinações

5.4.2.3. Linearidade

A linearidade das curvas padrão em solução de Ringer foi avaliada através de seis níveis de concentração (10; 25; 50; 100; 250 e 500 ng/mL). Foram obtidas três curvas padrão determinando-se a inclinação, a intersecção e o coeficiente de correlação.

Na Figura 17 pode se visualizada a curva padrão média em solução de Ringer resultante da validação da metodologia, juntamente com a equação da reta e o valor do coeficiente de correlação correspondente.

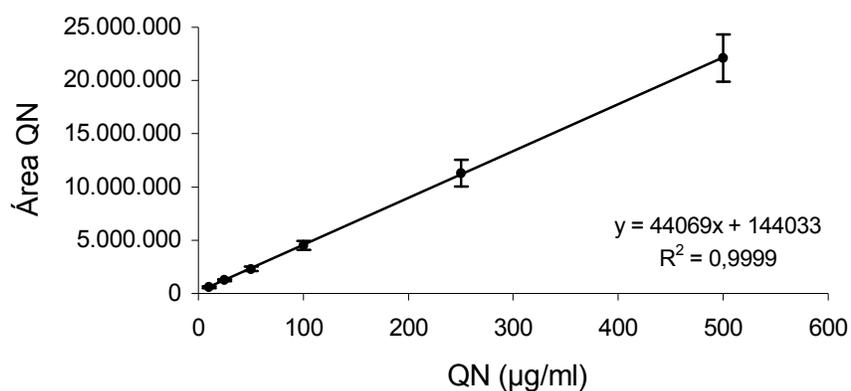


Figura 17. Curva padrão média da quinina em solução de Ringer obtida por CLAE (Média ± D.P.).

Na Tabela 12 podem ser observados os coeficientes de correlação, intercepto e inclinação de cada uma das três curvas padrão utilizadas para a validação.

Tabela 12. Parâmetros das curvas padrão utilizadas na validação da quantificação de quinina em solução de Ringer por CLAE.

		Inclinação	Intercepto	Correlação
Dia 1	Curva 1	38672,63	191453,74	1,0000
	Curva 2	46305,80	205190,32	1,0000
	Curva 3	47229,85	35455,86	0,9998
Média (n = 9)		44069,42	144033,31	0,9999
Desvio Padrão		4696,55	94281,33	0,0001
D.P.R ^a		10,66	65,46	

^aD.P.R.: Desvio Padrão Relativo

A linearidade entre a concentração da quinina e área do pico do fármaco pode ser observada na Tabela 12, onde nenhum valor de correlação foi inferior a 0,95 (FDA, 2001).

A análise de variância (ANOVA) para a avaliação da linearidade das curvas padrão de quinina em solução de Ringer pode ser visualizada na Tabela 13. O resultado evidencia a regressão linear significativa, sem desvio significativo da linearidade.

Tabela 13. Análise de variância para a linearidade das curvas padrão de quinina em solução de Ringer determinadas por CLAE.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Variância	F
ENTRE	5	$1,05 \times 10^{15}$	$2,10 \times 10^{14}$	183,37*
Regressão Linear	1	$1,05 \times 10^{15}$	$1,05 \times 10^{15}$	916,15*
Desvio da Linearidade	4	$9,38 \times 10^{10}$	$2,33 \times 10^{10}$	0,020
RESÍDUO	12	$1,37 \times 10^{13}$	$1,14 \times 10^{12}$	
TOTAL	17	$1,06 \times 10^{15}$	$6,25 \times 10^{13}$	

* Significativo para $p < 0,05$ (F tabelado: 3,89)

5.4.2.4. Limite de Quantificação

O limite de quantificação obtido pelo método visual para amostras de dialisado foi de 10 ng/mL com variações intradia inferiores a 20 %, como preconizado pelo FDA (2001).

Baseado nos resultados obtidos dos parâmetros de performance analíticos avaliados, o método proposto para quantificação de quinina em plasma de ratos e em dialisado de tecido foi considerado validado conforme as especificações e normas estabelecidas no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos (FDA, 2001).

5.5. Teste de Estabilidade das Amostras Biológicas

A estabilidade de substâncias em fluidos biológicos depende das condições de estocagem, propriedades químicas da substância e da matriz biológica onde se encontra, além do material de acondicionamento. A estabilidade de muitos analitos em uma matriz biológica particular não pode ser extrapolada para outras matrizes e sistemas de estocagem (FDA, 2001).

Após a coleta, as amostras de plasma de rato e dialisado de tecido permaneceram em freezer até o momento das análises. Considerando a possibilidade de degradação das mesmas sob estas condições, investigou-se a integridade das amostras sob armazenamento.

Para os experimentos de teste da estabilidade nas condições laboratoriais foram utilizadas amostras de plasma e dialisado contendo 5 µg/mL e 100 ng/mL de quinina, respectivamente, acondicionadas em tubos de reação e mantidas em freezer a -20 °C. A quantificação da quinina por CLAE nas matrizes biológicas foi realizada após descongelamento das amostras em diferentes dias. No perfil cromatográfico, foi avaliada a existência de picos adicionais, bem como a concentração de quinina obtida nos diferentes dias de análise frente à concentração no momento de preparo das amostras.

A estabilidade da quinina em plasma e dialisado foi avaliada por 119 e 85 dias, respectivamente. Os valores de concentração do fármaco e a variação percentual em relação ao tempo zero, obtidos nos dias investigados, estão representados nas Tabelas 14 e 15. Para o cálculo da variação percentual, a concentração observada no dia zero foi considerada como 100 %.

Tabela 14. Concentrações e variação percentual em relação ao dia zero das amostras de quinina em plasma de ratos analisadas em diferentes dias após estocagem em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dia	Concentração Medida ($\mu\text{g/mL}$)	Varição Percentual em relação ao dia zero
0	5,38	-
6	5,67	+ 5,4
8	4,95	- 8,1
21	5,63	+ 4,6
23	5,38	0,0
48	5,54	+ 2,9
57	5,30	- 1,6
76	5,14	- 4,5
91	5,77	+ 7,2
96	5,61	+ 4,3
119	5,65	+ 5,0

Tabela 15. Concentrações e variação percentual em relação ao dia zero das amostras de quinina em solução de Ringer analisadas em diferentes dias após estocagem em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dia	Concentração Medida (ng/mL)	Varição Percentual em relação ao dia zero
0	99,76	-
9	100,00	+ 0,2
15	100,00	+ 0,2
23	103,06	+ 3,3
29	100,21	+ 0,4
34	98,26	- 1,5
36	98,00	- 1,8
43	97,00	- 2,8
47	100,53	+ 0,8
56	96,62	- 3,1
72	105,13	+ 5,4
85	102,63	+ 2,9

Frente aos resultados obtidos, as amostras foram consideradas estáveis no período sob investigação. As amostras provenientes dos animais foram quantificadas dentro do prazo estabelecido por este estudo, ou seja, em período não superior a 119 dias para plasma e 85 dias para dialisado.

5.6. Ligação da Quinina às Proteínas Plasmáticas

A concentração total de fármacos no sangue ou plasma é freqüentemente usada como referência para ajuste de doses, mesmo considerando que a fração livre melhor correlacione-se com os efeitos farmacológicos. Isso se deve à maior facilidade para determinar concentração plasmática total de fármacos e também porque a taxa de ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas usualmente é constante, independente da concentração total do fármaco. No entanto, a relação entre a concentração livre e total plasmática para certos fármacos pode apresentar variações interindividuais, alterações devido a interações medicamentosas ou disfunções patológicas (MACKICHAN, 1992). Para investigar se as disfunções metabólicas provocadas pela malária provocariam alterações na ligação da quinina às proteínas plasmáticas de ratos, avaliou-se a fração livre do fármaco em animais saudáveis e infectados utilizando-se a técnica de ultrafiltração.

Mansor e colaboradores (1991), utilizando a técnica de diálise e investigando as temperaturas de 19, 30, 37 e 44 °C, sugeriram que não exista influência da temperatura na ligação da quinina às proteínas plasmáticas nas concentrações de 1 e 5 µg/mL. No entanto, como as concentrações que se pretendiam investigar neste trabalho seriam superiores às estudadas por estes autores, e, considerando as possíveis alterações provocadas pela temperatura na ligação de fármacos às proteínas (KWONG, 1985; MACKICHAN, 1992; SHARGEL e YU, 1993), optou-se pela padronização dos experimentos com incubação prévia de 10 min a 37 °C e temperatura de centrifugação de 25 °C, conforme realizado por Watari e colaboradores (1989).

Inicialmente, foi investigada a afinidade da quinina pela membrana do dispositivo de filtração, utilizando-se soluções aquosas do fármaco nas concentrações de 0,5 a 10 µg/mL. A taxa de aderência da quinina ao dispositivo de ultrafiltração não foi dose dependente e apresentou valor médio de $14,0 \pm 4,5$ %. Considerando-se esta taxa elevada, este valor foi utilizado para correção dos resultados de ligação às proteínas, somando-se a quantidade retida no filtro à fração livre determinada.

A ligação da quinina às proteínas plasmáticas foi investigada na faixa de concentração de 0,5 a 10 µg/mL contemplando os níveis plasmáticos esperados para a quinina quando administrada nas doses e vias testadas nos experimentos farmacocinéticos. A concentração de 0,5 µg/mL resultou em uma concentração livre abaixo do limite de quantificação do método analítico, não sendo, portanto, incluída no conjunto dos resultados.

A ligação da quinina às proteínas plasmáticas para os grupos de animais sadios, com baixa e alta parasitemia pode ser visualizada na Figura 18. Na Tabela 16 podem ser visualizadas os parâmetros das curvas de fração livre *versus* concentração de quinina determinados com o auxílio do programa Excel® v. 7.0.

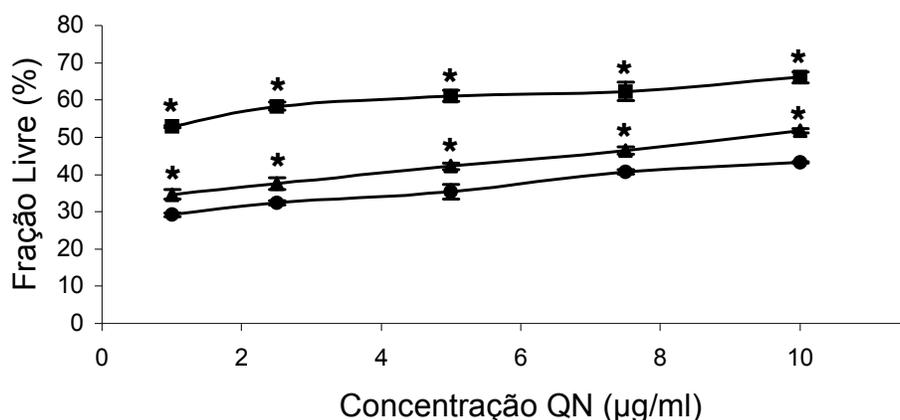


Figura 18. Ligação da quinina às proteínas plasmáticas em ratos sadios (●) e infectados por *Plasmodium berghei* com baixa parasitemia (▲) e com alta parasitemia (■) (Média ± D.P.).

* Significativamente diferente do grupo sadio, $\alpha = 0,05$.

Tabela 16. Parâmetros da avaliação matemática das curvas de ligação da quinina às proteínas plasmáticas em ratos saudáveis e infectados por *Plasmodium berghei* com diferentes níveis de parasitemia.

Parâmetros da Retas	Ratos Saudáveis	Ratos com Baixa Parasitemia (11,1 ± 2,0 %)	Ratos com Alta Parasitemia (34,8 ± 3,4 %)
Intercepto	27,92	32,73	53,44
Inclinação	1,59	1,88	1,29
Correlação	0,9937	0,9995	0,9559

Conforme já relatado para vários fármacos, na Figura 18 pode-se visualizar a dependência da ligação da quinina às proteínas plasmáticas em relação a sua concentração total, para os três grupos sob investigação. O resultado obtido é diverso do observado por Watari e colaboradores (1989) que, utilizando técnica e condições similares, concluíram que a quinina liga-se às proteínas do plasma independentemente da concentração. No entanto, os autores utilizaram plasma de animais adultos e sabe-se que a idade influencia as características e a extensão da ligação de fármacos às proteínas (VARÓN, PASTOR e RODRÍGUEZ, 2005). Como no presente estudo foram utilizados ratos jovens, esta diferença experimental poderia explicar a disparidade dos resultados obtidos.

Na Figura 18 pode-se observar, também, que a fração livre plasmática da quinina nos animais infectados por *Plasmodium berghei* foi significativamente maior que a fração livre nos animais saudáveis para todas as níveis de concentração avaliados ($\alpha = 0,05$).

Para os ratos saudáveis, a fração livre variou de $29,2 \pm 0,4$ % para a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ para $43,3 \pm 0,2$ % para a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. No trabalho de Mansor e colaboradores (1991), a porcentagem plasmática livre de quinina foi de aproximadamente 21 % para a concentração de 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$, em plasma de ratos saudáveis. No entanto, sabe-se que a técnica de diálise utilizada no trabalho referenciado provoca concentrações ligadas superiores às observadas na

técnica de ultrafiltração (MACKICHAN, 1992). Esta observação justificaria a diferença observada. Além disso, a técnica de ultrafiltração é mais recomendada como técnica de determinação da ligação às proteínas plasmáticas de fármacos que exibem ligação concentração dependente, como observado neste trabalho, pois não apresenta o fator de diluição associado à técnica de diálise (MACKICHAN, 1992).

Os valores da fração livre de quinina obtidos para ratos com baixa parasitemia foram de $34,6 \pm 1,2$ % a $51,7 \pm 0,5$ % para a menor e maior concentração investigada, respectivamente. No entanto, a diferença observada neste grupo de animais em relação aos animais sadios, apesar de estatisticamente significativa para todas as concentrações investigadas ($\alpha = 0,05$), não pode ser considerada clinicamente relevante.

Os animais com alta parasitemia apresentaram fração livre de quinina significativamente maior que a dos animais sadios e com baixa parasitemia. Os níveis de fração livre para animais com alta parasitemia variaram de $52,9 \pm 0,3$ % para a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ até $66,1 \pm 1,4$ % para a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

O relevante aumento da fração livre da quinina observado para os animais com alta parasitemia pode relacionar-se tanto às disfunções hepáticas que causam redução na síntese das proteínas plasmáticas quanto ao acúmulo de inibidores endógenos como a bilirrubina, observadas na malária (MACKICHAN, 1992). A primeira hipótese foi aceita por Affirme e colaboradores (1975)⁶ para justificar o aumento da fração livre da quinidina, isômero da quinina, em pacientes com comprometimento hepático associado ao alcoolismo. No presente trabalho, para investigar se os níveis de albumina se alteraram nos animais infectados em relação aos sadios, a concentração de albumina sérica foi determinada conforme descrito em 5.7.

⁶ AFFIRMES, M., REIDENBERG, M.M. Protein binding of some drugs in plasma from patients with alcoholic liver disease. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 8, p. 267-269, 1975 *apud* KWONG, T.C. Free drug measurements: methodology and clinical significance. *Clinica Chimica Acta*, v. 151, p. 197-216, 1985.

A hipótese de que o acúmulo de bilirrubina aumentaria a fração livre da quinina circulante baseia-se nas características de ligação deste pigmento à albumina. A bilirrubina é o principal produto metabólico do heme da hemoglobina e circula no plasma ligada à albumina (HENRY, 1999). Com o aumento da hemólise durante a infecção malárica, sabe-se que ocorre aumento dos níveis de bilirrubina circulante (BRAGA e FONTES, 2000), podendo ocorrer deslocamento da ligação de substâncias exógenas como os fármacos da ligação com a albumina.

5.7. Determinação da Concentração de Albumina Sérica

A albumina é a proteína mais abundante do plasma, constituindo até dois terços das proteínas plasmáticas totais. A determinação do nível sérico de albumina é um importante indicador da função hepática porque sua síntese é realizada exclusivamente neste órgão (HENRY, 1999).

A quantificação da albumina em ratos foi realizada pelo método do verde de bromocresol. O soro de ratos saudáveis, com baixa e alta parasitemia foi coletado de 4 animais por grupo. O soro de cada rato foi submetido a análises, em triplicata, e o valor médio das três determinações foi utilizado para cálculo da média da concentração de albumina do respectivo grupo, como apresentado na Tabela 17.

Tabela 17. Concentração sérica de albumina em ratos sadios e infectados por *Plasmodium berghei* com baixa e alta parasitemia (n = 3/rato).

Concentração de Albumina Sérica (g/dL)			
Animal	Sadio	Baixa Parasitemia (10,7 ± 1,7 %)	Alta Parasitemia (29,4 ± 5,4 %)
1	5,39 ± 0,49	2,40 ± 0,35	3,17 ± 0,35
2	3,81 ± 0,30	2,40 ± 0,07	3,05 ± 0,42
3	4,61 ± 0,55	2,58 ± 0,18	2,88 ± 0,10
4	3,59 ± 0,47	2,44 ± 0,08	3,03 ± 0,18
Média ± D.P.^b	4,25 ± 0,92	2,55 ± 0,12^a	3,01 ± 0,23^a

^a Diferença significativa em relação aos animais sadios ($\alpha = 0,05$).

^b n = 12 determinações.

A concentração sérica média de albumina obtida para os animais sadios está de acordo com a faixa de concentração descrita na literatura para ratos, que é de 3,96 a 4,39 g/dL (KANEKO *et al.*, 1997).

A análise de variância ($\alpha = 0,05$) mostrou diferença significativa entre os grupos. O teste de Tukey determinou que há uma redução significativa na concentração de albumina sérica dos ratos com baixa (2,55 ± 0,12 g/dL) e alta parasitemia (3,01 ± 0,23 g/dL) em relação aos animais sadios (4,25 ± 0,92 g/dL). Os valores de albumina sérica obtidos para os animais com alta parasitemia não diferiram estatisticamente dos obtidos para os animais com baixa parasitemia ($\alpha = 0,05$). Isso ocorreu porque o acúmulo de hemozoína no fígado e o conseqüente dano causado, não estão relacionados unicamente com o grau de parasitemia, mas dependem também da cronicidade da doença (SRICHAIKUL, 1959 *apud* MANSOR, WARD e EDWARDS, 1991)⁷.

⁷ SRICHAIKUL, T. A study of pigmentation and other changes in the liver in malaria. *American Journal for Tropical Medicine and Hygiene*, v. 8, p. 110-118, 1959 *apud* MANSOR, S.M.; WARD, S.A.; EDWARDS, G. The effect of fever on quinine and quinidine disposition in the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 43, p. 705-708, 1991.

Durante a infecção malárica, podem ocorrer distúrbios da função hepática devido ao acúmulo local de bilirrubina (PATWARI, 1979) e hemozoína, especialmente nas células de Kupffer hepáticas (NOBES, 2002). Usualmente, a destruição extensa ou o comprometimento do tecido hepático resulta em baixos níveis séricos de albumina e, por ser uma proteína de transporte para muitas substâncias endógenas e exógenas (HENRY, 1999), acarreta em diminuição da taxa de ligação de fármacos às proteínas plasmáticas, como previamente demonstrado neste trabalho.

A presença de níveis diminuídos de albumina comprova o dano hepático causado pela infecção malárica. No entanto, o aumento da fração livre dependente do nível de infecção dos ratos observado (Figura 18) não deve estar relacionado somente à diminuição de albumina sérica, uma vez que tanto os animais com baixa quanto os com alta parasitemia apresentaram níveis semelhantes desta proteína. Certamente, outras proteínas sintetizadas nesse órgão, como a glicoproteína α_1 -ácida (AAG), que é o principal sítio de ligação fármacos com características básicas como a quinina (HENRY, 1999) também devem apresentar concentrações séricas diminuídas, justificando a diferença entre a fração livre encontrada nos animais infectados por *Plasmodium berghei* com alta parasitemia em relação aos sadios. O maior acúmulo de bilirrubina no fígado dos animais com alta parasitemia, resultante da maior hemólise esperada neste grupo, poderia explicar a maior fração livre observada. Durante o desenvolvimento da infecção experimental, observou-se que os animais com alta parasitemia apresentaram olhos pronunciadamente esbranquiçados, maior debilidade física e coloração corpórea amarelada. Segundo Henry (1999), estas características estão relacionadas ao aumento excessivo da bilirrubina circulante.

5.8. Avaliação Farmacocinética da Quinina

5.8.1. Perfil Plasmático

A avaliação do perfil plasmático da quinina foi conduzida em ratos jovens saudáveis e em ratos jovens infectados por *Plasmodium berghei* com baixa ($9,9 \pm 2,1$ %) e alta parasitemia ($37,4 \pm 8,7$ %) ($n= 10$ ratos/grupo).

A quinina foi administrada pela via intravenosa na dose de 50 mg/kg a ratos saudáveis. Para a via oral, ratos saudáveis e com dois diferentes níveis de parasitemia receberam a dose de 250 mg/kg por gavagem após jejum de 12 h. A administração intravenosa permitiu que se determinasse a biodisponibilidade da quinina.

Para os experimentos do perfil plasmático da quinina os animais foram previamente anestesiados com carbamato de etila. O anestésico foi utilizado para normalizar as condições experimentais da avaliação do perfil plasmático com os experimentos de microdiálise que, necessariamente, seriam conduzidos em animais sob anestesia.

A dose oral avaliada foi escolhida com base nos estudos farmacodinâmicos realizados. Nestes estudos previamente relatados, foram selecionadas duas doses efetivas no regime terapêutico proposto: 50 e 250 mg/kg. Optou-se pela utilização da dose de 250 mg/kg porque, além de ser efetiva, gerou concentrações plasmáticas quantificáveis por CLAE. Em estudos piloto, amostras de plasma coletadas após administração oral da dose de 50 mg/kg resultaram em concentrações abaixo do limite de quantificação do método analítico.

Após coleta das amostras e análise por CLAE, foram obtidos os perfis de concentração plasmática *versus* tempo individuais e estes dados foram analisados por abordagem não-compartimental e compartimental. Os parâmetros obtidos foram comparados estatisticamente, para as duas abordagens e para os diferentes grupos

experimentais e, após análise de variância, as diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

5.8.1.1. Análise Não-Compartmental

A farmacocinética não-compartmental se baseia na aplicação de critérios estatísticos para a análise das curvas dos níveis plasmáticos, de modo que se obtenham parâmetros representativos das mesmas, sem considerar o conceito de distribuição por “compartimentos”. As curvas de níveis plasmáticos são consideradas como uma lei de probabilidade estatística, em que a variável aleatória é o tempo em que o fármaco permanece no organismo (BERROZPE, LANAO e PLÁ DELFINA, 1997).

Para a administração da quinina pela via intravenosa, o volume administrado não excedeu 1 mL, respeitando o volume preconizado no *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (CCAC, 1993). O perfil médio da concentração plasmática versus tempo obtido após administração intravenosa de quinina na dose de 50 mg/kg a ratos Wistar sadios pode ser visualizado na Figura 19.

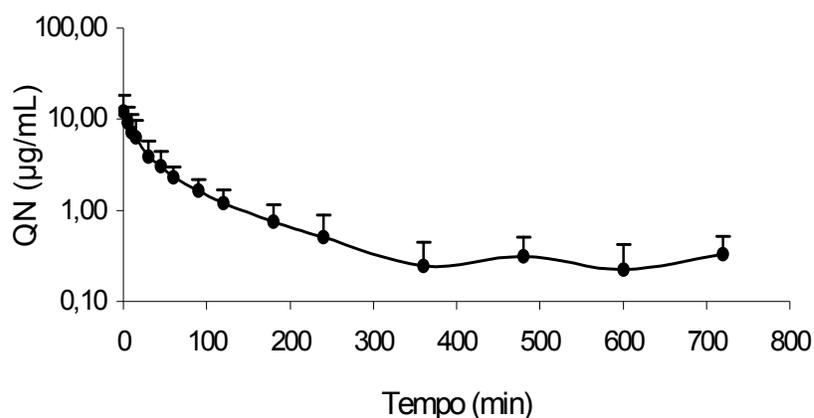


Figura 19. Perfil plasmático médio da quinina administrada na dose de 50 mg/kg pela via intravenosa a ratos Wistar sadios (n = 10) (Média ± D.P.).

A partir dos perfis plasmáticos individuais apresentados no Anexo 2, foram calculados, por abordagem não-compartimental, os parâmetros farmacocinéticos demonstrados na Tabela 18.

Tabela 18. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por análise não-compartimental dos perfis plasmáticos individuais de ratos Wistar que receberam quinina na dose 50 mg/kg pela via intravenosa (n = 10).

Parâmetro Farmacocinético	Média ± D.P.
λ (min^{-1})	$0,004 \pm 0,002$
$t_{1/2}$ (h)	$4,1 \pm 3,1$
$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$)	693 ± 429
$ASMC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$)	198.024 ± 270.552
MRT (h)	$3,5 \pm 2,4$
Cl_{total} ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$5,4 \pm 2,1$
Vd_{ss} ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$15,1 \pm 4,5$

A coleta de amostras por período aproximado de três vezes o valor do $t_{1/2}$ garantiu que a ASC_{ext} não excedesse o valor preconizado de 20 % da $ASC_{0-\infty}$ ($ASC_{\text{ext}} = 10,7 \pm 7,6$ %), garantindo a descrição adequada da fase de eliminação do fármaco (SHARGEL e YU, 1993).

O valor de *clearance* obtido após administração intravenosa de 50 mg/Kg foi de $5,4 \pm 2,1 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, inferior ao relatado por Wanwimolruk e colaboradores (1993) que obtiveram *clearance* de $6,9 \pm 1,6 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ após administração intravenosa de 25 mg/kg de quinina a ratos Wistar adultos sadios. Essa tendência na redução de *clearance* observada nos animais jovens em relação aos adultos sugere que a idade influencia a depuração da quinina, conforme observado em humanos por Wanwimolruk e colaboradores (1991).

O volume de distribuição obtido ($15,1 \pm 4,5 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$) foi superior aos previamente relatados na literatura, que apresentavam valores na ordem de $7,0 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$ (WATARI, WAKAMATSU e KANENIWA, 1989; WANWIMOLRUK *et al.*,

1993). Devido à ligação da quinina às proteínas plasmáticas em animais jovens ser concentração-dependente, conforme relatado no item 5.6, a maior dose avaliada neste trabalho (50 mg/kg) em relação às doses utilizadas por Wanwimolruk e colaboradores (1991) (25 mg/Kg) e Watari e colaboradores (1989) (20 mg/Kg), geraria concentrações plasmáticas totais maiores e, conseqüentemente, as frações livres seriam superiores, resultando em aumento no volume de distribuição.

Em conseqüência do aumento do V_d e redução do Cl_{total} , o tempo de meia-vida ($4,1 \pm 3,1$ h) também apresentou-se superior ao descrito por Wanwimolruk e colaboradores (1993), que relatam o tempo de meia-vida da quinina como sendo $0,8 \pm 0,3$ h após administração i.v. da dose de 25 mg/kg a ratos adultos saudáveis.

Para a via oral, podem ser visualizados na Figura 20 os perfis médios de concentração plasmática *versus* tempo obtidos após administração da dose de 250 mg/kg a ratos saudáveis, com baixa e alta parasitemia.

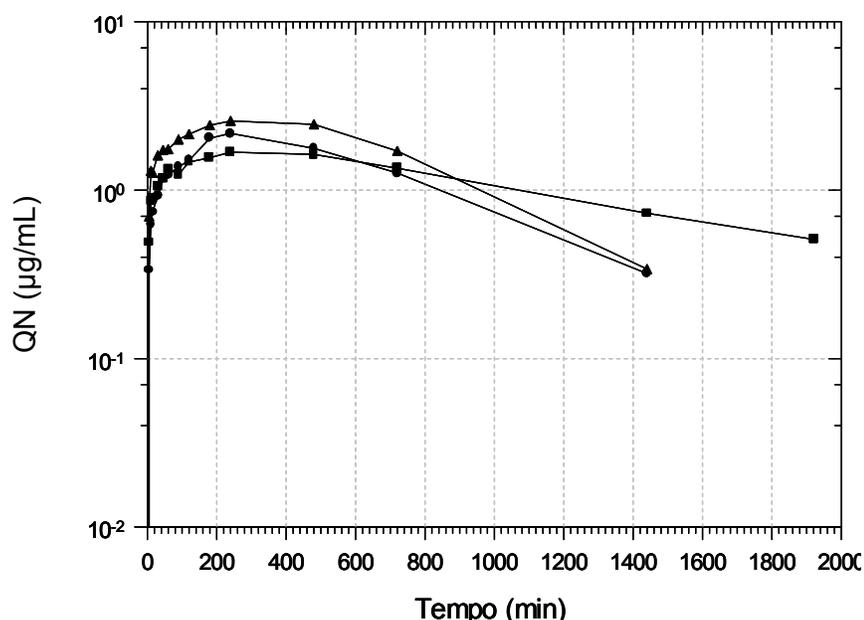


Figura 20. Perfil plasmático médio da quinina administrada na dose de 250 mg/kg pela via oral a ratos saudáveis (●) e infectados por *Plasmodium berghei* com baixa parasitemia (▲) e com alta parasitemia (■) (n = 10 ratos/grupo) (Média \pm D.P.).

Na Figura 20 pode-se visualizar a semelhança entre os perfis dos três grupos investigados, com exceção da inclinação da fase de eliminação para os animais com alta parasitemia, que apresentou-se menos pronunciada.

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos por abordagem não-compartimental para os animais sadios, com baixa e alta parasitemia após administração oral de 250 mg/kg de quinina estão mostrados na Tabela 19. Cabe ressaltar que a grande variabilidade nos perfis plasmáticos da quinina conduziram a elevados valores de desvios padrão nos parâmetros farmacocinéticos determinados. Essa variabilidade elevada já havia sido previamente relatada para a quinina por Newton e colaboradores (1999) e em outros trabalhos apresentados na Tabela 2. Desse modo, a ausência de diferença significativa em muitos parâmetros investigados pode ser atribuída à elevada variação observada.

Tabela 19. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por análise não-compartimental após administração de 250 mg/kg de quinina a ratos sadios e infectados por *Plasmodium berghei* (n = 10 ratos/grupo).

Parâmetro Farmacocinético	Ratos Sadios	Ratos com Baixa Parasitemia (9,9 ± 2,1 %)	Ratos com Alta Parasitemia (37,4 ± 8,7 %)
λ (min ⁻¹)	0,0021 ± 0,0008	0,0023 ± 0,0009	0,0011 ± 0,0004 ^{b,c}
t _{1/2} (h)	6,7 ± 3,3	5,5 ± 2,0	12,3 ± 4,6 ^{b,c}
ASC _{0-∞} (µg.min.mL ⁻¹)	2.002 ± 732 ^a	2.559 ± 1.118	2.600 ± 580
ASMC _{0-∞} (mg.min ² .mL ⁻¹)	1.478 ± 1.027 ^a	1.571 ± 827	3.218 ± 1.658 ^{b,c}
MRT (h)	11,6 ± 3,8	10,0 ± 3,0	19,7 ± 7,1 ^{b,c}
Cl _{total} (L.kg ⁻¹ .h ⁻¹)	4,9 ± 2,0	4,2 ± 2,2	3,5 ± 1,0
F	0,58	-	-

^a Diferença significativa em relação à administração intravenosa ($\alpha = 0,05$)

^b Diferença significativa em relação aos animais sadios ($\alpha = 0,05$)

^c Diferença significativa em relação aos animais com baixa parasitemia ($\alpha = 0,05$)

Na Tabela 19, os valores de *clearance* consideram uma biodisponibilidade (F) de 58 % determinada pela razão entre as ASC médias após administração oral e i.v. a ratos sadios. A biodisponibilidade de 58 % também foi usada para calcular o Cl_{total} para animais infectados, pois, considerando que a quinina é um fármaco de baixa extração hepática (ROY *et al.*, 2002), o efeito de primeira passagem é insignificante (GIBALDI e PERRIER, 1982) e, portanto, não seria influenciado por algum comprometimento hepático devido à infecção malárica. Além disso, não houve diferença significativa na $ASC_{0-\infty}$ entre os três grupos sob investigação após administração oral.

A ASC_{ext} não excedeu o valor preconizado de 20 % da $ASC_{0-\infty}$ para ratos sadios e com baixa parasitemia, obtendo-se valores de $14,7 \pm 11,8$ % e de $7,1 \pm 7,1$ %, respectivamente. No entanto, para animais com alta parasitemia, a ASC_{ext} foi de $24,1 \pm 11,8$ % pois os animais não resistiam a coletas por tempo superior a 32 h e, portanto, não puderam ser coletadas amostras por tempo correspondente ao preconizado, ou seja, pelo menos três $t_{1/2}$ (GIBALDI e PERRIER, 1982; SHARGEL e YU, 1993).

Os parâmetros $t_{1/2}$, MRT e Cl_{total} não diferiram estatisticamente após administração i.v. da dose de 50 mg/kg e administração oral de 250 mg/kg para ratos jovens sadios.

Na análise não-compartimental, o volume de distribuição após administração oral do fármaco é calculado pela multiplicação entre $MRT_{i.v.}$ e Cl_{total} . O tempo de residência médio após administração i.v., no entanto, necessita do conhecimento da constante de velocidade de absorção (k_a) ($MRT_{i.v.} = MRT_{oral} - MAT \therefore MRT_{i.v.} = MRT_{oral} - 1/k_a$) (GIBALDI e PERRIER, 1982; SHARGEL e YU, 1993). No entanto, os perfis plasmáticos obtidos após administração oral da quinina mostraram duplo pico (Anexos 3 a 5), impossibilitando a determinação de k_a pelo método de Wagner-Nelson. Deste modo, o V_d não foi determinado por abordagem não-compartimental, sendo apenas calculado pela análise compartimental, apresentada em 5.8.1.2.

A infecção aguda não alterou nenhum dos parâmetros farmacocinético da quinina, como evidenciado na Tabela 19, em que não se observa diferença significativa entre os parâmetros determinados em animais sadios e com baixa parasitemia.

Sabe-se que o ciclo eritrocítico da malária resulta em severa hemólise das células sanguíneas (WHITE *et al.*, 1982; PIERROT *et al.*, 2003). O material celular resultante da hemólise, os parasitas circulantes e o material gerado pela degradação da hemoglobina pelos parasitas são liberados na circulação e são fagocitados por células como as células de Kupffer hepáticas, que se tornam mais proeminentes durante o processo infeccioso (NOBES, 2002). O depósito das células fagocíticas no fígado causa aumento e provoca mudanças de coloração no órgão. Além disso, a deposição destas células está associada aos distúrbios hepáticos observados durante a infecção malárica (PATWARI, 1979).

Esses distúrbios conduzem a alterações nas enzimas transaminases AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e fosfatase alcalina (PATWARI, 1979). Também provocam diminuição no citocromo P450 hepático e na atividade monoxigenase associada (ALVARES, 1984), diminuindo a metabolização de substâncias como a quinina, que apresenta metabolismo hepático associado ao citocromo P450 (ROY *et al.*, 2002).

Como a quinina é metabolizada pelo fígado (ROY *et al.*, 2002), o comprometimento do órgão poderia resultar em diminuição na taxa de depuração do fármaco, apesar do aumento da fração livre circulante. Observa-se na Tabela 19 uma tendência a diminuição do *clearance* conforme a gravidade da doença. Como previamente discutido, talvez a falta de significância seja consequência da alta variabilidade dos dados experimentais, uma vez que a redução significativa da depuração da quinina, proporcional ao processo infeccioso, já foi descrita previamente na literatura (WHITE *et al.*, 1982; MANSOR, WARD e EDWARDS, 1990; PUSSARD *et al.*, 2003). White e colaboradores (1982) avaliaram o processo infeccioso em humanos e no estudo de Mansor e colaboradores (1990), a avaliação

foi realizada *in vitro*. Pussard e colaboradores (2003) observaram a redução do *clearance* durante a malária experimental em camundongos. Essa redução foi proporcional à redução na concentração dos principais metabólitos da quinina: a 3-hidroxiquinina e 10,11-dihidroxiididroquinina.

A redução do fluxo sanguíneo hepático durante a malária pode ser fator importante na redução do *clearance* de fármacos antimaláricos (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1997). Para a quinina, no entanto, a redução na taxa de depuração parece estar mais associada à debilidade de metabolização via citocromo P450 hepático do que às alterações de fluxo sanguíneo, uma vez que a QN é um fármaco de baixa extração (ROY *et al.*, 2002).

Apesar da maior contribuição do fígado na depuração da quinina, a eliminação do fármaco não é restrita a este órgão. Uma porcentagem de aproximadamente 40 % de sua metabolização está relacionada ao *clearance* sanguíneo (WATARI, WAKAMATSU e KANENIWA, 1989). Com o aumento da fração livre plasmática do fármaco nos ratos infectados (item 5.6), poderia ocorrer um aumento na taxa de depuração plasmática da QN, levando a um aumento do Cl_{total} observado. Como uma tendência de redução do Cl_{total} pode ser observada na Tabela 19, pode se supor que a depuração da quinina esteja sendo influenciada predominantemente pelo *clearance* hepático intrínseco.

A diminuição do *clearance*, mesmo que não significativa, alterou a eliminação do fármaco em animais com alta parasitemia. Conforme visualizado na Figura 20 e Tabela 19, a constante de velocidade de eliminação da quinina diminuiu significativamente e, conseqüentemente, observou-se um aumento significativa no tempo de meia-vida neste grupo de animais em relação aos animais sadios e em relação aos animais com baixa parasitemia. O aumento do $t_{1/2}$ também está relacionado com a alteração do volume de distribuição, que será discutido a seguir.

5.8.1.2. Análise Compartmental

Nos modelos farmacocinéticos compartimentais, o organismo é representado como um sistema de compartimentos ligados entre si. Um compartimento não representa, necessariamente, uma região fisiológica ou anatômica. É considerado como um tecido ou grupo de tecidos que possui similaridade de fluxo sanguíneo e de afinidade pelo fármaco. A utilização de modelos compartimentais permite definir quantitativamente os processos cinéticos de fármacos no organismo através da utilização de equações representativas (SHARGEL e YU, 1993).

Os modelos compartimentais para a análise dos dados foram escolhidos de acordo com o melhor ajuste gráfico, melhor correlação entre os valores experimentais e os valores calculados pelo programa Scientist[®] e pelo maior Critério de Seleção do Modelo (MSC) do programa. O MSC representa a adequação do modelo proposto para descrever os dados experimentais, sendo que, quanto maior o valor obtido, maior a correlação entre os valores experimentais e os valores calculados pelo modelo farmacocinético. Para a modelagem dos dados, foram testados modelos de 1 e 2 compartimentos para via oral e 1, 2 e 3 compartimentos para a via intravenosa.

Após administração intravenosa de 50 mg/kg de quinina a ratos Wistar sadios, os valores experimentais apresentaram melhor ajuste para o modelo de 2 compartimentos abertos descrito pela Equação 14 (GIBALDI e PERRIER, 1982).

$$C_p = a \cdot e^{-\alpha \cdot t} + b \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad (14)$$

onde C_p é a concentração plasmática total a cada tempo, α e β são as constantes de velocidade da fase de distribuição e de eliminação, respectivamente, e “a” e “b” são os respectivos interceptos no tempo zero.

O modelo de dois compartimentos já havia sido descrito na literatura como sendo adequado para descrever o perfil farmacocinético da quinina em ratos após administração pela via intravenosa (WATARI, WAKAMATSU e KANENIWA, 1989; WANWIMOLRUK *et al.*, 1993).

Para melhor ajustar os dados frente ao modelo de 2 compartimentos, foi atribuído peso 1 aos valores experimentais, obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,9888 para o perfil plasmático médio. A correlação para os perfis individuais variou de 0,9223 a 0,9978. O valor de MSC determinado para o perfil médio foi de 2,60 e para os perfis individuais apresentou variação de - 0,08 a 3,59. A atribuição de peso melhorou o ajuste gráfico, caracterizando melhor a fase de eliminação da quinina.

O perfil plasmático médio modelado pelo programa Scientist[®] para administração i.v. da dose de 50 mg/kg de quinina pode ser visualizado na Figura 21. As curvas individuais de concentração plasmática por tempo podem ser observadas no Anexo 2.

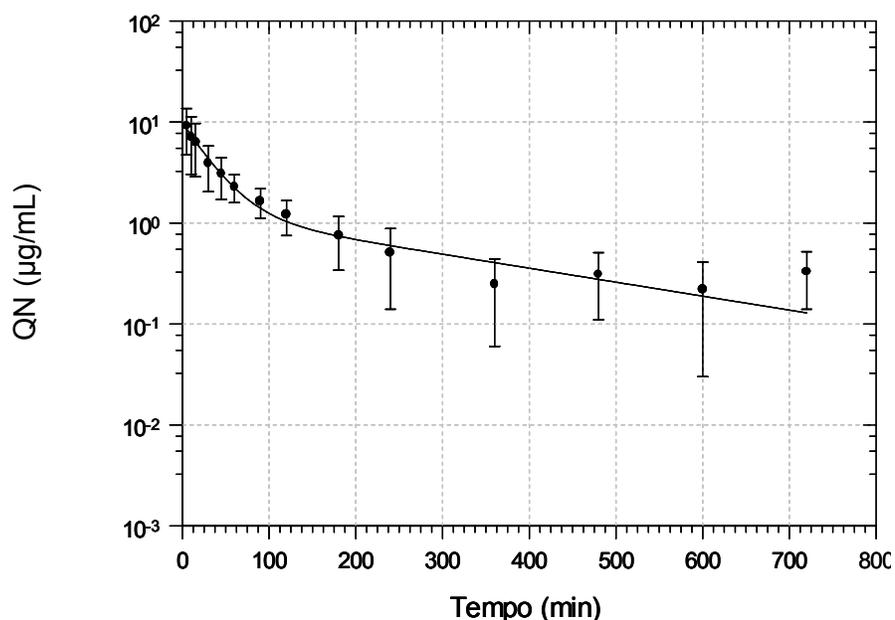


Figura 21. Perfil plasmático médio da quinina administrada pela via i.v. na dose de 50 mg/Kg a ratos Wistar sadios (n = 10) modelado para 2 compartimentos pelo programa Scientist[®] (Média ± D.P.).

Após modelagem dos dados, foram determinadas as microconstantes que descrevem o modelo de 2 compartimentos, com o auxílio do programa Excel, através das Equações 15 a 17 (GIBALDI e PERRIER, 1982):

$$k_{10} = \frac{\alpha \cdot \beta}{k_{21}} \quad (15)$$

$$k_{21} = \frac{(a \cdot \beta) + (b \cdot \alpha)}{(a + b)} \quad (16)$$

$$k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{10} \quad (17)$$

onde k_{10} é a constante de velocidade de eliminação do compartimento central e k_{12} e k_{21} são as constantes de velocidade de distribuição do compartimento central para o periférico e vice-versa, respectivamente.

A partir da determinação das microconstantes, foi determinado MRT, tempo de meia-vida de eliminação ($t_{1/2} \beta$), $ASC_{0-\infty}$, volume de distribuição do compartimento central (V_c), volume de distribuição no *steady state* ($V_{d_{ss}}$), volume de distribuição área ($V_{d_{\text{área}}}$) e *clearance* (Cl_{total}) pelas equações abaixo descritas (GIBALDI e PERRIER, 1982):

$$MRT = \frac{1}{k_e} \quad (18)$$

$$k_e = \frac{k_{10} \cdot k_{21}}{k_{21} + k_{12}} \quad (19)$$

$$t_{1/2\beta} = \frac{0,693}{\beta} \quad (20)$$

$$ASC_{0-\infty} = \frac{a}{\alpha} + \frac{b}{\beta} \quad (21)$$

$$V_c = \frac{D}{a+b} \quad (22)$$

$$Vd_{ss} = \left(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}}\right) \cdot V_c \quad (23)$$

$$Vd_{\text{área}} = \frac{Cl_{\text{total}}}{\beta} \quad (24)$$

$$Cl_{\text{total}} = \frac{D}{ASC_{0-\infty}} \quad (25)$$

Os parâmetros farmacocinéticos determinados na análise compartimental para a administração intravenosa da quinina em ratos sadios podem ser observados na Tabela 20.

Tabela 20. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos da análise compartimental dos dados individuais de concentração plasmática por tempo após administração i.v. de quinina na dose de 50 mg/kg a ratos Wistar sadios (n = 10).

Parâmetro	Média ± D.P.
a ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	10,5 ± 6,8
b ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2,7 ± 1,2
α (min^{-1})	0,0711 ± 0,0421
β (min^{-1})	0,0069 ± 0,0033
k_{21} (min^{-1})	0,0225 ± 0,0143
k_{10} (min^{-1})	0,0225 ± 0,0121
k_{12} (min^{-1})	0,0330 ± 0,0225
MRT (h)	2,3 ± 1,2
$t_{1/2 \beta}$ (h)	2,1 ± 1,2
$\text{ASC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$)	632 ± 369
Vc ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$)	4,9 ± 2,4
Vd _{ss} ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$)	11,6 ± 4,1
Vd _{área} ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$)	15,6 ± 6,4
Cl _{total} ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	5,8 ± 2,2

A comparação entre os parâmetros farmacocinéticos $t_{1/2}$, MRT, $\text{ASC}_{0-\infty}$, Vd_{ss} e Cl_{total} obtidos por análise não-compartimental e compartimental não demonstrou diferença significativa ($\alpha = 0,05$), comprovando a adequabilidade do modelo de 2 compartimentos para descrever os dados de concentração plasmática da quinina após administração intravenosa a ratos Wistar sadios.

Os valores das microconstantes obtidos Watari e colaboradores (1989) foram superiores aos observados neste trabalho. Após administração i.v. de 20 mg/kg de quinina, os autores obtiveram k_{21} , k_{10} e k_{12} de $0,236 \pm 0,045 \text{ min}^{-1}$, $0,0552 \pm 0,0081 \text{ min}^{-1}$ e $0,308 \pm 0,084 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. No entanto, apesar de os autores terem modelado os dados experimentais segundo modelo de 2 compartimentos como realizado neste trabalho, conduziram as coletas de sangue por apenas 60

minutos e, conforme observado nos perfis plasmáticos individuais após administração intravenosa de 50 mg/kg a ratos Wistar (Anexo 2), após este período de tempo observa-se uma mudança na inclinação das curvas. Essas diferenças nos desenhos experimentais podem gerar alterações significativas nos parâmetros avaliados, não permitindo a comparação dos resultados.

Como demonstrado neste trabalho e em trabalhos anteriormente descritos na literatura (WATARI, WAKAMATSU e KANENIWA, 1989; WANWIMOLRUK *et al.*, 1993), após administração pela via intravenosa, a quinina segue modelo de dois compartimentos. No entanto, algumas vezes, após administração por via não-sistêmica, a fase de distribuição de fármacos, que pela via i.v. seguem 2 compartimentos, não é observada (GIBALDI E PERRIER, 1982).

Através da análise dos perfis individuais de concentração plasmática *versus* tempo obtidos experimentalmente após administração oral (Anexos 3 a 5), observa-se um decaimento monoexponencial da fase terminal, caracterizando o modelo de um compartimento. Nesse caso, a fase de distribuição foi mascarada pela lenta absorção do fármaco (SHARGEL e YU, 1999).

Em função do duplo pico observado nos perfis individuais de concentração por tempo (Anexos 3 a 5), o modelo para descrever o comportamento da quinina no organismo após administração oral foi escolhido para contemplar sua ocorrência. O modelo de um compartimento com duas constantes de absorção paralelas descrito por Wagner (1993) (Figura 22) descreveu adequadamente os dados experimentais.

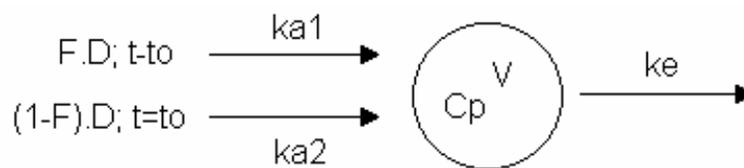


Figura 22. Representação esquemática do modelo farmacocinético de um compartimento com duas constantes de absorção paralelas. Neste modelo, $f \cdot D$ é a fração da dose absorvida com constante de absorção de primeira ordem ka_1 , $(1-f) \cdot D$ é a fração da dose absorvida com constante de absorção de primeira ordem ka_2 a partir do tempo t_0 , C_p é a concentração plasmática e V_d é o volume de distribuição (Wagner, 1993).

A concentração plasmática (C_p) do modelo proposto é descrita pela Equação 26:

$$C_p = \left(\frac{f \cdot F \cdot D}{V_d} \right) \cdot \left(\frac{ka_1}{ka_1 - ke} \right) \cdot (e^{-ke \cdot t} - e^{-ka_1 \cdot t}) + \left(\frac{(1-f) \cdot F \cdot D}{V_d} \right) \cdot \left(\frac{ka_2}{ka_2 - ke} \right) \cdot (e^{-ke \cdot (t-t_0)} - e^{-ka_2 \cdot (t-t_0)}) \quad (26)$$

onde F é a biodisponibilidade, $f \cdot D$ é a fração da dose absorvida com constante de absorção de primeira ordem ka_1 , $(1-f) \cdot D$ é a fração da dose absorvida com constante de absorção de primeira ordem ka_2 a partir do tempo t_0 e V_d o volume de distribuição.

Os perfis plasmáticos médios, modelados pela Equação 26 com o auxílio do programa Scientist[®], obtidos após administração oral da quinina na dose de 250 mg/kg aos animais sadios, com baixa e alta parasitemia podem ser visualizadas nas Figuras 23, 24 e 25, respectivamente. As curvas individuais de concentração plasmática por tempo modeladas podem ser observadas nos Anexos 3, 4 e 5. Para melhor ajustar os dados frente ao modelo, foi atribuído peso 1 aos valores experimentais e na modelagem compartimental, o valor da biodisponibilidade (F) foi fixado em 0,58.

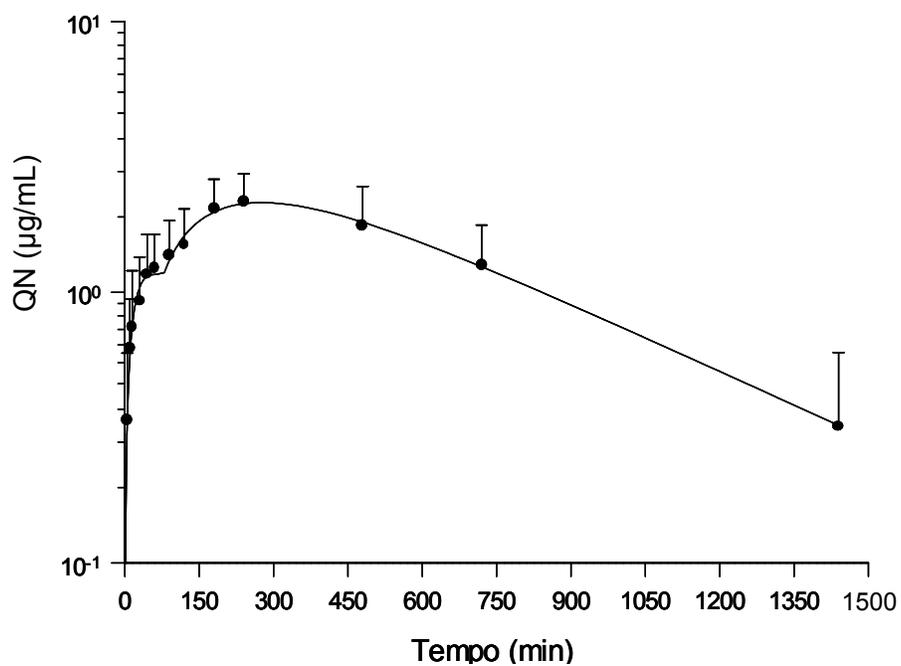


Figura 23. Perfil plasmático médio da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar saudáveis (n = 10) modelado para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas pelo programa Scientist® (Média ± D.P.).

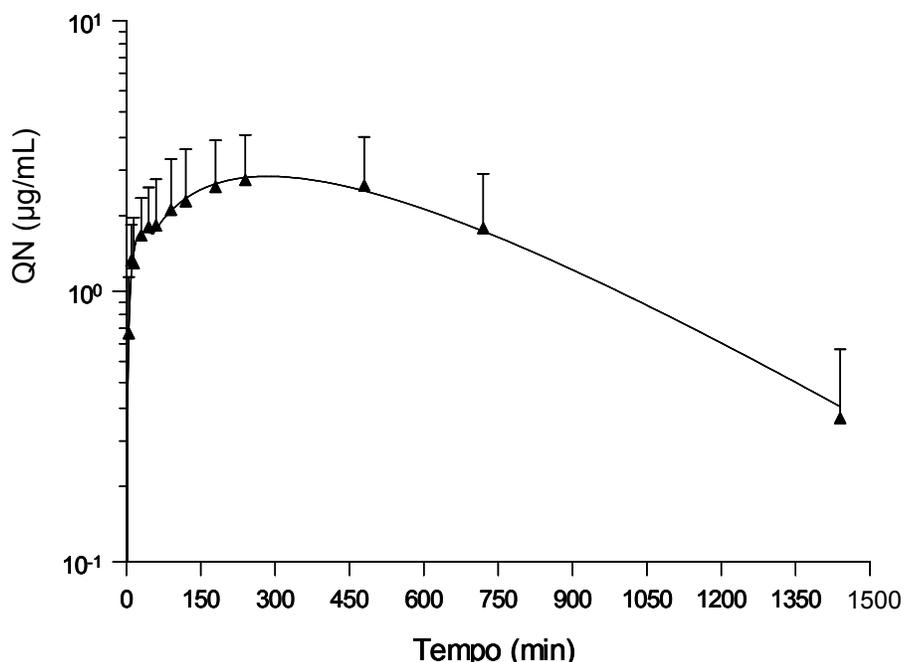


Figura 24. Perfil plasmático médio da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por com baixa parasitemia ($9,9 \pm 2,1$ %) ($n = 10$) modelado para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas pelo programa Scientist[®] (Média \pm D.P.).

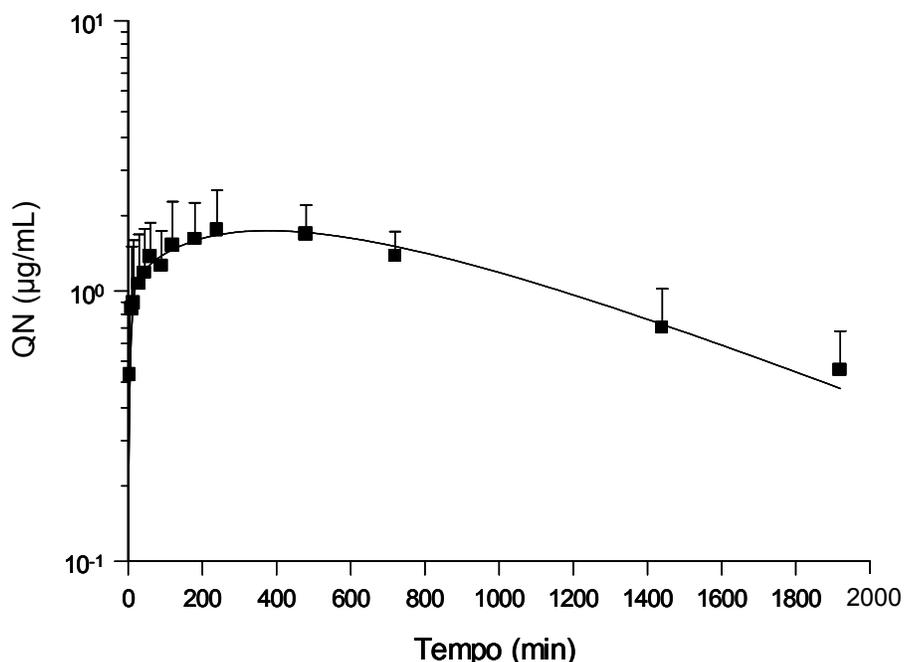


Figura 25. Perfil plasmático médio da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por *P. berghei* com alta parasitemia ($37,4 \pm 8,7$ %) ($n = 10$) modelado para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas pelo programa Scientist[®] (Média \pm D.P.).

Os valores de MSC encontrados para o ajuste dos perfis médios dos animais sadios, com baixa e alta parasitemia foram de 2,9043, 2,9782 e 3,4107, respectivamente, apresentando variações nos perfis individuais entre 0,9078 e 3,0058 para o grupo de ratos sadios, entre 0,3393 e 1,8602 para os animais com baixa parasitemia e entre 0,4042 e 1,2868 para animais com alta parasitemia. A correlação entre os pontos experimentais médios e o perfil calculado pelo programa Scientist® foi de 0,9889, 0,9892 e 0,9901 para animais sadios, com baixa e alta parasitemia, com variações nos perfis individuais entre 0,9669 e 0,9974 para o grupo de ratos sadios, entre 0,9575 e 0,9900 para ratos com baixa parasitemia e entre 0,9694 e 0,9901 para ratos com alta parasitemia.

Os parâmetros farmacocinéticos determinados pela análise compartimental da quinina podem ser observados na Tabela 21. O *clearance* foi estimado pela multiplicação entre Vd e ke.

Tabela 21. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos pela análise compartimental individual dos dados de concentração plasmática por tempo utilizando modelo de 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas após administração oral de 250 mg/kg de quinina a ratos Wistar sadios e infectados por *Plasmodium berghei* com diferentes níveis de parasitemia (n = 10 ratos/grupo).

Parâmetro	Ratos Sadios	Ratos com Baixa Parasitemia (9,9 ± 2,1 %)	Ratos com Alta Parasitemia (37,4 ± 8,7 %)
f	0,58 ± 0,44	0,37 ± 0,16	0,45 ± 0,18
Vd (L.kg ⁻¹)	43,1 ± 24,4	29,0 ± 15,5	53,0 ± 15,2 ^b
ka ₁ (min ⁻¹)	0,0503 ± 0,0481	0,0960 ± 0,0610	0,1085 ± 0,0797
ka ₂ (min ⁻¹)	0,0367 ± 0,0860	0,0078 ± 0,0085 ^c	0,0750 ± 0,1240
ke (min ⁻¹)	0,0024 ± 0,0011	0,0029 ± 0,0010	0,0012 ± 0,0004 ^{a,b}
t ₀ (min)	94,7 ± 52,8	68,6 ± 40,9	139,8 ± 137,2
t _{1/2} (h)	6,0 ± 3,3	5,5 ± 2,2	12,3 ± 4,6 ^{a,b}
Cl _{total} (L.kg ⁻¹ .h ⁻¹)	5,21 ± 2,04	4,61 ± 2,53	3,75 ± 1,09

^a Diferença significativa em relação aos animais sadios ($\alpha = 0,05$)

^b Diferença significativa em relação aos animais com baixa parasitemia ($\alpha = 0,05$)

^c Diferença significativa em relação a ka₁ do respectivo grupo ($\alpha = 0,05$)

A existência de duplo pico nas curvas de concentração plasmática por tempo é relatada na literatura para outros fármacos como cimetidina (WALKENSTEIN, 1978), furosemida (HAMMARLUND, PAALZOW e ODLIND, 1984) e ranitidina (SCHUCK, 2000; YIN, 2003). Os principais mecanismos responsáveis por este fenômeno incluem a recirculação entero-hepática, diferentes locais de absorção do fármaco ao longo do trato gastrointestinal (TGI) e esvaziamento gástrico retardado para uma porção da dose administrada (YIN, 2003).

A hipótese da recirculação entero-hepática não parece plausível para justificar o aparecimento do duplo pico para quinina, uma vez que a fração da dose de quinina excretada na bile é muito pequena (WATARI *et al.*, 1989) e, conseqüentemente, insuficiente para proporcionar o aparecimento do segundo pico. Para que o segundo pico seja evidente no perfil de concentração plasmática, pelo menos 20 % da dose oral administrada deve ser reabsorvida (SUTTLE e BROUWER, 1994). Além disso, o segundo pico devido à recirculação entero-hepática, geralmente, apresenta menor magnitude do que o primeiro pico (BERROZPE, LANA O e PLÁ DELFINA, 1997). Neste trabalho, o segundo pico apresentou magnitude superior à do primeiro pico observado.

As outras duas hipóteses mencionadas, diferentes locais de absorção ao longo do TGI e esvaziamento gástrico retardado para uma porção da dose administrada, poderiam ser adequadas para explicar a ocorrência do duplo pico observado no perfil plasmático da quinina e o modelo da Figura 22 é adequado para descrever ambas. No modelo proposto, a absorção no TGI com duas constantes de velocidade diferentes, não implica, necessariamente, em diferentes locais de absorção ao longo do percurso. A absorção com constante de velocidade ka_1 pode ocorrer, por exemplo, no intestino delgado, quando a maior fração da dose encontra-se não absorvida no estômago e uma menor fração passou para o intestino; a absorção com constante de velocidade ka_2 pode ocorrer no mesmo local do intestino delgado, após uma maior fração da dose ter passado para este. Nesse caso, t_0 seria o tempo para o esvaziamento gástrico (WAGNER, 1993).

Considerando que ka_1 e ka_2 não foram significativamente diferentes quando comparadas no mesmo grupo, exceto para o grupo com baixa parasitemia (Tabela 21), a hipótese de duas constantes paralelas de absorção no mesmo sítio parece a mais plausível para explicar os perfis observados experimentalmente. Além disso, a fração absorvida até t_0 (f) coincide com os valores da literatura que indicam que, após aproximadamente 2 h, 48 % do conteúdo gástrico é esvaziado para a porção subsequente do trato gastrintestinal de ratos Wistar jovens (ZUCOLOTO *et al.*, 2002). Nos três grupos investigados, a fração da dose absorvida com constante de absorção de primeira ordem ka_1 (f) bem como o tempo para iniciar a absorção com constante de absorção ka_2 (t_0) não diferiram significativamente ($\alpha = 0,05$).

Da mesma forma que o demonstrado na análise não-compartimental, observa-se uma redução não significativa do *clearance* conforme a gravidade da doença e um aumento significativo no $t_{1/2}$ em animais com alta parasitemia em relação aos sadios e com baixa parasitemia ($\alpha = 0,05$).

O volume de distribuição em ratos sadios após administração oral foi superior ao obtido após administração intravenosa ($43,1 \pm 24,4 \text{ L.kg}^{-1}$ versus $11,6 \pm 4,1 \text{ L.kg}^{-1}$). Esta tendência de aumento do V_d com a administração por via não-sistêmica também foi observada em trabalhos prévios. Mansor e colaboradores (1991), após administração oral de 50 mg/kg de QN a ratos Wistar sadios, obtiveram V_d de $28,9 \pm 10,3 \text{ L.kg}^{-1}$ que é aproximadamente 4 vezes superior ao obtido por Watari e colaboradores (1989) ($\approx 7,0 \text{ L.kg}^{-1}$) e Wanwimolruk e colaboradores (1993) ($7,7 \pm 3,0 \text{ L.kg}^{-1}$) que administraram quinina pela via intravenosa em doses de 20 e 25 mg/kg, respectivamente.

No presente trabalho, não se observou diferença significativa entre o V_d da quinina em animais sadios e nos dois grupos de animais infectados após administração oral de 250 mg/kg (Tabela 21). Porém, os animais com alta parasitemia apresentaram aumento significativo no V_d em relação aos animais com baixa parasitemia ($\alpha = 0,05$).

A extensão de distribuição de fármacos para o espaço extravascular depende do fluxo sanguíneo local, da fração livre do fármaco no plasma e também da permeabilidade do fármaco na barreira sangue-tecido (PUSSARD *et al.*, 2003).

Na malária, devido ao processo inflamatório local, ocorre alteração na permeabilidade hepática, causando extravasamento de plasma para o líquido intersticial (HENRY, 1999). Este fato poderia conduzir a uma diminuição no volume de distribuição de fármacos. Outro fator associado à redução no Vd é a diminuição do fluxo sanguíneo durante a infecção (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1997). Alterações do Vd também estão relacionadas com mudanças na ligação de fármacos às proteínas plasmáticas. Com o aumento da fração livre plasmática, poderiam ser observados valores de Vd aumentados. Os resultados da Tabela 21 mostram uma tendência de aumento do Vd para animais com alta parasitemia em relação aos sadios, indicando que o aumento da fração livre da quinina, conforme relatado em 5.6, seria o fator determinante deste equilíbrio. Apesar de não ser significativo, o aumento do Vd do fármaco (≈ 10 L) pode ser clinicamente relevante. Neste contexto, o resultado obtido para o grupo de baixa parasitemia não pode ser explicado. Cabe ressaltar, novamente, a grande variabilidade observada para este parâmetro para o grupo de animais sadios (em torno de 57 %), o que certamente não permitiu demonstrar a significância da variação observada.

Alterações no volume de distribuição da quinina devido à infecção malárica são relatadas na literatura. Mansor e colaboradores (1990) observaram redução no volume de distribuição após perfusão de 1 mg de quinina em fígado isolado de ratos machos Sprague-Dawley infectados com *Plasmodium berghei* (n = 6). Os autores sugeriram que a diminuição observada deveu-se à redução da concentração de quinina no tecido hepático. Nesse estudo, os autores não associaram a alteração de Vd a variações nas proteínas plasmáticas por terem investigado a farmacocinética da quinina *in situ*. Durante a infecção malárica em camundongos, Pussard e colaboradores (2003) observaram que o volume de distribuição apresentou-se negativamente relacionado com a parasitemia. As hipóteses levantadas pelos

autores para justificar esta observação incluem alterações na penetração intra-eritrocitária do fármaco e na permeabilidade tecidual.

A redução do Vd da quinina relatada na literatura devido a infecção malárica (MANSOR *et al.*, 1991; PUSSARD *et al.*, 2003) não se confirmou neste trabalho. Os estudos destes autores, no entanto, foram realizados em condições diversas das utilizadas neste trabalho que foi conduzido com ratos Wistar jovens e que demonstrou aumento da fração livre da quinina devido à infecção.

O aumento não significativo do volume de distribuição, em consequência do aumento da fração livre da quinina observado em ratos infectados por *Plasmodium berghei* com alta parasitemia, associado à redução não significativa do *clearance*, predominantemente devido à diminuição do *clearance* intrínseco, resultou em aumento significativo ($\alpha = 0,05$) do tempo de meia-vida do fármaco nesse grupo de animais em relação aos sadios (de $6,0 \pm 3,3$ h para $12,3 \pm 4,6$ h), conforme observado na Tabela 21.

5.8.2. Distribuição Tecidual

A atividade dos fármacos antimaláricos é dependente da concentração atingida no local de ação. A falta de efetividade da quinina sob as formas hepáticas dos parasitas da malária (TRACY e WEBSTER, 1996; RANG, DALE e RITTER, 2001) pode ser resultado da baixa concentração atingida no fígado após sua administração.

Para investigar esta hipótese, as concentrações livres teciduais de quinina foram determinadas pela técnica de microdiálise em animais sadios e em animais com alta parasitemia (n = 10/grupo). Em paralelo ao tecido hepático, foram

determinadas as concentrações livres do fármaco no tecido muscular, por ser um tecido não atingido pelos parasitas.

A microdiálise permite determinar as concentrações livres das substâncias de interesse em tecidos ou órgãos sob investigação. Apresenta vantagens sob outras técnicas de amostragens, pois permite a coleta de amostras com menos interferentes causando pouca lesão tecidual (BENVENISTE e HÜTTEMEIER, 1990). No entanto, para que o dialisado reflita a concentração real livre no tecido, é necessário que a recuperação das sondas seja previamente estabelecida (DE LA PENÃ, LIU e DERENDORF, 2000).

Como a microdiálise não é relatada na literatura como técnica de quantificação de quinina em tecidos periféricos, foram necessários testes de recuperação das sondas *in vitro* e *in vivo* nos tecidos de interesse. Os testes *in vitro* foram delineados a fim de se estabelecer as condições a serem utilizadas nos experimentos *in vivo*.

5.8.2.1. Recuperação das Sondas de Microdiálise *in vitro*

A recuperação das sondas de microdiálise *in vitro* foi determinada pelas técnicas de ganho e perda. Considerando a relevância da temperatura, isotonicidade e pH do meio no transporte de substâncias através de membranas poliméricas (BENVENISTE e HÜTTEMEIER, 1990), todos experimentos de recuperação *in vitro* foram conduzidos com solução de Ringer a $37,0 \pm 1,0$ °C, mimetizando o espaço intersticial *in vivo*.

Inicialmente, pela técnica de ganho, foi investigada a influência do fluxo de perfusão e da concentração de quinina no meio sobre a recuperação *in vitro*. As sondas de microdiálise (n = 4) foram imersas em soluções de Ringer contendo 0,5 e

1 µg/mL de quinina. Para cada concentração testada, perfundiu-se solução de Ringer com fluxo de 1,0, 1,5, 2,0, e 3,0 µL/min. Os resultados podem ser observados na Tabela 22.

Tabela 22. Recuperação das sondas de MD *in vitro*, pela técnica de ganho, para as concentrações de quinina de 0,5 e 1 µg/mL com diferentes fluxos de perfusão.

Recuperação <i>in vitro</i> por Ganho (%)	Concentração de Quinina							
	0,5 µg/mL				1,0 µg/mL			
Fluxo (µL/min)	1,0	1,5	2,0	3,0	1,0	1,5	2,0	3,0
Sonda A ^a	32 ± 2,9	30 ± 1,6	20 ± 0,3	19 ± 0,4	30 ± 1,3	27 ± 0,7	19 ± 1,8	16 ± 0,4
Sonda B ^a	39 ± 2,1	31 ± 2,8	25 ± 0,6	19 ± 1,0	41 ± 1,7	31 ± 2,9	27 ± 0,7	20 ± 4,0
Sonda C ^a	46 ± 1,4	37 ± 1,9	30 ± 1,4	24 ± 0,7	50 ± 2,0	36 ± 1,1	34 ± 1,6	24 ± 4,0
Sonda D ^a	nd	nd	nd	nd	40 ± 0,9	nd	25 ± 0,9	nd
Média das Sondas	39 ± 7,0	33 ± 3,8	25 ± 5,0	21 ± 2,9	40 ± 8,2	31 ± 4,5	26 ± 6,2	20 ± 4,0

^a Valores para n = 3 determinações
nd = não determinado

Observa-se na Tabela 22 e na Figura 26 que, com o aumento do fluxo de perfusão, houve uma diminuição da recuperação relativa das sondas de microdiálise. A recuperação obtida com fluxo de 1,0 µL/min foi aproximadamente 1,6 vezes superior a obtida com fluxo 2,0 µL/min. Essa relação inversa entre o fluxo de perfusão e a recuperação deve-se ao fato de que, com o aumento do fluxo, o equilíbrio entre os meios externo e interno diminui, diminuindo a passagem do analito para dentro da sonda de microdiálise e, conseqüentemente, a recuperação das sondas (BENVENISTE e HÜTTEMEIER, 1990, JOHANSEN *et al.*, 1997).

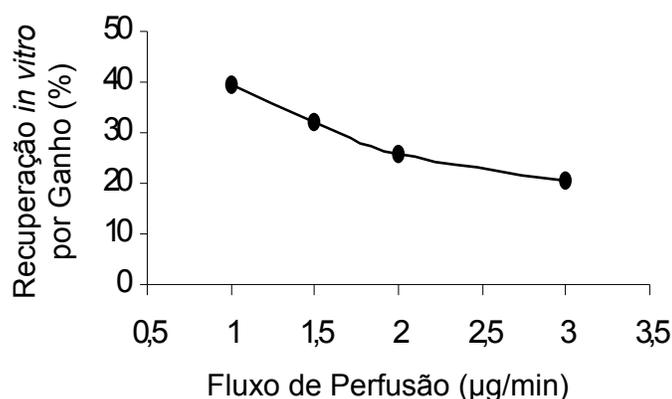


Figura 26. Influência do fluxo de perfusão na recuperação *in vitro* das sondas de microdiálise pela técnica de ganho (n = 4) (Média ± D.P.).

Na Tabela 23, pode-se visualizar a razão entre a recuperação *in vitro* por ganho obtida com as concentrações de quinina de 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL.

Tabela 23. Razão entre a recuperação das sondas de microdiálise *in vitro* pela técnica de ganho para as concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL de quinina nos diferentes fluxos de perfusão.

Razão da recuperação <i>in vitro</i> por ganho para as concentração de 0,5 µg/mL e 1 µg/mL				
Fluxo (µl/min)	1,0	1,5	2,0	3,0
Sonda A	1,08	1,21	1,02	1,02
Sonda B	0,96	1,01	0,92	0,96
Sonda C	0,92	1,03	0,89	0,98
Média das Sondas	0,99 ± 0,08	1,08 ± 0,11	0,95 ± 0,06	0,99 ± 0,03

A razão entre as recuperações para as duas concentrações testadas nos diversos fluxos situa-se na ordem de 1, comprovando que a recuperação das sondas de microdiálise não sofre influência da concentração de quinina no meio externo.

Para os experimentos subseqüentes, foram selecionadas as condições de fluxo de perfusão de 1,0 µL/min e concentração de quinina de 1 µg/mL.

Para a técnica de recuperação por perda as sondas de microdiálise (n = 4) perfundidas com solução de Ringer contendo 1 µg/mL de quinina, foram imersas em solução de Ringer sem fármaco. Na Tabela 24 pode-se comparar os resultados das recuperações obtidas pelas técnicas de perda e ganho. Observa-se que a taxa de perda das sondas de microdiálise não difere significativamente da taxa de ganho nas condições experimentais utilizadas ($\alpha = 0,05$).

Tabela 24. Recuperação das sondas de microdiálise *in vitro* pelas técnicas de ganho e por perda para o fluxo de 1 µL/min e concentração de quinina de 1 µg/mL.

Recuperação das Sondas de Microdiálise <i>in vitro</i> (%)		
	Ganho	Perda
Sonda A ^a	30 ± 1,3	30 ± 3,0
Sonda B ^a	41 ± 1,7	43 ± 1,7
Sonda C ^a	50 ± 2,0	49 ± 8,0
Sonda D ^a	40 ± 0,9	41 ± 2,1
Média ± D.P. ^b	39 ± 9,8	40 ± 8,1

^a Valores para n = 3 determinações

^b Valores para n = 12 determinações

Em estudos *in vitro*, normalmente utiliza-se como matriz uma solução aquosa contendo a substância sob investigação. Nestas condições, o analito pode se movimentar livremente do meio externo para dentro da membrana de microdiálise e o fator limitante da recuperação é o coeficiente de difusão da substância através da membrana da sonda. Em estudos *in vivo*, onde além da tortuosidade existente há a limitação de volume do líquido intersticial disponível, normalmente a recuperação das sondas é menor ou, no máximo, igual a determinada *in vitro* (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997).

Considerando a complexidade da matriz *in vivo* em relação a matriz *in vitro* utilizada, a realização de testes de recuperação *in vivo* é imprescindível para uma acurada avaliação das concentrações do fármaco no líquido intersticial.

5.8.2.2. Recuperação das Sondas de Microdiálise *in vivo*

A determinação da recuperação das sondas de microdiálise *in vivo* foi conduzida pelo método de retrodiálise. Neste método, assume-se que as taxas de perda e ganho do fármaco são semelhantes (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997), o que foi observado para a quinina nas condições *in vitro* investigadas.

A recuperação *in vivo* foi determinada perfundindo-se as sondas implantadas no fígado e no músculo de animais sadios e no fígado de animais infectados (n = 4/tecido), irrigando-se as mesmas com solução de Ringer contendo quinina na concentração de 1 µg/mL e fluxo de 1,0 µL/min.

Os resultados obtidos mostraram que o processo de infecção não alterou a recuperação das sondas de microdiálise no fígado. A recuperação *in vivo* para fígado sadio foi de 38 ± 9 % e para fígado infectado de 34 ± 6 %. Nesse órgão também não se observou diferença significativa ($\alpha = 0,05$) entre as recuperações *in vitro* e *in vivo*. No tecido muscular, no entanto, a relação da recuperação *in vitro/in vivo* foi de 1,65, demonstrando a redução da recuperação das sondas de microdiálise *in vivo*. Este fato deve-se à maior tortuosidade e rigidez do tecido muscular em relação ao tecido hepático, o que dificulta a passagem do analito do meio intersticial para a sonda e, dessa forma, observa-se uma menor recuperação *in vivo* comparando-se com a recuperação obtida *in vitro*. O fator de correlação *in vivo/in vitro* de 1,65 foi utilizado para corrigir as concentrações livres obtidas por microdiálise muscular.

5.8.2.3. Concentrações Livres Teciduais da Quinina

A determinação das concentrações livres teciduais e plasmáticas totais não pôde ser realizada em paralelo, no mesmo animal, devido ao elevado tempo de

meia-vida do fármaco. Para que fossem coletadas amostras por período de tempo que contemplasse três tempos de meia-vida da quinina e, dessa forma, fosse caracterizada sua fase de eliminação, os experimentos tiveram que ser conduzidos em diferentes grupos de animais, devido a falta de resistência dos animais quando submetidos simultaneamente à coleta de sangue e microdialisado hepático.

Preliminarmente aos experimentos de microdiálise nos animais, as sondas foram calibradas *in vitro* e o valor da recuperação foi utilizado para corrigir os valores encontrados no tecidos específico. Para o tecido muscular, além da correção da recuperação da sonda, foi utilizado o fator de ajuste *in vitro/in vivo* de 1,65.

Os perfis das concentrações livres teciduais nos animais sadios e infectados com alta parasitemia podem ser observados nas Figuras 27 e 28, respectivamente.

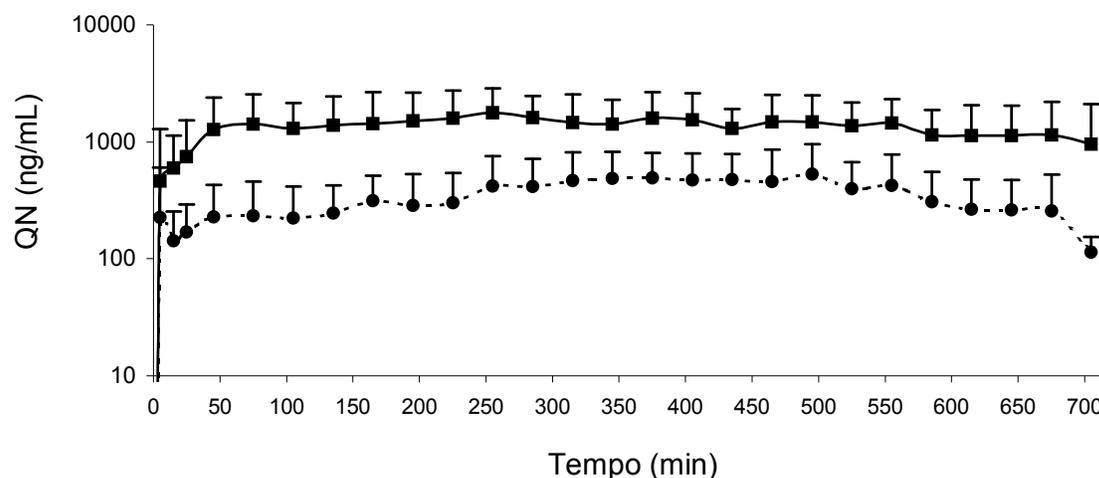


Figura 27. Perfis médios de concentração livre hepática (---●---) e muscular (—■—) da quinina obtidos após administração oral de 250 mg/kg a ratos Wistar sadios (n = 10) (Média ± D.P.).

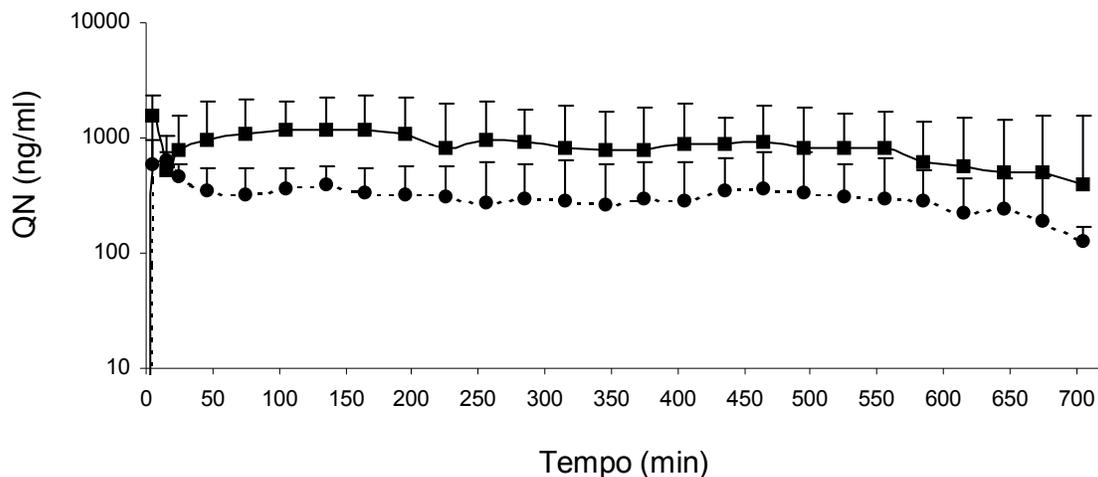


Figura 28. Perfis médios de concentração livre hepática (---●---) e muscular (—■—) da quinina obtidos após administração oral de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por *Plasmodium berghei* com alta parasitemia (38,2 % ± 12,6 %) (n = 10) (Média ± D.P.).

Pela visualização das Figuras 27 e 28 pode-se observar a existência de um platô nas concentrações livres em ambos tecidos e grupos investigados. No entanto, o tempo máximo de sobrevivência dos animais após procedimento cirúrgico de implantação das sondas foi de 12 horas e, como observado nos perfis plasmáticos (Figura 20), o período subsequente a 12 horas é relevante no declínio na curva de concentração *versus* tempo, caracterizando a eliminação do fármaco. Portanto, a fase de eliminação da quinina nos tecidos investigados não pôde ser visualizada e, dessa forma, não foram estimados os parâmetros $t_{1/2}$, $ASC_{0-\infty (tec)}$ e $ASMC_{0-\infty (tec)}$.

A partir dos perfis individuais de concentração tecidual livre por tempo, foram calculados, para os diferentes tecidos e grupos investigados, os parâmetros farmacocinéticos não-compartimentais $ASC_{0-720(tec)}$, $ASMC_{0-720(tec)}$ e $MRT(tec)$ até 12 h. Os resultados podem ser observados na Tabela 25.

Tabela 25. Parâmetros farmacocinéticos não-compartimentais obtidos dos perfis individuais de concentração livre tecidual de quinina após administração oral de 250 mg/kg a ratos Wistar saudáveis e infectados por *Plasmodium berghei* com alta parasitemia (n = 10/grupo).

Parâmetro	Ratos Saudáveis		Ratos Infectados com Alta Parasitemia (38,2 ± 12,6 %)	
	Fígado	Músculo	Fígado	Músculo
ASC ₀₋₇₂₀ (µg.min.mL ⁻¹)	227.770 ± 130.836	875.112 ± 531.907	205.331 ± 120.940	581.317 ± 467.092
ASMC ₀₋₇₂₀ (mg.min ² .mL ⁻¹)	80.028 ± 47.177	280.498 ± 85.062	63.976 ± 42.029	175.475 ± 53.487
MRT(h)	5,9 ± 1,1	5,4 ± 1,0	5,0 ± 1,3	4,8 ± 1,2

Como pode ser observado na Tabela 25, não foi observada diferença significativa nos valores de MRT obtidos entre os dois tecidos e grupos de animais investigados ($\alpha = 0,05$). Em ratos saudáveis, o tempo de residência médio hepático e muscular foi de $5,9 \pm 1,1$ h e $5,4 \pm 1,0$ h, respectivamente. Em animais infectados, os valores obtidos foram de $5,0 \pm 1,3$ h e $4,8 \pm 1,2$ h para fígado e músculo, respectivamente. A ASC₀₋₇₂₀ hepática para ratos saudáveis não diferiu estatisticamente da ASC₀₋₇₂₀ hepática obtida para ratos infectados. Também não houve diferença significativa entre a ASC₀₋₇₂₀ muscular entre os animais saudáveis e infectados com alta parasitemia.

Objetivando-se comparar os perfis plasmáticos livres com os perfis teciduais livres da quinina, obtidos por microdiálise, calculou-se as concentrações livres plasmáticas a partir das concentrações totais obtidas experimentalmente, considerando-se a ligação a proteínas plasmáticas concentração dependente caracterizada no item 5.6. Para tanto, as equações descritas na Tabela 16 foram utilizadas. Os perfis livres estão mostrados nas Figuras 29 e 30 para os animais saudáveis e com alta parasitemia, respectivamente.

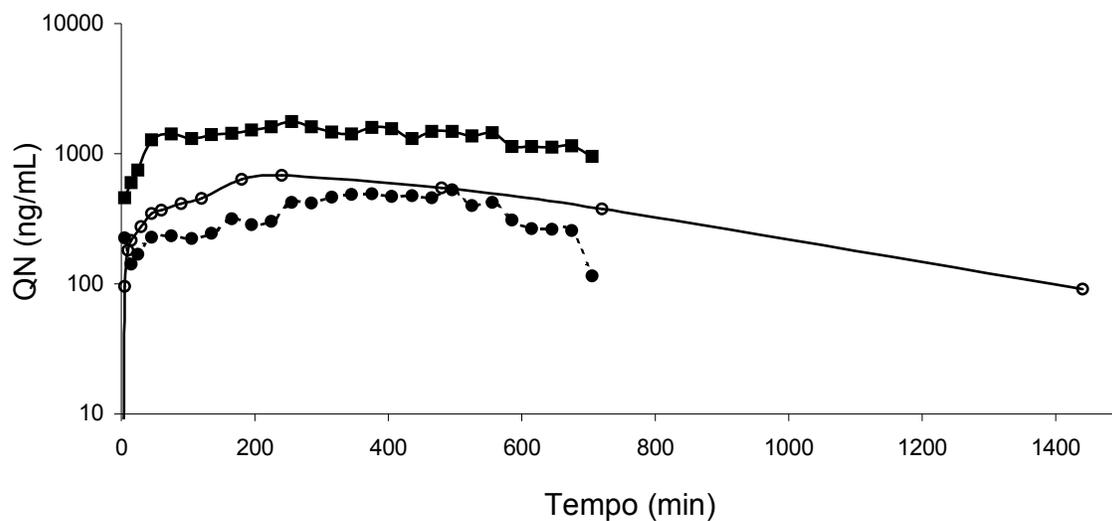


Figura 29. Perfil médio de concentração livre plasmática (—○—) e tecidual hepática (—●—) e muscular (—■—) da quinina obtido após administração oral de 250 mg/kg a ratos Wistar sadios (Média ± D.P.).

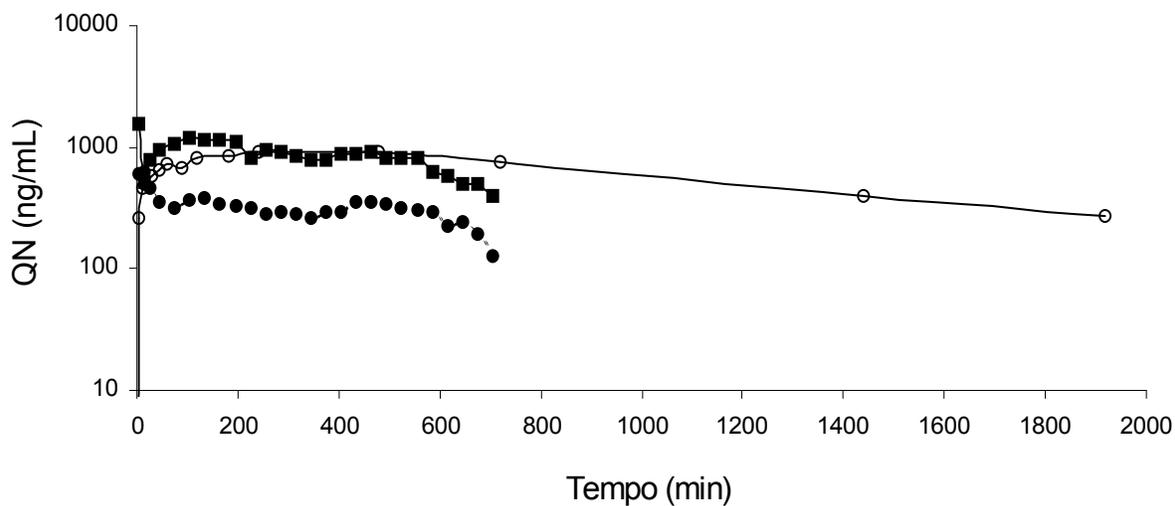


Figura 30. Perfil médio de concentração livre plasmática (—○—) e tecidual hepática (—●—) e muscular (—■—) da quinina obtido após administração oral de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por *Plasmodium berghei* com alta parasitemia ($38,2 \pm 12,6\%$) (Média ± D.P.).

A partir das curvas de concentração plasmática livre (Figuras 29 e 30) estimaram-se as ASC livres plasmáticas até 720 min ($ASC_{0-720(plasma)}$) dos grupos de animais sadios e infectados com alta parasitemia, para fins comparativos com os valores teciduais determinados para o mesmo tempo de coleta de dados. Estabeleceu-se, então, a relação entre ASC livre plasma/tecido para cada grupo de animais, para músculo e fígado, bem como a relação entre ASC livre dos dois tecidos. As razões entre as ASC teciduais foram obtidas individualmente, uma vez que as coletas de microdialisado foram realizadas em paralelo, no mesmo animal de experimentação. Para determinar a relação de $ASC_{0-720(tecido)}/ASC_{0-720(plasma)}$ foram utilizados os valores médios pois as coletas não foram realizadas concomitantemente, no mesmo animal. As relações de $ASC_{livre (0-720)}$ podem ser visualizadas na Tabela 26.

Tabela 26. Relação entre os valores de ASC_{0-720} livre para plasma, fígado e músculo de animais sadios e infectados por *Plasmodium berghei* com alta parasitemia.

Relação de $ASC_{livre (0-720)}$	Animais Sadios	Relação de $ASC_{livre (0-720)}$	Animais Infectados
Músculo / Plasma	2,32	Músculo / Plasma	1,07
Fígado / Plasma	0,43	Fígado / Plasma	0,34
Músculo / Fígado	$2,74 \pm 0,92$	Músculo / Fígado	$2,65 \pm 0,87$

Mesmo com a maior fração livre plasmática de quinina em ratos infectados relatada em 5.6., que levaria a uma maior distribuição tecidual do fármaco, pode-se observar na Tabela 26 que as razões $ASC_{0-720(tecido)}/ASC_{0-720(plasma)}$ apresentaram-se reduzidas durante a infecção, tanto para músculo como para fígado, em relação às observadas nos animais sadios devido a redução nas concentrações livres teciduais nos dois órgãos (Tabela 25) após a infecção. Essa redução nas frações livres teciduais pode ser consequência da diminuição do fluxo sangüíneo que ocorre na malária, corroborando com o sugerido por Pussard e colaboradores (2003) que associaram a redução do *clearance* da quinina em camundongos com a redução do

fluxo sanguíneo hepático proporcional a severidade da doença⁸, mesmo considerando que o fluxo exerça pouca influência na depuração de fármacos com baixa extração como a QN.

Órgãos de baixa perfusão, como o músculo, poderiam sofrer mais influência com a diminuição do aporte sanguíneo, explicando, a maior diferença detectada entre as frações livres musculares de animais sadios e infectados que variou de 2,32 para 1,07, em comparação com a menor variação observada para fígado (Tabela 26).

A razão entre $ASC_{0-720(\text{fígado})}/ASC_{0-720(\text{plasma})}$ também reduziu devido a infecção, no entanto, menos pronunciadamente. Este resultado pode estar relacionado com a alta perfusão do órgão, fazendo com que a diminuição do fluxo sanguíneo durante a malária influencie menos a irrigação local. Além disso, como ocorre aumento da permeabilidade hepática durante a infecção, levando ao extravasamento de plasma para o líquido intersticial, uma diminuição na fração livre hepática em animais infectados seria esperada. No trabalho realizado por Pussard e colaboradores (2003), os autores não observaram diferença entre as quantidades hepáticas de quinina em camundongos sadios e com diferentes níveis de parasitemia após administração i.p. de 80 mg/kg. Porém, no referido trabalho, a quinina foi quantificada em homogeneizado de tecido hepático e, portanto, as quantidades mensuradas referem-se a concentração total do fármaco e não a concentração livre como as mensuradas por microdiálise neste trabalho.

Mansor e colaboradores (1991), quantificaram a quinina em homogeneizado de fígado e coração de ratos após 12 h da administração de 50 mg/kg do fármaco pela via oral. Como as quantidades obtidas foram consideradas muito baixas, os autores sugeriram que a quinina não se acumulava em órgãos com alta perfusão.

⁸ PUKRITTAYAKAMEE, S. *et al.* Hepatic blood flow and metabolism in severe *falciparum* malaria: clearance of intravenously administered galactose. *Clinical Science*, v. 82, p. 63-70, 1992 *apud* PUSSARD, E. *et al.* Quinine distribution in mice with *Plasmodium berghei* malaria. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, v. 28, n. 1, p. 11-20, 2003.

Esta hipótese foi confirmada neste trabalho pela razão entre $ASC_{0-720(\text{figado})}/ASC_{0-720(\text{plasma})}$ que foi de 0,43 e 0,34 para animais sadios e infectados, respectivamente.

A falta de efetividade da quinina nas formas hepáticas de *Plasmodium* talvez possa estar relacionada às concentrações atingidas no órgão, uma vez que as concentrações livres hepáticas obtidas foram menores que as concentrações livres plasmáticas efetivas no combate das formas eritrocíticas do parasita, que são na ordem de 6,0 a 12,0 µg/mL em humanos (TAVARES, 1996; TRACY e WEBSTER, 1996), assumindo-se ligação às proteínas plasmáticas de 80 %. A falta de efetividade da quinina sob as formas hepáticas do parasita pode, também, estar associada com os mecanismos de interação do fármaco com a forma hepático do *Plasmodium*. Para avaliar estas hipóteses, mais experimentos devem ser conduzidos na tentativa de determinar o mecanismo de penetração do fármaco no parasita.

A razão $ASC_{0-720(\text{músculo})}/ASC_{0-720(\text{figado})}$ observada na Tabela 26 denota uma maior concentração da quinina no tecido muscular. Para o grupo de animais sadios essa razão foi de $2,74 \pm 0,92$ e para o grupo com alta infecção $2,65 \pm 0,87$, não existindo diferença significativa entre os grupos ($\alpha = 0,05$). A maior afinidade da quinina pelo tecido muscular já havia sido previamente relatada por Kurz e Fichtl (1985)⁹.

As frações livres hepáticas e musculares da quinina determinadas por microdiálise, apresentadas neste trabalho, podem contribuir para investigações subsequentes da falta de efetividade do fármaco sob as formas hepáticas do parasita, bem como permitem um melhor entendimento da distribuição da quinina durante a infecção, uma vez que, até o presente momento, não haviam dados na literatura sobre as concentrações teciduais atingidas após sua administração.

⁹ KURZ, H., FICHTL, B. Binding of drug to tissues. *Drug Metabolism Reviews*, v. 14, p. 467-510, 1983 *apud* MANSOR, S.M.; WARD, S.A.; EDWARDS, G. The effect of fever on quinine and quinidine disposition in the rat. *Journal Pharmaceutical and Pharmacology*, v. 43, p. 705-708, 1991.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as alterações farmacocinéticas da quinina causadas pelos diferentes níveis de parasitemia observados na evolução da malária devem ser levadas em consideração quando da determinação do esquema posológico do fármaco, visando garantir o sucesso terapêutico e, principalmente, a segurança para o indivíduo infectado. Apesar dos resultados obtidos não poderem ser diretamente extrapolados para humanos, indicam que a posologia da quinina deve ser definida considerando-se o estágio da infecção no indivíduo sob tratamento e que a mesma deve ser diferente da utilizada para a profilaxia da malária.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O protocolo para desenvolvimento de malária experimental em ratos Wistar foi estabelecido através da inoculação i.v. de 10^8 hemáceas parasitadas por *Plasmodium berghei* em animais de 5 semanas, obtendo-se 100 % de mortalidade em 13-16 dias;
- O tratamento de ratos experimentalmente infectados com *Plasmodium berghei* com 30 mg/kg/dia de cloroquina q12h, nos dias 7 a 9 pós-infecção, foi capaz de erradicar a infecção, demonstrando a adequabilidade do protocolo de malária experimental desenvolvido;
- As doses de quinina de 50 e 250 mg/kg administradas a q4h e q8h pela via oral, nos dias 7 a 9 pós-infecção, foram efetivas na cura da malária experimental por *Plasmodium berghei* em ratos Wistar;
- A metodologia analítica por CLAE para análise das amostras de quinina em plasma e microdialisado apresentou linearidade, precisão e exatidão dentro dos padrões estabelecidos para análise de fármacos em matrizes complexas. Os limites de quantificação obtidos foram de 0,1 µg/mL e 10 ng/mL para plasma e microdialisado, respectivamente;
- O modelo aberto de dois compartimentos adequadamente descreveu o perfil plasmático da quinina após administração intravenosa da dose de 50 mg/kg a ratos Wistar sadios resultando em V_d de $11,6 \pm 4,1 \text{ L.Kg}^{-1}$, Cl de $5,8 \pm 2,2 \text{ L.kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $t_{1/2}$ de $2,1 \pm 1,2 \text{ h}$;

- O modelo aberto de um compartimento com duas constantes de absorção paralelas foi capaz de modelar adequadamente os perfis plasmáticos de quinina após administração oral da dose de 250 mg/kg a ratos Wistar sadios e infectados por *Plasmodium berghei*, com baixa e alta parasitemia;
- Não foram observadas diferença significativa entre os parâmetros farmacocinéticos determinados após administração oral de 250 mg/kg de quinina a animais sadios e a animais infectados com baixa parasitemia ($9,9 \pm 2,1$ %);
- Os animais infectados com *Plasmodium berghei* com alta parasitemia ($37,4 \pm 8,7$ %) apresentaram aumento significativo no tempo de residência médio e no tempo de meia-vida da quinina em relação aos animais sadios e aos animais com baixa parasitemia ($9,9 \pm 2,1$ %) após administração oral da dose de 250 mg/kg. Uma tendência de redução do *clearance* e aumento no volume de distribuição da quinina, proporcional ao nível parasitêmico foi observada sob estas condições experimentais;
- A taxa de recuperação da quinina pelas sondas de microdiálise não foi concentração dependente na faixa de 0,5 a 1,0 µg/mL, sendo em média $41 \pm 7,5$ %, independente do método de determinação *in vitro* (perda ou ganho);
- A recuperação *in vivo* das sondas de microdiálise foi de 38 ± 9 % e de 34 ± 6 % para tecido hepático sadio e infectado, respectivamente, não sendo alterada pela infecção malárica;
- As frações livres musculares da quinina foram superior às frações livres hepáticas, denotando uma maior afinidade do fármaco pelo tecido muscular, mesmo após a infecção;

- As frações livres teciduais da quinina apresentaram-se reduzidas durante a infecção malárica, tanto para tecido hepático como para tecido muscular, demonstrando menor distribuição do fármaco para os tecidos devido ao processo infeccioso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, E. *et al.* The age-related resistance of rats to *Plasmodium berghei* infection is associated with differential cellular and humoral immune responses. *International Journal for Parasitology*, 2003.
- ALVARES, A.P. *et al.* Impairment of hepatic cytochrome P450 dependent monooxygenases by malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 13, p. 277-282, 1984.
- AMORIM, C.Z. *et al.* Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 24, p. 101-106, 1988.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Acessado em maio de 2005. Disponível em www.anvisa.gov.br
- BABALOLA, C.P. *et al.* Dose linearity of quinine in healthy human subjects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 44, p. 143-147, 1997.
- BABALOLA, C.P. *et al.* Pharmacokinetics of quinine in african patients with acute falciparum malaria. *Pharmacy World & Science*, v. 20, n.3, p. 118-122, 1998.
- BACHHAWAT, K. *et al.* Interaction of chloroquine and its analogues with heme: an isothermal titration calorimetric study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 276, p. 1075-1079, 2000.
- BAIRD, J.K. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*, v. 11, p. 105-111, 1995.
- BELLMANN, R. *et al.* Tissue pharmacokinetics of levofloxacin in human soft tissue infections. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 57, n. 5, p. 563-568, 2004.
- BENVENISTE, H. *et al.* Brain Microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, v. 52, p. 1667-1679, 1989.
- BENVENISTE, H.; HÜTTEMEIER, P.C. Microdialysis-Theory and application. *Progress in Neurobiology*, v. 35, p. 195-215, 1990.
- BERROZPE, J.D.; LANA O, J.M.; PLÁ DELFINA, J.A. Biofarmacia y Farmacocinética. Madrid: Síntesis, v.1, 1997.
- BRAGA, E.M.; FONTES, C.J.F. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 10ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

- BRITISH PHARMACOPOEIA, London: The Stationery Office, 1999.
- BRITAIN, H.G. Validação de Métodos Analíticos Não Cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, junho, 1998.
- BROW, P. Who cares about malaria? *New Scientist*, v. 1845, p. 37-41, 1992.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística – Princípios e Aplicações. Porto Alegre: ArtMed, 2004.
- CAMARGO, E.P. Malária, maleita, paludismo. *In: Ciência e Cultura*, v. 55, n. 1, p. 26-29, 2003.
- CARTER, R.; DIGGS, C.L. Plasmodia of rodents. *In: KREIER, J.P. (Ed.) Parasitic Protozoa*, v. 3, cap. 8, p. 359-465, 1977.
- CARVALHO, L. J. M. *et al.* *Plasmodium berghei*: cerebral malaria in CBA mice is not clearly related to plasma TNF levels or intensity of histopathological changes. *Experimental Parasitology*, v. 95, p. 1-4, 2000.
- CCAC - Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Olfert, E.D.; Cross, B.M.; McWilliam A.A. (Eds.), v. 1, 1993. Acessado em setembro de 2004. Disponível em <http://www.ccac.ca>.
- CRUZ, G. L. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro, 1985.
- DALLA COSTA, T. *et al.* Determination of free interstitial concentrations of piperacillin-tazobactam combinations by microdialysis. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v. 42, n. 6. p. 769-778, 1998.
- DAVIES, M.I. A review of microdialysis sampling for pharmacokinetics applications. *Analytica Chimica Acta*, v. 379, p. 227-249, 1999.
- DAVIES, M.I., *et al.* Microdialysis sampling for hepatic metabolism studies. Impact of microdialysis probe design and implantation technique on liver tissue. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 23, n. 10, p. 1072-1079, 1995.
- DAVIS, T.M.E. *et al.* Quinine pharmacokinetics in cerebral malaria: predicted plasma concentrations after rapid intravenous loading using a two-compartment model. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 4, p. 542-547, 1988.
- DE LA PENÑA, A.; LIU, P.; DERENDORF, H. Microdialysis in Peripheral Tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 45, p. 189-216, 2000.
- DELEU, D. *et al.* *In vivo* pharmacokinetics of levodopa and 3-O-methyldopa in muscle - A microdialysis study. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 344, p. 514-519, 1991.

- DIECKMANN-SCHUPPERT, A.; FRANKLIN, R.M. Compounds binding to cytoskeletal proteins are active against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Cell Biology International Reports*, v. 13, p. 207-214, 1989.
- DINIZ, A. Avaliação farmacocinética de piperacilina em músculo de ratos infectados com *Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado. PPGCF/UFRGS, 161 p, 2000.
- DOW, G.S.; REYNOLDSON, J.A.; THOMPSON, R.C.A. *Plasmodium berghei*: In vivo efficacy of albendazole in different rodent models. *Experimental Parasitology*, v. 88, p. 154-156, 1998.
- DOW, G.S.; REYNOLDSON, J.A.; THOMPSON, R.C.A. *Plasmodium berghei*: a new rat model for assessment of blood schizonticidal activity. *Experimental Parasitology*, v. 93, p. 92-94, 1999.
- DYKE, K.V. et al. Studies Concerning the mechanism of action of antimalarial drug – Inhibition of the incorporation of adenosine-8-³H into nucleic acids of *Plasmodium berghei*. *Biochemical Pharmacology*, v. 18, n. 6, p. 1417-1425, 1969.
- ELMQUIST, W.F.; SAWCHUK, R.J. Application on microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 3, p. 267-288, 1997.
- FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.
- FDA - Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, may 2001. Acessado em agosto de 2003. Disponível em www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf
- FERREIRA-DA-CRUZ, M.F. et al. The intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur of swiss mice is not a system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. *Experimental Parasitology*, v. 94, p. 243-247, 2000.
- FITCH, C.D. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sciences*, v. 74, p. 1957–1972, 2004.
- FOLEY, M., TILLEY, L. Quinoline Antimalarials: Mechanisms of Action and Resistance. *International Journal for Parasitology*, v. 27, n. 2, p. 231-240, 1997.
- FOLEY, M., TILLEY, L. Quinoline Antimalarials: Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 79, n. 1, p. 55-87, 1998.
- FULLERTON, D.S. Antimalarial. In: DELGADO, J. N.; REMES, W.A. (Ed.). Wilson and Gilvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. 10^a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998.

- FUNASA – Fundação Nacional da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. Casos de Malária no Brasil, 2002. Acessado em junho de 2003. Disponível em www.funasa.gov.br/index.
- GIBALDI, M., PERRIER, D. Pharmacokinetics. 2ª ed. v. 15, New York: Marcel Dekker, 1982.
- HAMMARLUND, M.M. PAALZOW, L.D. ODLIND B. Pharmacokinetics of furosemide in man after intravenous and oral administration: application of moment analysis. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 26, p. 197-207, 1984.
- HASAN, M.M.; HASSAN, M.A.; RAWASHDEH, N.M. Effect of oral activated charcoal on the pharmacokinetics of quinidine and quinine administered intravenously to rabbits. *Pharmacology and toxicology*, v. 67, n. 1, p. 73-76, 1990.
- HASTINGS, I.M.; D'ALESSANDRO, U. Modeling a predictable disaster: the rise and spread of drug-resistant malaria. *Parasitology Today*, v. 16, n. 8, p. 340-347, 2000.
- HENRY, J.B. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. 19ª ed. São Paulo: Manole, 1999.
- HOLLOWAY, P.A.H.; KRISHNA, S.; WHITE, N.J. *Plasmodium berghei*: lactic acidosis and hypoglycaemia in a rodent model of severe malaria; effects of glucose, quinine, and dichloroacetate. *Experimental Parasitology*, v. 72, p. 123-133, 1991.
- HYDE, J.E. Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 165-174, 2002.
- JANSE, C.J. *et al.* Comparison of *in vivo* and *in vitro* antimalarial activity of artemisinin, dihydroartemisin and sodium artesunate in the *Plasmodium berghei* - rodent model. *International Journal for Parasitology*, v. 24, p. 589-594, 1994.
- JOHANSEN, M.J.; NEWMAN, R.A.; MADDEN, T. The use of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacotherapy*, v. 17, n. 3, p. 464-481, 1997.
- JOUKHADAR, C. *et al.* Impaired target site penetration of β -lactams may account for therapeutic failure in patients with septic shock. *Critical Care Medicine*, v. 29, n. 2, p. 385-391, 2001.
- KAMIYAMA, T. *et al.* Manifestation of cerebral malaria-like symptoms in the WM/Ms rat infected with *Plasmodium berghei* strain NK 65. *Journal of Parasitology*, v. 73, p. 1138-1145, 1987.
- KIM, H.S. *et al.* Potent *in vivo* antimalarial activity of 3,15-di-O-acetylbruceolide against *Plasmodium berghei* infection in mice. *Parasitology International*, v. 48, n. 3, p. 271-274, 2000.

- KROGSTAD, D.J. Doenças dos protozoários e metazoários: malária. *In*: BENNETT; PLUM (Ed). Tratado da medicina interna, v. 2, 20ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- KURATA, N. *et al.* Antipyrine concentrations in liver and blood monitored by microdialysis of unrestrained conscious rats. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, v. 79, p. 363-369, 1993.
- WONG, T.C. Free drug measurements: methodology and clinical significance. *Clinica Chimica Acta*, v. 151, p. 197-216, 1985.
- LANDAU, I.; BOULART, Y. Life cycles and morphology. *In*: KILLICK-KENDRICK, R.; PETERS, W. (Ed.). Rodent Malaria. London: Academic Press, p. 53-84, 1978.
- LANDAU, I.; CHABAUD, A. *Plasmodium* species infecting *Thamnomys rutilans*: a zoological study. *Advances in Parasitology*, v. 33, p. 49-90, 1994.
- LANTZ, C.H.; DYKE, K.V. S. Studies Concerning the mechanism of action of antimalarial drug II – Inhibition of the incorporation of adenosine-5'-monophosphate-³H into nucleic acids of erythrocyte-free malarial parasites. *Biochemical Pharmacology*, v. 20, n. 6, p. 1157-1166, 1971.
- LIPMAN, J. *et al.* Low cefpirome levels during twice daily dosing in critically ill septic patients: pharmacokinetic modeling calls for more frequent dosing. *Intensive Care Medicine*, v. 27, p. 363-370, 2001.
- LÖNNROTH, P.; JANSSON, P.A.; SMITH, U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *American Journal Physiology*, v. 253, p. 228-231, 1987.
- MACKICHAN, J.J. Influence of protein binding and use of unbound (free) drug concentrations. *In*: EVANS, W.E.; SCHENTAG, J. J.; JUSKO, W. J. (Ed). Applied Pharmacokinetics. 3. ed. Vancouver: Applied Therapeutics, 1992.
- MANSOR, S.M. *et al.* The effect of malaria infection on the disposition of quinine and quinidine in the rat isolated perfused liver preparation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 42, p. 428-432, 1990.
- MANSOR, S.M.; WARD, S.A.; EDWARDS, G. The effect of fever on quinine and quinidine disposition in the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 43, p. 705-708, 1991.
- MARQUES, A.C.; GUTIERRES, H.C. Combate da Malária no Brasil: Evolução, Situação Atual e Perspectivas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 27, p. 91-108, 1994.
- MATSOUKA, H. *et al.* A rodent malaria, *Plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, *Anopheles stephensi*. *Parasitology International*, v. 51, p. 17-23, 2002.

- MIRANDA, M.I. *et al.* Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research*, v. 882, p. 230-235, 2000.
- MIRGHANI, R.A.; ÖRJAN, E.; GUSTAFSSON, L.L. High-performance liquid chromatographic method for the determination of the major quinine metabolite, 3-hydroxyquinine, in plasma and urine. *Journal of Chromatography B*, v. 708, p. 209-216, 1998.
- MONS, G. *et al.* Synchronized erythrocytic schizogony and gametocytogenesis of *Plasmodium berghei* *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology*, v. 91, p. 423-430, 1985.
- MOURA, R.A.A. Técnicas de laboratório. Rio de Janeiro, Atheneu, 2ª ed., 1982.
- MÜLLER, M. *et al.* Diclofenac concentrations in defined Tissue layers after topical administration. *Clinical Pharmacology Therapeutical*, v. 62, n.3, p. 293-299, 1997.
- NAHREVANIAN, H.; DASCOMBRE, M.J. Nitric oxide and reactive nitrogen intermediates during lethal and nonlethal strains of murine malaria. *Parasite Immunology*, v. 23, n. 9, p. 491-501, 2001.
- NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 10ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- NEWTON, P. *et al.* Pharmacokinetics of quinine and 3-hydroxyquinine in severe falciparum malaria with acute renal failure. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, p. 69-72, 1999.
- NOBES, M.S. *et al.* Hepatic Kupffer cell phagocytotic function in rats with erythrocytic-stage malaria. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 17, p. 598-605, 2002.
- NUSSENZWEIG, R.S.; COCHRANE A.H.; LUSTIG, H.J. Immunological Responses. *In: Killick-Kendrick, R.; Peters, W. (Ed.). Rodent Malaria. London: Academic Press, 1978.*
- OMS – Organização Mundial da Saúde. Malaria. Fact Sheet N° 94 (*online*) Washington: WHO; 2005. Acessado em janeiro de 2005. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
- OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. 126ª Sessão do Comitê Executivo, CE126/18 (Port.), 2000.
- PAROLA, P.; MILLER, R.S. Quinine in the modern treatment of falciparum malaria. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 206-207, 2002.
- PATWARI, A. *et al.* Hepatic dysfunction in childhood malaria. *Archives of Disease in Childhood*, v. 54, p. 139-141, 1979.
- PIERROT, C. *et al.* Age-related susceptibility and resistance to *Plasmodium berghei* in mice and rats. *Experimental Parasitology*, v. 104, p. 81-85, 2003.

- PORTELA, C. *et al.* Receptor-drug association studies in the inhibition of the hematin aggregation process of malaria. *FEBS Letters* 27435, 217-222, 2003.
- PUKRITTAYAKAMEE, S. *et al.* A study of the factors affecting the metabolic clearance of quinin in malaria. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 52, p. 487-493, 1997.
- PUSSARD, E. *et al.* Quinine distribution in mice with Plasmodium berghei malaria. *European Journal of drug Metabolism and Pharmacokinetics*, v. 28, n. 1, p. 11-20, 2003.
- RAM, V.J. *et al.* Oxygenated chalcones and bischalcones as potential antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 10, p. 2159-2161, 2000.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4^a ed., Rio de Janeiro:Guanabara-Koogan, 2001.
- ROBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR V. *Fundamentos de Robbins – Patologia Estrutural e Funcional*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1995.
- ROGER, P.M. *et al.* Consensual treatment of Plasmodium falciparum malaria does not lead to adequate quinine blood concentrations. *Journal of Infection*, v. 45, p. 160-164, 2002.
- ROWLAND, M., TOZER, T.N. *Clinical Pharmacokinetics – Concepts and applications*. 3^a ed. Filadélfia: Lippincott Williams e Wilkins, 1995.
- ROY, L.; LEBLANC, M.; BANNON, P.; VILLENEUVE, J. Quinine pharmacokinetics in chronic haemodialysis patients. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 545, p. 604-609, 2002.
- SCHUCK, V.J.A. Desenvolvimento de modelo farmacocinético-farmacodinâmico para ranitidina. Dissertação de Mestrado – PPGCF/UFRGS, 2000.
- SHARGEL, L., YU, A.B.C., *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*, 4^a ed. Stamford: Appleton & Lange, 1999.
- SMITH, A. (Ed.) - THE MERCK INDEX. 13^a ed., New Jersey, 2001.
- STENKEN, J.A. Methods and issues in microdialysis calibration. *Analytical Chemistry*, v. 379, p. 337-358, 1999.
- STENKEN, J.A. *et al.* Factors that influence microdialysis recovery. Comparison of experimental and theoretical microdialysis recoveries in rit liver. *Journal Pharmaceutical Science*, v. 86, n. 8, p. 958-966, 1997.
- SUTTLE, A.B., BROUWER, K.L.R. Bile flow but not enterohepatic recirculation influences the pharmacokinetics of ranitidine in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 22, n. 2, p. 224-232, 1994.

- SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM. Série C. Projetos, Programas e Relatórios, Brasília-DF, 2003.
- SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil 2005, Brasília-DF, 2005.
- TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.
- TAYLOR-ROBINSON, A.W. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons from murine models. *Parasitology Today*, v. 11, p. 334-342, 1995.
- TEGEDER, I. *et al.* Tissue distribution of imipenem in critically ill patients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 71, n. 5, p. 325-333, 2002.
- TRACY, J.W.; WEBSTER, L.T.Jr. Fármacos usados no tratamento das protozoonoses: Malária. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. (Ed.) Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996.
- TREESUKOSOL, Y. *et al.* The effect of taste stimuli on histamine release in the anterior hypothalamus of rats. *Brain Research*, v. 64, p. 51-55, 2003.
- VARÓN, E.F.; PASTOR, E.E.; RODRÍGUEZ, C.M.C. Pharmacokinetics of an ampicillin-sulbactam combination after intravenous and intramuscular administration to neonatal calves. *The Veterinary Journal*, v. 169, p. 437-443, 2005.
- VIRIYAYUDHAKORN, S. *et al.* Pharmacokinetics of quinine in obesity. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, v. 94, p. 425-428, 2000.
- VREDEN, S.G.S. *et al.* Susceptibility to *Plasmodium berghei* infection in rats is modulated by the acute phase response. *Parasite Immunology*, v. 17, n. 9, p. 445-450, 1995.
- ZUCOLOTO, S. *et al.* Topical application of benzalkonium chloride to the stomach serosa increases gastric emptying time, acid secretion, serum gastrin and size of the mucosa. *APMIS*, v. 110, p. 795-801, 2002.
- WAGNER, J.G. Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist. Pensilvânia: Lancaster, 1993.
- WALKENSTEIN, S.S. *et al.* Bioavailability of cimetidine in man. *Gastroenterology*, 74, p. 360-365, 1978.
- WANWIMOLRUK, S. ; CHALCROFT, S.; COVILLE, P.F.; CAMPBELL, J.A. Pharmacokinetics of quinine in young and elderly subjects. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, v. 85, n.6, p. 714-717, 1991.

- WANWIMOLRUK, S. *et al.* Effects of capsaicin on the pharmacokinetics of antipyrine, theophylline and quinine in rats. *Journal Pharmaceutical and Pharmacology*, v. 45, p. 618-621, 1993.
- WARREN, J.R. Bacteria-host interactions. *In: SHULMAN, S.T.; PHAIR, J.P.; PETERSON, L.R. WARREN, J.R.* The biologic & clinical basis of infectious diseases, 5^a ed. United States of Americaneiro: Stanfor T. Shulman, 1997.
- WATARI, N.; WAKAMATSU, A.; KANENIWA, N. Comparison of disposition parameters of quinidine and quinine in the rat. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, v. 12, p. 608-615, 1989.
- WAYNFORTH, H.B.; FLECKNELL, P.A. (Ed.) Experimental and Surgical Technique in the Rat. 2^a ed. San Diego: Academic Press, 1992.
- WEISS, D.F.; LUNTE, C.E. *In vivo* microdialysis as a tool for monitoring pharmacokinetics. *Trends and Analytical Chemistry*, v. 19, n. 10, p. 606-616, 2000.
- WHITE, N.J. *et al.* Quinine pharmacokinetics and toxicity in cerebral and uncomplicated falciparum malaria. *The American Journal of Medicine*, v. 73, p. 564-572, 1982.
- WILAIRATANA, P. *et al.* The future outlook of antimalarial drugs and recent work on the treatment of malaria. *Archives of Medical Research*, v. 33, p. 416-421, 2002.
- WILCOX, A. Manual for the microscopical diagnosis of malaria in man. U.S. Department of Health. Education and Welfare, Washington, D.C., 1960.
- WILLIAMS, C.S.F. Pratical guide to laboratory animals. Saint Louis: The C.V. Mosley Company, 1976.
- WINSTANLEY, P.A. Chemotherapy for *Falciparum* malaria: the armoury, the problems and the prospects. *Parasitology Today*, v. 16, n. 4, p. 146-153, 2000.
- WONGSRICHANALAI, C. *et al.* Epidemiology of drug-resistant malaria. *Infectious Diseases*, v. 2, p. 209-218, 2002.
- YIN, O.Q.P. *et al.* A modified two-portion absorption model to describe double-peak absorption profiles of ranitidine. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 42, n.2, p. 179-192, 2003.

8. ANEXOS

Anexo 1



Anexo 2



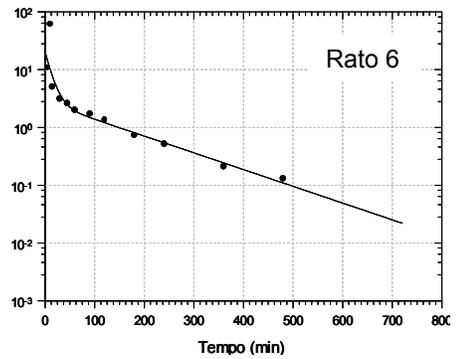
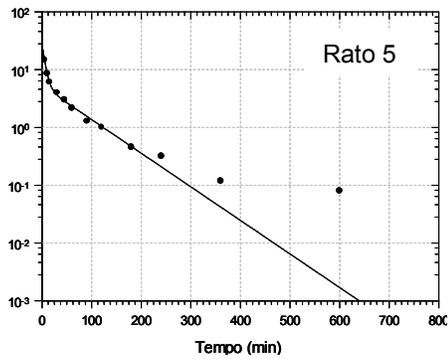
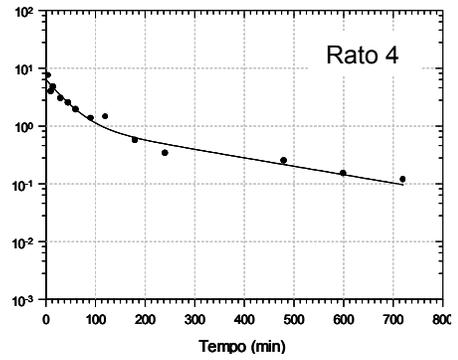
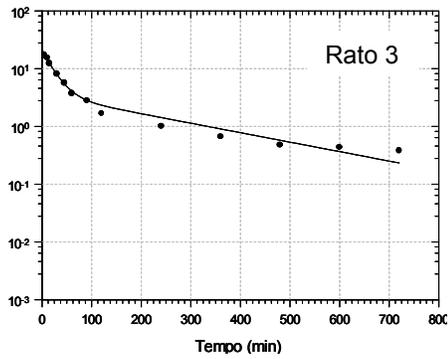
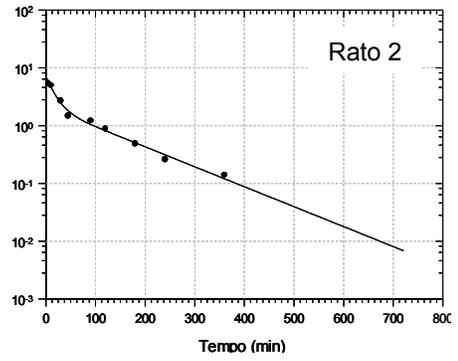
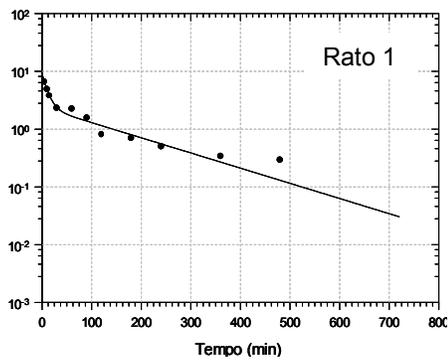


Figura 31. Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via i.v. na dose de 50 mg/kg a ratos Wistar saudáveis modelados pelo programa Scientist[®] segundo modelo de 2 compartimentos abertos.

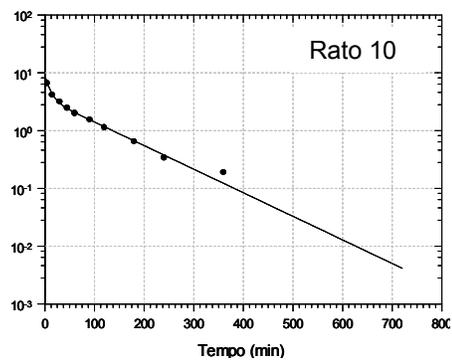
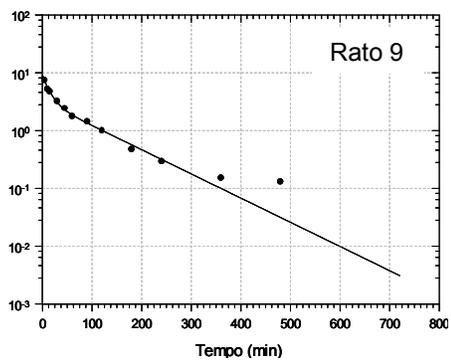
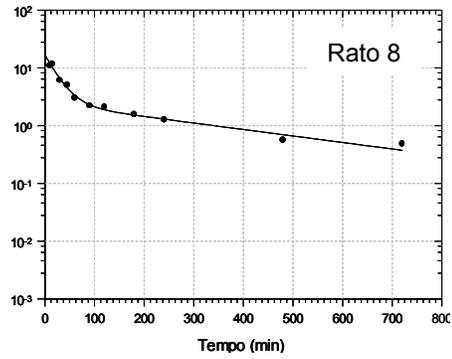
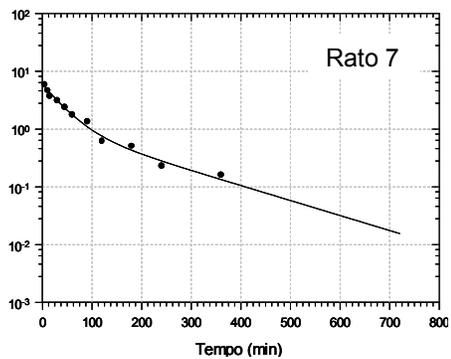


Figura 31 (cont.). Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via i.v. na dose de 50 mg/kg a ratos Wistar sadios modelados pelo programa Scientist[®] segundo modelo de 2 compartimentos abertos.

Anexo 3



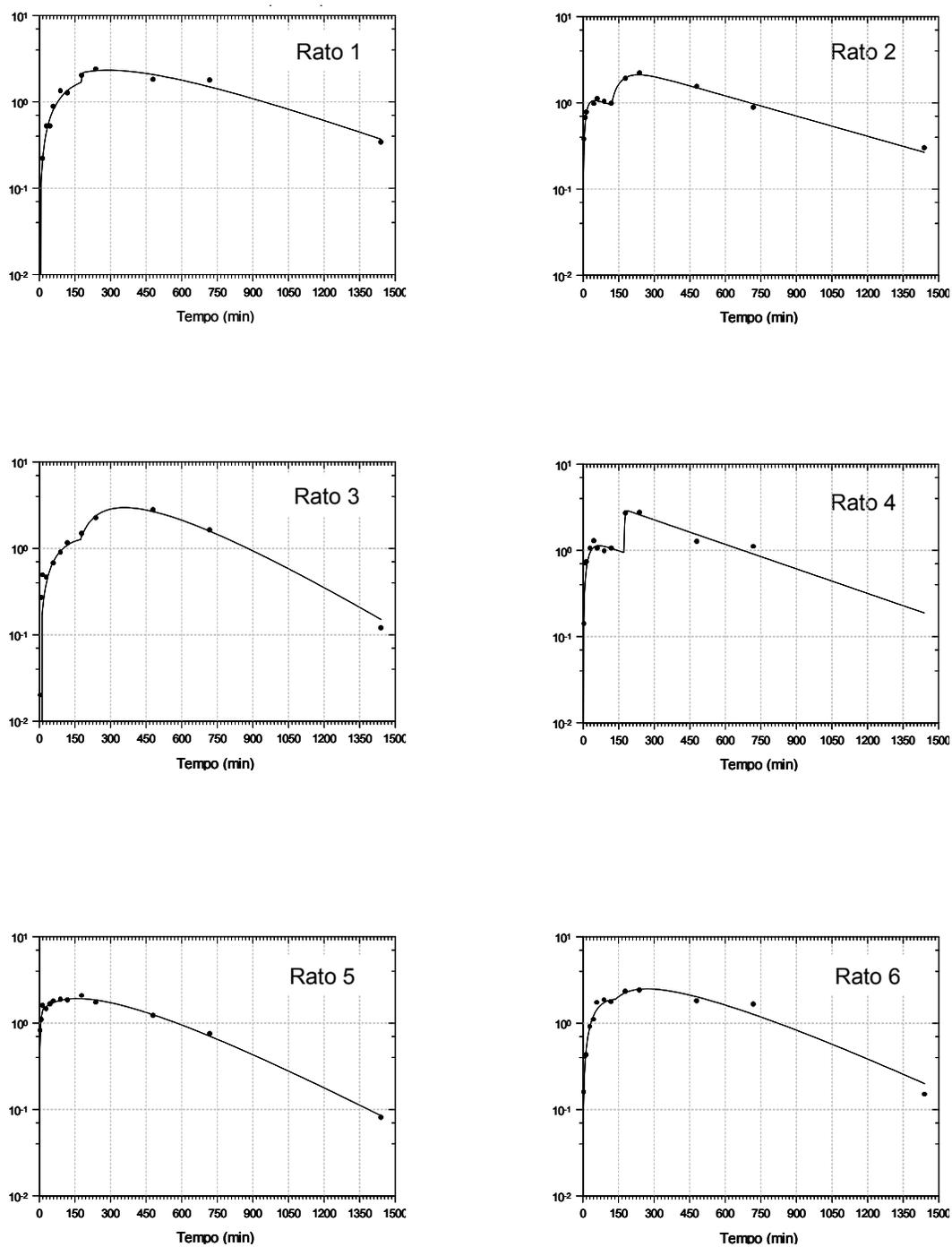


Figura 32. Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar saudáveis modelados pelo programa Scientist[®] para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.

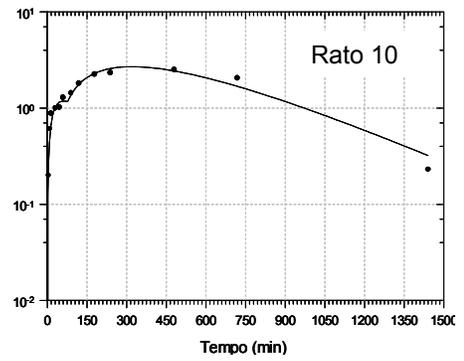
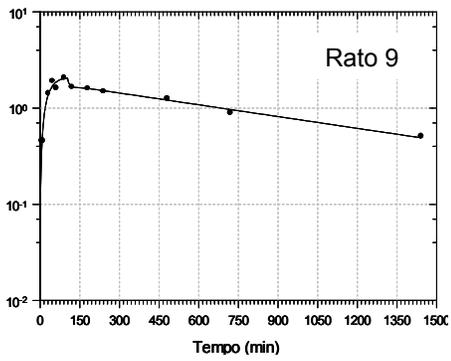
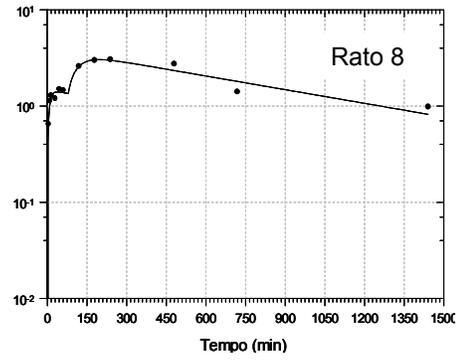
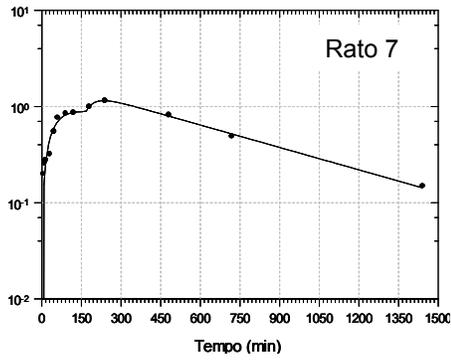


Figura 32 (cont.). Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar sadios modelados pelo programa Scientist[®] para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.

Anexo 4

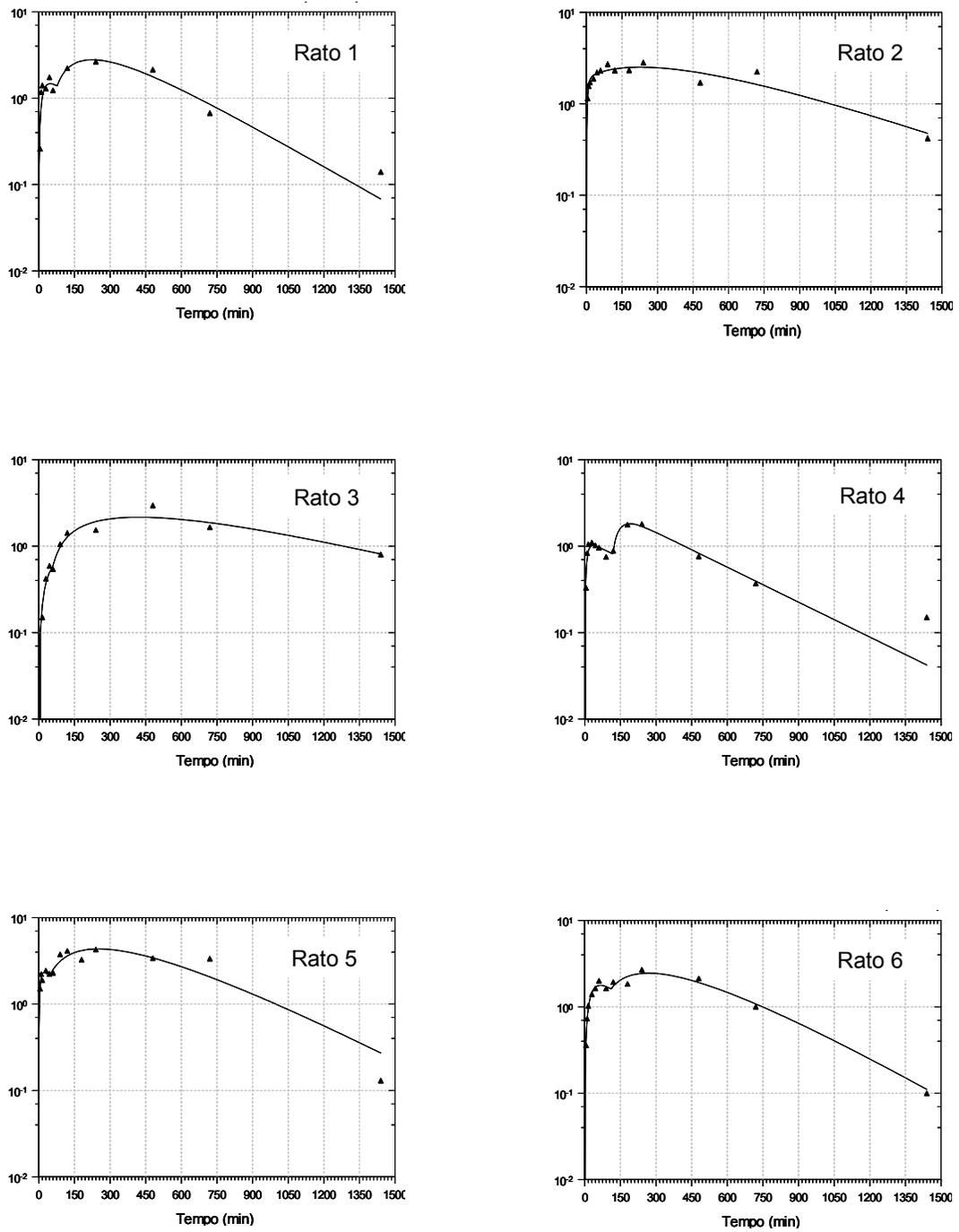


Figura 33. Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por *Plasmodium berghei* com baixa parasitemia modelados pelo programa Scientist[®] para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.

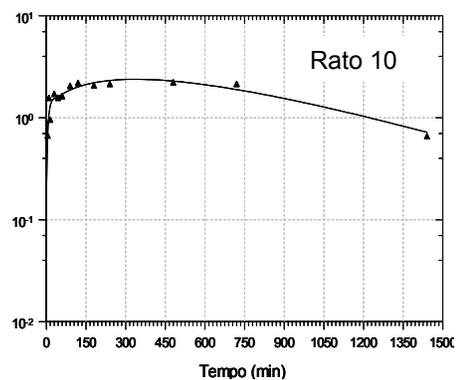
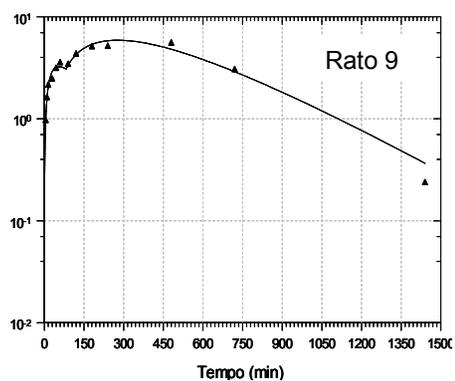
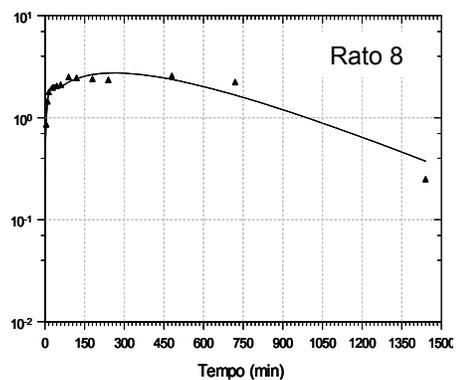
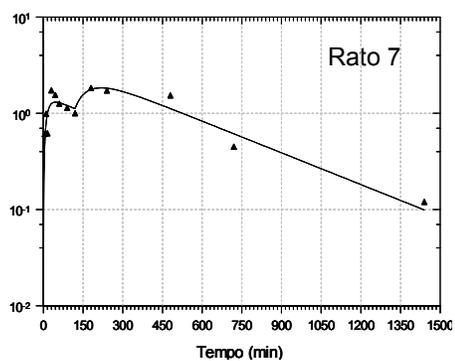


Figura 33 (cont.). Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por *Plasmodium berghei* com baixa parasitemia modelados pelo programa Scientist[®] para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.

Anexo 5



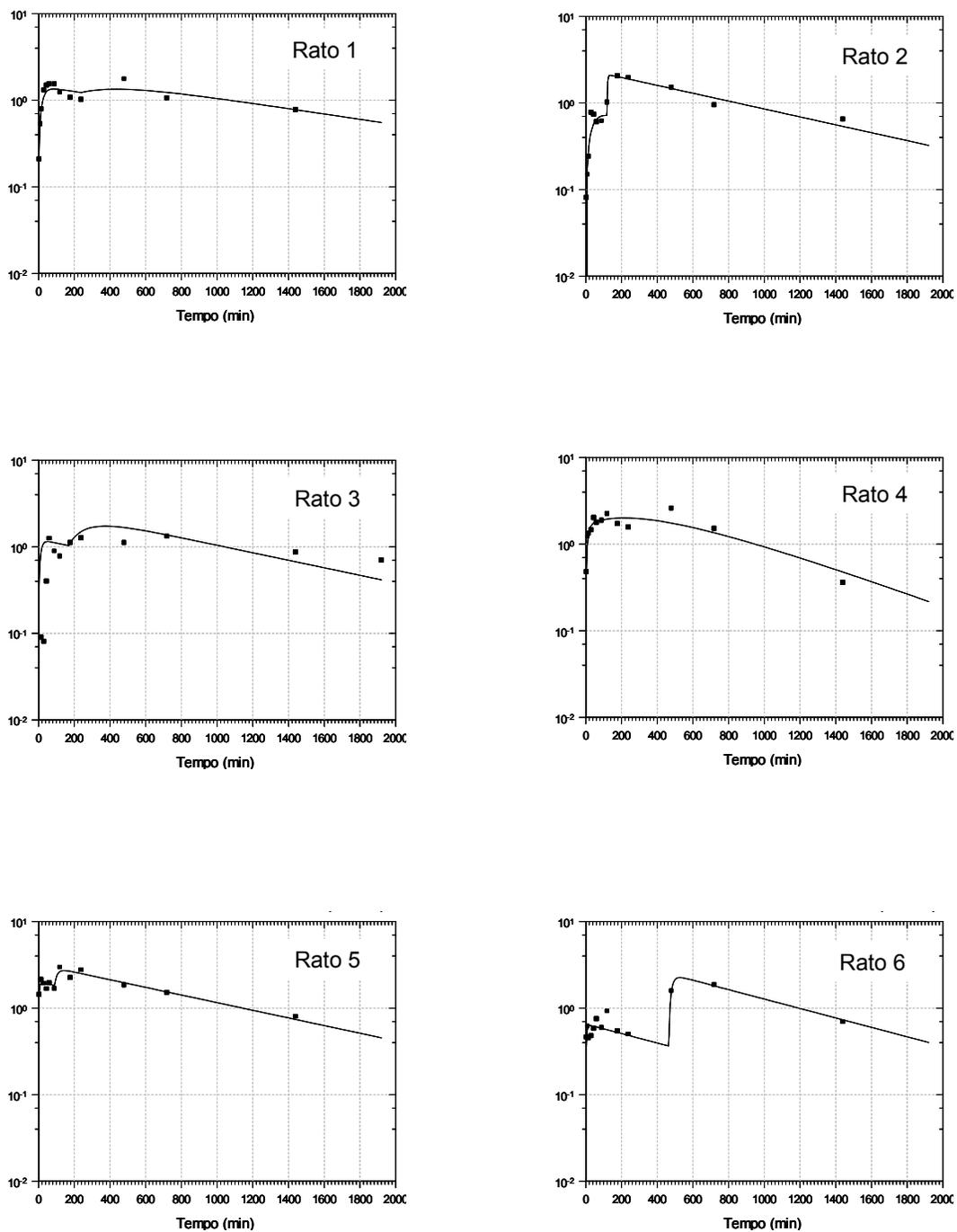


Figura 34. Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por *Plasmodium berghei* com alta parasitemia modelados pelo programa Scientist[®] para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.

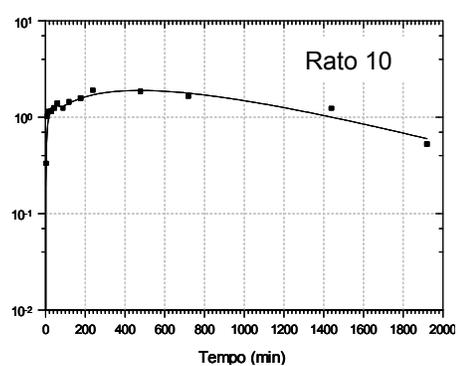
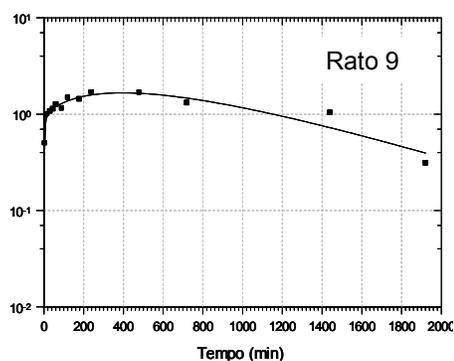
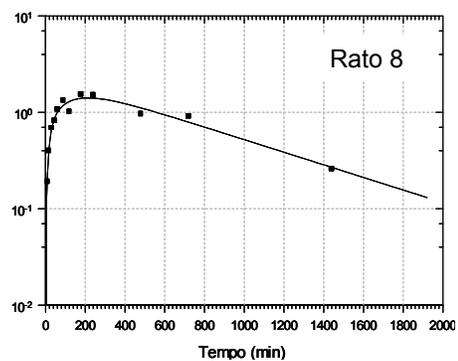
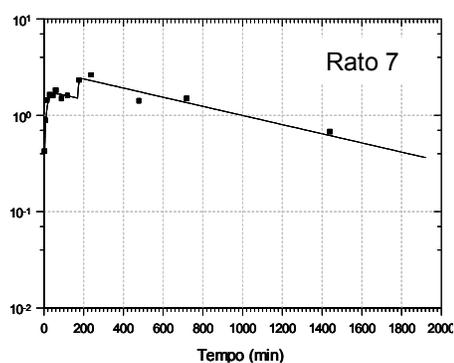


Figura 34 (cont.). Perfis plasmáticos individuais da quinina administrada pela via oral na dose de 250 mg/kg a ratos Wistar infectados por *Plasmodium berghei* com baixa parasitemia modelados pelo programa Scientist[®] para 1 compartimento com duas constantes de absorção paralelas.