



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA - UNEB**  
**DEPARTAMENTO CIÊNCIAS DA VIDA – DCV**  
**BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**LETÍCIA SOUZA DE ARAÚJO**

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E EFICÁCIA DE NANOCÁPSULAS DE IVERMECTINA**  
**NO TRATAMENTO DA MALÁRIA**

SALVADOR

2024

**LETÍCIA SOUZA DE ARAÚJO**

**Tema: Nanocápsulas para tratamento da malária.**

**Título: Avaliação de toxicidade e eficácia de nanocápsulas de ivermectina no tratamento da malária.**

Projeto de pesquisa apresentado ao curso de farmácia da Universidade do Estado da Bahia como requisito de avaliação da disciplina Trabalho de conclusão de curso.

Orientador: Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira.

Co-orientador: Prof. Dr. Milleno Motta.

SALVADOR

2024


LETÍCIA SOUZA DE ARAÚJO

## AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E EFICÁCIA DE NANOCÁPSULAS DE IVERMECTINA NO TRATAMENTO DA MALÁRIA

Trabalho de conclusão de curso (TCC), apresentado ao Departamento de Ciências da Vida, da Universidade do Estado da Bahia, como parte das exigências necessárias para a obtenção do título de Bachareal em Farmácia.


Salvador, 19 de Dezembro de 2024

### BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente  
 **DIOGO RODRIGO DE MAGALHAES MOREIRA**  
Data: 27/12/2024 14:06:34-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Dr. Diogo Rodrigo Moreira  
Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz BA

Documento assinado digitalmente  
 **MILLENO DANTAS MOTA**  
Data: 02/01/2025 22:14:46-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Milleno Mota  
Universidade do Estado da Bahia  
(UNEB)

Documento assinado digitalmente  
 **ANDRE LACERDA BRAGA TELES**  
Data: 06/01/2025 18:40:17-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. André Lacerda Braga Teles  
Universidade do Estado da Bahia  
(UNEB)

## RESUMO

Infecções causadas por protozoários são as doenças transmissíveis que mais levam ao óbito no mundo. No caso da malária, há medicamentos capazes de combater o parasita eritrocitário, porém há cepas resistentes ao tratamento clássico quinolina/artemisinina. Até o momento, não existe nenhum antimalárico que atue bloqueando todos os mecanismos de ação do parasito. Sendo assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento de fármacos com ação nos múltiplos estágios da malária e/ou novas abordagens terapêuticas que melhorem a eficácia dos fármacos já existentes. Usando uma abordagem in vitro e in vivo foi realizado testes de toxicidade e eficácia para nanocápsulas de ivermectina, visando obter resultados que demonstrassem uma diminuição da toxicidade e aumento da biodisponibilidade do fármaco encapsulado quando em comparação a sua forma livre.

Palavras-chave: Malária, nanotecnologia, ivermectina, toxicidade.

## **ABSTRACT**

Infections caused by protozoa are the communicable diseases that lead to the most deaths in the world. In the case of malaria, there are drugs capable of fighting the erythrocytic parasite, but there are strains that are resistant to the classic quinoline/artemisinin treatment. To date, there is no antimalarial that acts by blocking all the parasite's mechanisms of action. It is therefore essential to develop drugs that act on multiple stages of malaria and/or new therapeutic approaches that improve the efficacy of existing drugs. Using an *in vitro* and *in vivo* approach, toxicity and efficacy tests were carried out on ivermectin nanocapsules, with the aim of obtaining results that demonstrate a reduction in toxicity and an increase in the bioavailability of the encapsulated drug when compared to its free form.

Keywords: Malaria, nanotechnology, ivermectin, toxicity.

## LISTA DE SIGLAS/ ABREVIATURAS

ANKA LUC: ANKA Luciferase  
CEUA: Comitê de ética no uso de animais  
CQ: Cloroquina  
DLS: Espalhamento dinâmico da luz  
DMEM: Meio de cultura celular  
DMSO: Dimetilsufóxido  
FDA: Food and drug administration  
HepG2: Linhagem celular de hepatócitos  
IC50: Concentração inibitória média  
I.P.: Intraperitoneal  
IVM: Ivermectina  
IVM – BL: Ivermectina base livre  
J774: Linhagem celular de macrófagos  
NC: Nanocápsula  
NC – BLANK: Nanocápsulas vazias  
NC – IVM: Nanocápsulas de ivermectina  
OMS: Organização mundial de saúde  
*pbGFP: Plasmodium berghei*  
PCL: poli( $\epsilon$ -caprolactona)  
PDI: Índice de polidispersão  
PSO: Óleo de semente de abóbora  
TCA: Terapia combinada baseada na artemisinina

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Estrutura química da ivermectina.

**Figura 2:** Estrutura representativa das nanocápsulas lipídicas.

**Figura 3:** Mapa epidemiológico da malária.

**Figura 4:** Ciclo biológico do plasmódio nos diferentes tecidos.

**Figura 5:** Processo de digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo do plasmódio dentro do eritrócito infectado.

**Figura 6:** Gráfico de percentual de parasitemia após infecção e tratamento.

**Figura 7:** Gráfico de percentual de sobrevivência após infecção e tratamento.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Tabela 1** - Terapia combinada utilizada para a malária não-complicada baseada na artemisinina e seus derivados.

**Tabela 2** - Estudo da farmacocinética – IVM base livre.

**Tabela 3** - Estudo da farmacocinética – NC-IVM.

**Tabela 4** - Valor da concentração inibitória média da atividade enzimática celular (IC50).

**Tabela 5** - Taxa de sobrevivência do *in vivo* com IVM base livre e NC – IVM

**Tabela 6** - Sobrevivência dos animais ao longo de 40 dias após infecção.

**Tabela 7** - Concentração máxima plasmática e tempo de meia vida da IVM base livre e NC-IVM.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	11
2.1 Objetivo geral .....	11
2.2 Objetivo específico .....	11
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	12
3.1 Malária .....	12
3.2 Ivermectina .....	20
3.3 Nanocápsulas .....	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
4.1 Nanocápsulas .....	26
4.2 Ensaio de citotoxicidade em células de mamíferos .....	27
4.3 Atividade antiparasitária <i>in vivo</i> .....	28
4.4 Estudo da farmacocinética .....	30
4.5 Análise estatística .....	32
4.6 Critérios de exclusão e inclusão .....	32
<b>5. RESULTADOS</b> .....	34
5.1 Ensaio de citotoxicidade .....	34
5.2 Ensaio de toxicidade aguda .....	35
5.3 Ensaio da atividade antiparasitária <i>in vivo</i> .....	36
5.4 Ensaio da farmacocinética .....	38
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária causada por espécies do gênero *Plasmodium spp*, dos quais cinco são responsáveis pelas infecções em humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde de 2022 a malária tem incidência em regiões tropicais como os continentes asiático, africano e sul americano, com destaque no Brasil para a região Amazônica. De acordo com o relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2022, 249 milhões de casos de malária foram registrados em 84 países endêmicos, com 608 mil óbitos. No ano de 2020 eram 245 milhões de casos. A maioria deste aumento ocorreu em países da região africana, entretanto, apesar do crescimento do número de casos, os óbitos por malária reduziram de 625.000 em 2020 para 608.000 em 2022.

Devido à grande incidência de casos e óbitos causados pela malária faz-se necessário o desenvolvimento de tratamentos eficazes e seguros para o combate a doença. Assim, dispomos de antimaláricos como a cloroquina (CQ), o qual é eficaz contra os estágios eritrocíticos do plasmódio, atuando no impedimento da síntese de hemozoína, a partir heme livre disponível resultante da degradação da hemoglobina pelo parasito. Entretanto, devido ao seu uso indiscriminado, cepas resistentes ao tratamento com a CQ surgiram (ACHAN *et al.*, 2011; CABRAL, 2010). Assim, com a necessidade de novos fármacos contra a malária surgiram: a ivermectina, amodiaquina, mefloquina, artemisinina, primaquina, os quais, também já apresentam cepas resistentes.

A ivermectina (IVM) é um importante fármaco utilizado para tratamento de verminoses, não sendo necessário altas dosagens para se ter um tratamento eficaz, uma vez que, normalmente, 0,15 mg/kg — 0,2 mg/kg já são doses suficientes (SOUZA, ZILYANE, 2022). Apesar da sua eficácia, a IVM se liga rapidamente as proteínas plasmáticas, limitando a sua concentração plasmática máxima, o que acarreta em limitações quanto a sua distribuição para as células alvo e, conseqüentemente, dificulta o ajuste de dose, visto que, doses mais

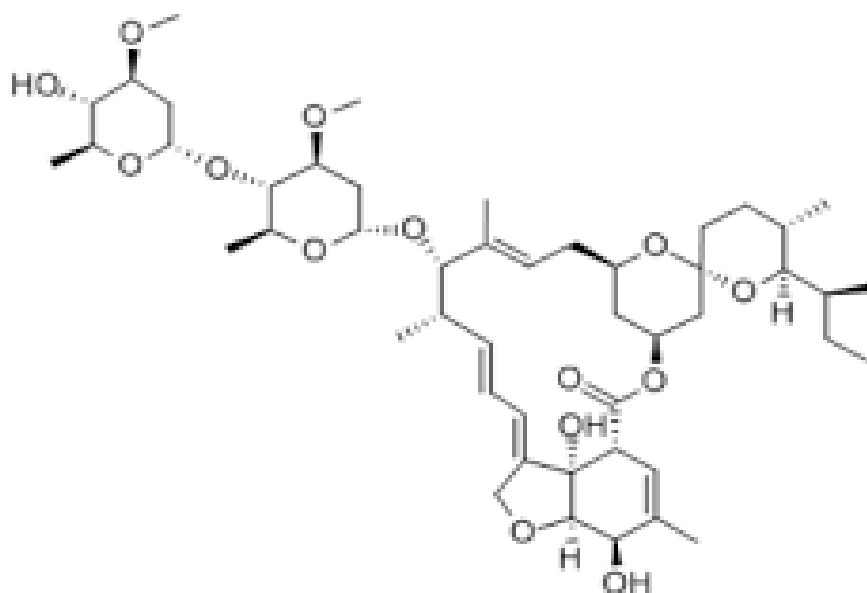
elevadas apresentam toxicidade. Arelado a esses problemas, a baixa solubilidade em água e as apresentações farmacêuticas disponíveis como comprimidos e suspensões orais diminuem a biodisponibilidade do fármaco (OZ, BARAKA, 1996).

No contexto da malária, a IVM tem demonstrado potente ação *in vitro* e eficaz ação *in vivo* frente ao estágio hepático da doença, no qual envolve os esporozoítos. Todavia, frente aos estágios sanguíneos assexuados, nos quais causam os sintomas da malária, a IVM é de pouca eficácia *in vivo*, pois requer altas doses de tratamento, nos quais são acompanhadas de efeitos colaterais e toxicidade aguda (Carvalho *et al.*, 2019; Mendes *et al.*, 2017).

Como alternativa para estas limitações, formulações farmacêuticas podem ser utilizadas para maximizar a biodisponibilidade da ivermectina. Dentre elas, uma possibilidade são as nanocápsulas lipídicas (NC), que são nanocarreadores com um núcleo oleoso cercado por uma membrana sólida de 20 — 100 nm. Estas nanocápsulas apresentam como vantagens uma alta permeabilidade de membrana, liberação controlada, ação mais duradoura, estabilidade metabólica e melhor biodisponibilidade. Além disso, as nanocápsulas são sistemas versáteis capazes de aumentar a estabilidade fotoquímica de compostos, bem como modular as interações entre a carga e as células, reduzindo assim os efeitos adversos dos medicamentos e aumentando a biodisponibilidade dos medicamentos. Embora formulações baseadas em NC tenham sido desenvolvidas para aumentar a eficácia terapêutica de uma variedade de compostos ativos, a aplicação desse sistema de entrega à IVM ainda precisa ser minuciosamente investigada (SOUZA, 2022).

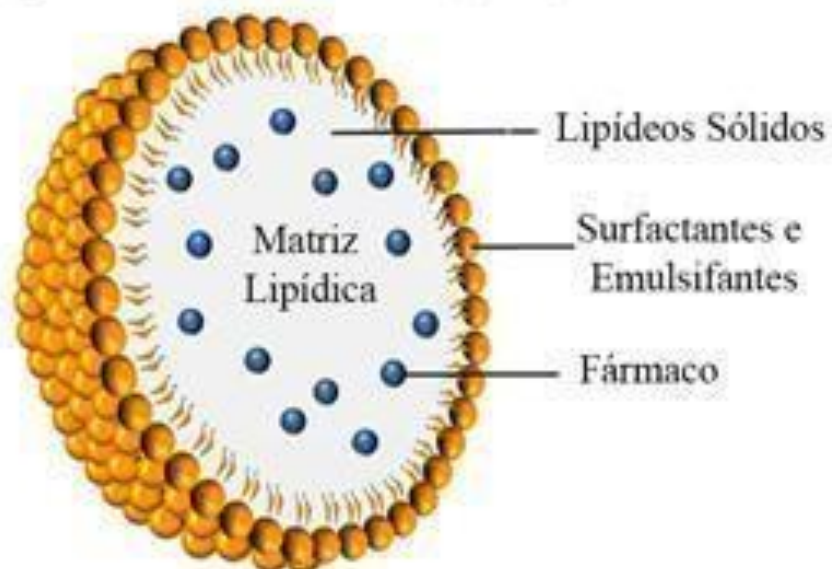
As NC utilizadas nos experimentos abordados foram baseadas em nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) formuladas com óleo de semente de abóbora (PSO). Curiosamente, bioprodutos derivados de sementes de abóbora foram descritos anteriormente por seus efeitos antiparasitários (SOUZA, 2022). Aqui, o PSO foi usado como um núcleo biologicamente ativo para a formação de nanocápsulas, resultando em uma nanoformulação de IVM viável (NC — IVM) e estável.

**Figura 1.** Estrutura química da ivermectina. (Fonte: Scielo)



**Figura 2.** Estrutura representativa das nanocápsulas lipídicas. (Fonte: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações USP)

### Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)



## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar toxicidade e eficácia das formulações nanoestruturadas de ivermectina diante do fármaco não encapsulado.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Investigar a toxicidade das nanocápsulas *in vivo* e a sua farmacocinética;
- Avaliar a eficácia contra infecção com *P.berghei* em camundongos.

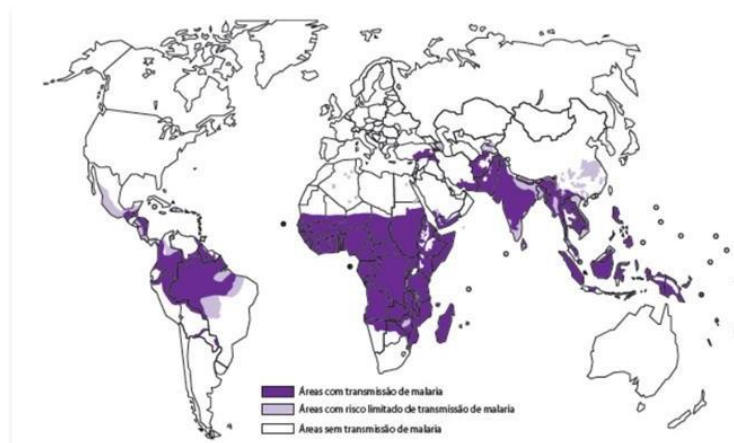
### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 1.1 Malária

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, e são transmitidos pela fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. Existem cinco cepas espécies que infectam humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, sendo o *Plasmodium falciparum* o que está envolvido nos casos mais graves de malária, seguido pelo *Plasmodium vivax* (NLINWE et. al, 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2019 foram registrados 229 milhões de casos de malária no mundo. O maior número de casos da malária é proveniente de países do continente africano (95%), seguido do sudeste asiático (3%) e a região oriental (2%).

No Brasil, é observado um maior número de ocorrências nas regiões da Amazônia legal (SIMÕES et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2016; BRASIL, 2020). No ano de 2017 foram registrados na região amazônica 128.747 casos de malária, com mais de 1.500 internações e aproximadamente 20 óbitos, sendo essas infecções acometidas, principalmente, pelo *P. vivax*, seguido pelo *P. falciparum* (BRASIL, 2020). A maior concentração de casos de malária na região norte do Brasil é devido às condições climáticas e geográficas necessárias para a sobrevivência e reprodução do mosquito *Anopheles*, como umidade, temperatura, pressão atmosférica, altitude específica (KELLY-HOPE et al., 2009; DAHER et al., 2019; WOLFARTH-COUTO et al., 2020).

**Figura 3:** Mapa epidemiológico mundial da Malária. (Fonte: Centro Estadual de Vigilância em Saúde - RS):

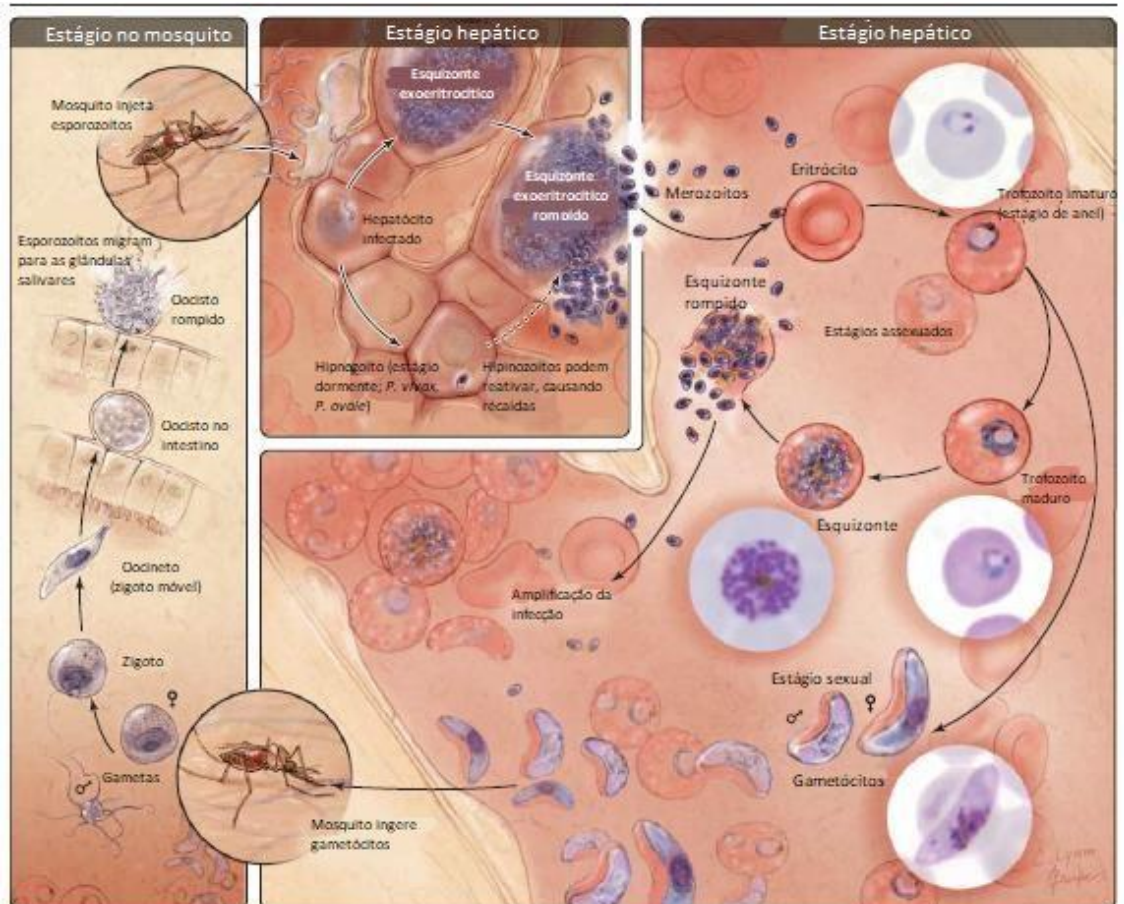


O ciclo biológico do plasmódio é complexo e envolve várias formas evolutivas. Para o desenvolvimento do parasito, este necessita de um hospedeiro vertebrado, onde ocorre o ciclo assexuado, e outro invertebrado, para ciclo sexuado. Os hospedeiros vertebrados podem ser mamíferos, répteis ou aves; enquanto os invertebrados podem ser mosquitos do gênero *Lutzomya*, *Culex*, *Aedes* e *Culiseta*. Nas infecções que acometem humanos o vetor é o mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (NJABO *et al.*, 2010; SCHALL, 2011).

No homem, a infecção é iniciada no momento do repasto sanguíneo, quando o mosquito anofelino fêmea infectado inocula os esporozoítos presentes nas glândulas salivares. Os parasitos rapidamente penetram os vasos sanguíneos e migram diretamente para o fígado, não se mantendo por muito tempo no local o qual foi inoculado. O estágio hepático é essencial no ciclo de vida do plasmódio. No fígado, os esporozoítos invadem os hepatócitos, local onde irão se transformar na forma infectante sanguínea, os merozoítos. Um único esporozoíto pode dar origem a milhares de merozoítos, os quais, posteriormente, irão migrar para corrente sanguínea e infectar os eritrócitos (COWMAN *et al.*, 2016).

Uma vez no hepatócito, o parasito passará por reprodução assexuada, denominada esquizogonia pré-eritrocítica, o qual ocorre replicação de DNA e organização de organelas do parasito, resultando no esquizonte hepático. A partir disso, a membrana plasmática do parasito inicia um processo de invaginação ao redor dessas organelas, dando origem aos merozoítos (STANWAY *et al.*, 2011; LANGHORNE *et al.*, 2016).

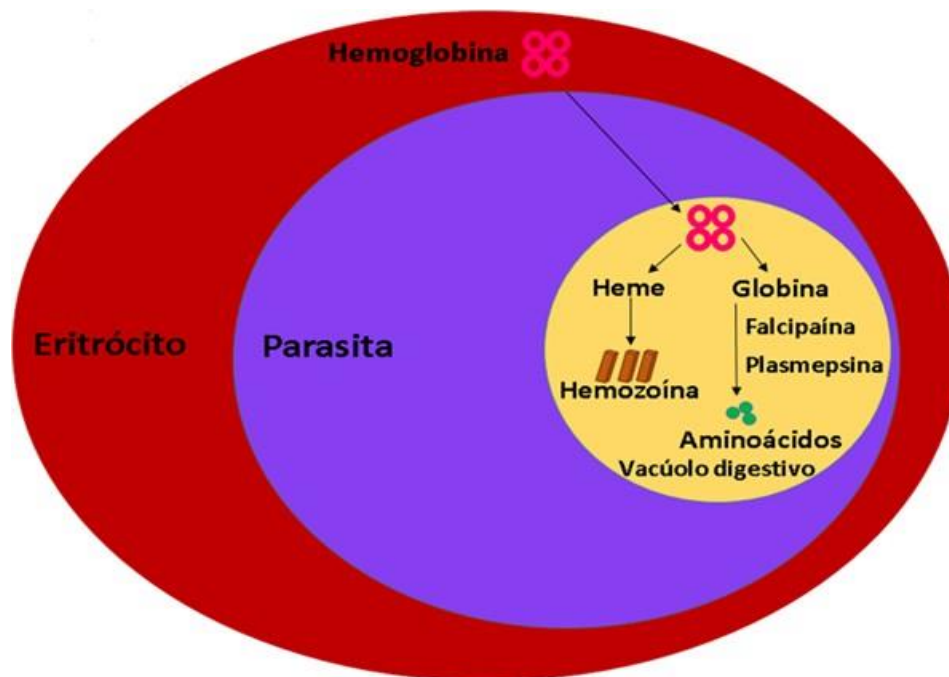
Durante o ciclo hepático não há manifestação de sintomas, sendo observados apenas na fase eritrocítica. Após a formação dos merozoítos, vesículas parasitadas (merossomos) rompem liberando estas formas evolutivas para a corrente sanguínea. Uma vez estabelecida a infecção eritrocítica, os parasitos se diferenciam em trofozoíto jovem (anéis), trofozoíto maduro, esquizontes sanguíneos e, posteriormente, merozoítos, os quais irão romper a membrana eritrocitária e liberar os parasitos para infectar novas células (SARAF *et al.*, 2016).



**Figura 4:** Ciclo biológico do plasmódio nos diferentes tecidos. (Adaptado de Griffith, 2007).

É durante a fase sanguínea que são observados o surgimento dos sintomas. Após a invasão do merozoíto ao eritrócito, o plasmódio rapidamente se desenvolve para a forma de anel, a qual é marcada pela baixa atividade metabólica. Cerca de aproximadamente 20 horas após invasão, o plasmódio passa para o estágio de trofozoíto, que tem como característica a síntese de DNA e RNA, além da digestão da hemoglobina, sendo esta última fonte de aminoácidos do parasito. A digestão da hemoglobina ocorre no vacúolo digestivo do parasito, compartimento do tipo lisossomal com pH ácido, o qual é favorável para ativação de proteases e início o processo. No início da digestão, o plasmódio consome apenas a porção proteica da hemoglobina, sendo a porção contendo Fe (II) (heme) rapidamente polimerizada ao cristal inerte hemozoína. Assim que o heme é liberado, o pH ácido e o oxigênio presentes no vacúolo digestivo resulta no rápido processo de oxidação para Fe (III) hematina, a qual é

tóxica para o parasito. Para contornar tal toxicidade, o parasito cristaliza a hematina, seu principal processo de desintoxicação, em hemozoína, a qual não é tóxica para o parasito (Figura 5) (LAZARUS *et al.*, 2008; MÜLLER *et al.*, 2011). A inibição da cristalização da hematina é um dos principais alvos de fármacos antimaláricos (FAMIN e GINSBURG, 2002; GLANS *et al.*, 2012).



**Figura 5:** Processo de digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo do plasmódio dentro do eritrócito infectado. (Adaptado de CORONADO, 2014).

Uma pequena fração de merozoítos liberados no estágio sanguíneo, cerca de 0,1%-5%, se diferenciam em gametas masculinos e femininos (gametócitos) (MEIBALAN *et al.*, 2019). É nesse estágio que o parasito se torna infectante para o vetor, o qual, durante repasto sanguíneo, ingere sangue infectado e inicia a fase sexuada. No mosquito, os gametócitos irão para o intestino do anofelino, local que possui as condições adequadas para diferenciação em microgametócito (masculino) e macrogametócito (feminino), como temperatura abaixo de 30°C e pH aumentado devido à baixa pressão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Logo após, ocorre a fecundação e mitose, resultando no zigoto. O zigoto

se aloja na parede do intestino do mosquito, se diferencia em oocineto, depois em oocisto. Este último rompe a membrana e libera milhares de esporozoítos que irão se alojar nas glândulas salivares do anofelino, podendo iniciar um novo ciclo quando realizar o repasto sanguíneo (COWMAN *et al.*, 2016; MEIBALAN *et al.*, 2019).

O rompimento das hemácias infectadas e posterior liberação dos merozoítos é o que caracteriza os acessos febris da malária. Isso ocorre devido à grande quantidade de eritrócitos rompidos, aumento da parasitemia e liberação da hemozoína na corrente sanguínea, resultando em episódios de febre alta e calafrios (KOCH *et al.*, 2016). Os ciclos febris variam para cada espécie. No *P. falciparum* e *P. vivax* o ciclo dura 48 horas, enquanto para o *P. malariae* tem um ciclo de 72 horas, apresentando os episódios de febre a cada 4 dias. Na malária complicada, esses acessos febris podem apresentar sintomas mais graves como hipoglicemia, convulsões, náuseas, vômito, distúrbios de consciência, insuficiência renal e coma (malária cerebral). Dessa forma, o diagnóstico deve ser realizado com antecedência, para que o paciente com suspeita de malária não evolua para quadro mais grave da doença (LUZOLO *et al.*, 2018).

O tratamento para a malária é conhecido muito antes da identificação do ciclo de vida do parasito. No século XVII padres jesuítas que vieram juntamente com colonizadores europeus observaram a utilização popular de chás e bebidas por indígenas. Estes chás eram preparados com a casca da *Cinchona sp.* para o tratamento de alguns tipos de febre (CUNICO *et al.*, 2008). O principal componente ativo dessa árvore é um alcaloide, a quinina. Tal fato foi comprovado em 1820 por Pierre Pelletier e Joseph Caventau a partir do isolamento de vários alcaloides ativos. Um ano após o descobrimento da quinina, esta começou a ser comercializada com o nome de “pó-dos-jesuítas” (DESPOMMIER *et al.*, 2017.).

O desenvolvimento de fármacos antimaláricos está bastante associado com os períodos de guerra. As tropas que estavam a frente desses conflitos sofriam com as epidemias da malária e para isso necessitavam de alternativas que os protegessem. Durante a Primeira Guerra Mundial, a quinina era o fármaco utilizado contra a malária. Porém, com a dificuldade na obtenção da casca da *Cinchona*, a Alemanha buscou sintetizar moléculas com atividade antimalárica, como a 9-aminoacrinidina (atabrina), a qual foi sintetizada na década de 20 e comercializada em 1930. Durante a Segunda Guerra Mundial, os Estados

Unidos começaram fabricar a atabrina americana devido à dificuldade de obtenção da matéria-prima para extração da Quinina. A atabrina americana foi administrada em soldados americanos e aliados como profilaxia. Entretanto, foram observados efeitos adversos e psicológicos o que fez suspender o seu uso (WALLACE, 1989; FRANÇA, *et al.*, 2008).

A dificuldade de obtenção do quinina impulsionou a pesquisa de novas moléculas ativas contra o plasmódio. Fármacos como amodiaquina, primaquina, pirimetamina e cloroquina foram sintetizados. A cloroquina, então, tornou-se o fármaco de primeira escolha devido ao baixo custo, tolerância, segurança e baixa toxicidade. Foi durante a Guerra do Vietnã que soldados apresentaram casos de malária resistentes à cloroquina, o que incentivou a busca de alternativas que fossem eficazes em casos com cepas resistentes. Com isso, a mefloquina e a halofantrina foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) (SKRZYPEK *et al.*, 2017).

Algumas 4-aminoquinolinas, como cloroquina, quinina, amodiaquina, mefloquina, e 8-aminoquinolinas, como primaquina e tafenoquina, podem agir tanto nas formas evolutivas assexuadas quanto nos gametócitos (KUMAR *et al.*, 2015). A primeira linha de tratamento era a cloroquina, a qual atua como esquizonticida, não apresentando efeitos adversos graves, permitindo a adoção como profilaxia em áreas endêmicas. Características farmacológicas da cloroquina, como estabilidade, baixo custo e eficácia, resultou na grande utilização desse medicamento e aumento significativo de cepas resistentes. O mecanismo de resistência do plasmódio à cloroquina está associado a mutações na proteína de transporte transmembrana do *P. falciparum* resistente à cloroquina (PfCRT), localizada na membrana do vacúolo digestivo, diminuindo, assim, a concentração do fármaco nesse compartimento (OLAFSON *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação das 4-aminoquinolinas e 8-aminoquinolinas é baseado na inibição da polimerização da hemozoína. As aminoquinolinas se ligam à hematina durante o processo de metabolização da hemoglobina, impedindo a formação dos cristais inertes e resultando na morte do parasito pelo o acúmulo desse metabólito no vacúolo digestivo (PAGOLA *et al.*, 2000; OLAFSON *et al.*, 2015). Algumas 8-aminoquinolinas, como primaquina e tafenoquina, podem agir tanto nas formas evolutivas assexuadas quanto nos gametócitos. A primaquina é um exemplo de fármaco que age dessa forma,

sendo utilizada em associação com esquizotocidas sanguíneos devido sua ação frente às formas evolutivas latentes (hipnozoítos) do *P. vivax* e *P. ovale* (SULLIVAN, 2017).

O rápido aumento no número de cepas resistentes desencadeou na busca de outras alternativas terapêuticas eficazes e que não desenvolvessem resistência no parasito. Com isso, a mefloquina foi adotada para o tratamento da malária com parasitos resistentes a cloroquina. A mefloquina é um potente esquizotocida sanguíneo e seus efeitos farmacológicos resultam na regressão da parasitemia e os sintomas. O mecanismo de ação não está completamente elucidado, mas acredita-se que pode agir durante o processo de cristalização da hemozoína. Mesmo possuindo características farmacológicas interessantes, foi observado o surgimento de cepas também resistentes a mefloquina (PRICE *et al.*, 2004).

Com o contínuo surgimento de cepas resistentes à quininas, a artemisinina surgiu como uma opção promissora. É um produto natural extraído da *Artemisia annua* utilizada na antiguidade pelos chineses para febres. Na década de 70 foi isolada e descoberta sua ação antimalárica, e utilizada para tratar malária em homens que estavam participando da guerra no Vietnã. A partir disso, a artemisinina serviu como base para a síntese de novos compostos análogos à sua estrutura, como artesunato, diidroartemisinina, arteméter (LA- SCALEA *et al.*, 2007).

A artemisinina e seus derivados (artesunato, ácido artenílico, diidroartemisinina) surgiram como alternativas para contornar o contínuo aparecimento de plasmódios resistentes às terapias utilizadas (TU, 2011). A eficácia da artemisinina é proveniente da rápida ação supressora da parasitemia agindo nas formas evolutivas sanguíneas, além dos gametócitos e, quando associada a outros antimaláricos, pode eliminar a infecção. Os efeitos farmacológicos da artemisinina e seus derivados estão diretamente associados à presença de uma ponte endoperóxido na estrutura química desses fármacos. Essa característica estrutural permite que a molécula seja reduzida pelo íon ferroso, presente no heme, durante a digestão da hemoglobina. No vacúolo digestivo a artemisinina é clivada, dando origem a radicais livres que podem modificar estruturas proteicas dos parasitos por alquilação (MESHNICK, 2002). Em um estudo realizado por La-Scalea *et al.* (2007) demonstrou alterações no

comportamento voltimétrico na presença de hemina quando tratada com artemisinina, confirmando, assim, que ocorre redução da molécula na presença de um agente redutor, no caso o íon  $\text{Fe}^{+2}$ .

O tratamento da malária, atualmente, é baseado em terapias combinadas, onde o principal objetivo é combater o plasmódio por mais de um alvo bioquímico (WHO, 2020). Com isso, a OMS preconizou algumas combinações de medicamentos que ajam por vias metabólicas diferentes combatendo o protozoário e diminuindo o risco de desenvolver resistência individual para cada fármaco. Então, pela eficácia comprovada da artemisinina e seus derivados, foi adotada a terapia combinada baseada na artemisinina (TCA), em que é utilizada a artemisinina ou seus derivados associados com um ou mais fármacos. A artemisinina e os seus derivados não podem ser utilizados como monoterapia oral. Formulações de dose fixa (combinação de dois princípios ativos diferentes em um único comprimido) são mais recomendadas do que o uso de vários comprimidos ou cápsulas, uma vez que facilitam a adesão ao tratamento (WHO, 2020).

---

### Terapia combinada

---

Arteméter + lumefantrina

Artesunato + amodiaquina

Artesunato + mefloquina

Diidroartemisinina + piperaquina

Artesunato + sulfadoxina - pirimetamina

**Tabela 1:** Terapia combinada utilizada para a malária não-complicada baseada na artemisinina e seus derivados. (Fonte: *Guidelines for the treatment of malaria* 3ª edição, 2015).

Mesmo apresentando eficácia frente ao plasmódio, ainda é existente a preocupação quanto à resistência do protozoário. Dados da OMS, apontam o

surgimento de falhas terapêuticas em pacientes que faziam uso de TCAs em diversos países (Figura 5), inclusive o Brasil, o qual apresentou cepas de *P. falciparum* resistentes ao esquema arteméter/lumefantrina e artesunato/mefloquina entre 2015 e 2017 (WHO, 2020).

### 3.2 Ivermectina

A Ivermectina (IVM) é uma lactona macrocíclica com alta eficácia antiparasitária, apresentando ação contra diversos nematoides, como *Ascaris*, *Enterobius*, *Strongyloides* e vermes filariais (Laing, *et al.*, 2017; Van Voorhis, *et al.*, 2015). É importante ressaltar que William C. Campbell e Satoshi Ōmura foram creditados pelo desenvolvimento da IVM e receberam o Prêmio Nobel de Medicina em 2015. O trabalho desses cientistas na década de 1970 iniciou uma cadeia de eventos que levaram ao controle da oncocercose, uma doença tropical negligenciada. A eficácia do IVM tem sido demonstrada pelo Programa de Controle da Oncocercose (OCP).

A Ivermectina é um medicamento antiparasitário de amplo espectro, amplamente utilizado no tratamento de diversos parasitas em animais e humanos (Burg, 1979). Em humanos, é principalmente usado no tratamento da oncocercose e filariose linfática (Brown, 2000; Cupp, 2011) e é administrado por meio de campanhas de tratamento em massa (Makunde, 2003; Molyneux, 2003). A Ivermectina se liga seletiva e fortemente aos canais de íons de cloreto ativados por glutamato nos músculos e células nervosas de invertebrados (Meyers, 2015) e aumenta a permeabilidade de sua membrana celular aos íons de cloreto. Esse processo perturba a transmissão neurosináptica mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) no sistema nervoso central, resultando em paralisia flácida e morte (Ikeda, 2003). Embora os seres humanos não possuam os canais específicos ativados por glutamato que se ligam à ivermectina, existem canais ativados por GABA que podem reagir à ivermectina (Wolstenholme, 2012). No entanto, a ivermectina é geralmente considerada segura em humanos, mas tóxica para organismos, como os mosquitos.

O ativo é prontamente absorvido em humanos após a ingestão (Edwards, 1988) e atinge concentrações plasmáticas máximas em até quatro horas

(Elkassaby, 1991). No entanto, é rapidamente metabolizada, com uma meia-vida de cerca de 18 horas (Merck, 2009). A Ivermectina é amplamente distribuída no corpo, principalmente nos tecidos adiposos (González, 2008), e foram observadas concentrações elevadas em indivíduos com índice de massa corporal elevado (Ouédraogo, 2015).

O fármaco não é recomendada em áreas co-endêmicas para *Loa loa*, pois reações adversas graves, incluindo encefalopatia, sinais neurológicos extrapiramidais e, em casos extremos, morte, foram associadas ao seu uso (Boussinesq, 2001; Gardon, 1997). A Ivermectina também não é recomendada para uso por mulheres grávidas (Nicholas, 2020) e crianças menores de cinco anos (Farrar, 2013).

A ivermectina pode reduzir a transmissão da malária ao encurtar a expectativa de vida dos mosquitos *Anopheles* expostos ao medicamento. Para ter impacto, o efeito endectocida deve ser mantido por tempo suficiente para limitar a capacidade do vetor. Isso pode ser alcançado administrando doses mais altas, doses múltiplas ou usando preparações de liberação lenta. No entanto, a eficácia deve ser equilibrada em relação ao risco de efeitos colaterais, que podem aumentar com doses mais elevadas (Chaccour, 2017). Estudos de modelagem previram que a ivermectina poderia ter um efeito significativo quando usada sozinha ou como uma intervenção complementar em áreas de alta transmissão, em locais adequados para eliminação, e pode ser mais eficaz em regiões com temporadas curtas de transmissão (Slater, 2020). No entanto, esses modelos se baseiam em dados de mosquitos criados em laboratório, que podem se comportar de maneira diferente em comparação com os mosquitos selvagens (Slater, 2020).

O efeito endectocida da ivermectina tem sido estudado principalmente por meio de experimentos *in vitro*, nos quais mosquitos criados em laboratório se alimentam de preparações de ivermectina por meio de uma membrana, e por estudos *in vivo*, nos quais os mosquitos se alimentam do sangue de indivíduos após terem ingerido ivermectina oralmente (Alout, 2014; Chaccour, 2015; Derua, 2015; Foley, 2000; Kobylinski, 2011). Esses estudos demonstram que o efeito na mortalidade dos mosquitos depende da concentração do medicamento no sangue e do tempo que as concentrações do medicamento permanecem acima do limiar letal. Efeitos subletais da ivermectina também foram descritos, incluindo tempo retardado para nova alimentação, inibição do desenvolvimento de

esporozoítos e reduções na fertilidade e na taxa de eclosão dos ovos (Chaccour, 2017).

### 3.3 Nanocápsulas

Segundo o The National Nanotechnology Initiative (NNI), a nanotecnologia é definida como uma ciência, engenharia e tecnologia conduzida em nanoescala, a qual pode ser aplicada em uma variedade de campos a partir de conhecimentos de química, física e biologia (NNI, 2020). O prefixo 'nano' da palavra nanotecnologia é referido ao prefixo grego que significa anão ou algo muito pequeno, ao qual compreende um milionésimo do metro ou  $10^{-9}$  m (BAYDA *et al.*, 2020).

De um modo geral, a escala das nanopartículas (NPs) e materiais nanoestruturados compreende aproximadamente de 1 a 1000 nm em diâmetro. Dentro desse contexto, as nanopartículas são dispersões ou estruturas coloidais sólidas, compostas de polímeros naturais, semi-sintéticos ou sintéticos, as quais são capazes de carrear uma molécula terapêutica, seja ela dissolvida, absorvida, quimicamente anexada ou encapsulada no sistema. Devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e versatilidade na aplicação, as NPs têm sido extensivamente investigadas (BARAGANA *et al.*, 2015).

Devido a essa ordem de tamanho em escala nano, a concentração de átomos sobre a superfície destes sistemas representa até 90% da sua massa total, e isso resulta em maior reatividade. Essa característica pode acarretar em materiais com propriedades biológicas distintas, funcionalidades específicas e solubilidade melhorada sob condições fisiológicas, além de tornar a nanotecnologia mais atrativa em diversas áreas (FAROKHZAD; LANGER, R., 2009; JEEVANANDAM *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2017).

Dentre os campos com maior aplicação nanotecnológica, destaca-se o uso de sistemas de liberação controlada de fármacos, que é o método ou processo de administração de um composto ou fármaco com efeitos terapêuticos em humanos ou animais (TIWARI, *et al.*, 2012). De fato, o maior objetivo destes sistemas é "liberar o fármaco no tempo certo, a uma quantidade certa de

concentração e em um sítio alvo específico.” (BHEEMIDI e TIRUCKOVELA e VARANASI, 2011).

Os nanocarreadores apresentam diversas vantagens, tais como a entrega controlada de fármacos pouco solúveis em água, o direcionamento específico de ativos ao sítio-alvo, e também reduzem a toxicidade do ativo. Além disso, os nanocarreadores propiciam a proteção do fármaco contra a degradação extracelular, reduzem a frequência de administração e duração do tratamento, e melhoram seu perfil farmacocinético. O tamanho e reatividade das nanopartículas contendo fármaco encapsulado propiciam a transcitose eficaz através de barreiras epiteliais e endoteliais estreitas e rígidas, e, também, a entrega de grandes macromoléculas aos locais de ação intracelular (FAROKHZAD e LANGER, 2009; SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010; TIWARI, *et al.*, 2012).

A idealização de novos nanocarreadores com administração intravenosa deve levar em consideração que, na quimioterapia, a concentração plasmática máxima de um fármaco é proporcional aos seus efeitos tóxicos, e a eficácia é proporcional à área sobre a curva da concentração do fármaco no plasma. Dessa forma, em geral, os nanocarreadores são capazes de melhorar o perfil do fármaco no plasma e reduzir as doses empregadas na quimioterapia (WONG, J. *et al.*, 2008).

A eliminação do vetor e a quimioterapia efetiva para os pacientes são as táticas-chave para combater a malária. Entretanto, a resistência aos fármacos e as questões ambientais e sociais são os principais obstáculos no combate à esta doença. Uma possível solução para os problemas associados com os antimaláricos é o uso de nanomateriais, os quais podem funcionar como carreadores coloidais (tais como os lipossomas e micro/nanopartículas), fornecendo versatilidade na entrega de fármacos aos sítios ou alvos específicos ao longo do tempo, permitindo a liberação de forma controlada. Entre os nanossistemas disponíveis, as nanopartículas apresentam maiores vantagens, incluindo a biodisponibilidade, habilidade para melhorar o encapsulamento, farmacocinética e a atividade terapêutica do ativo (BARAGAÑA *et al.*, 2015).

Além disso, como o plasmódio é um parasito intracelular, outros aspectos biofarmacêuticos importantes no desenho de um sistema de entrega de fármacos devem ser considerados, incluindo a permeabilidade do fármaco através das

membranas celulares e o mecanismo de captação celular (DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007; IBRAHIM, N. *et al.*, 2014; MOSQUEIRA, *et al.*, 2004; NEVES BORGHETI-CARDOSO *et al.*, 2020). Dessa forma, no contexto da quimioterapia, os nanocarreadores se destacam por apresentarem a habilidade de permanecer no fluxo sanguíneo por um longo período de tempo, atingindo uma melhor interação com as hemácias e as membranas dos parasitos (RAHMAN, K. *et al.*, 2019; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010).

Estudos envolvendo o uso de lipossomas e nanopartículas vêm demonstrando as vantagens de utilizar nanossistemas como carreadores e potencializadores das atividades farmacológicas de antimaláricos. À exemplo, Rajendran e colaboradores (2018) mostraram que lipossomas contendo doxiciclina apresentaram  $CI_{50}$  38 vezes mais potente em reduzir o crescimento do *P. falciparum* em 48 horas quando comparado a doxiciclina livre ( $0,3 \pm 0,11 \mu M$  do lipossoma vs.  $14 \pm 1,7 \mu M$  da doxiciclina livre).

Kumar *et al.* (2015) desenvolveram nanopartículas contendo os antimaláricos PQ e dihidroartemisinina, esquizonticidas tecidual e sanguíneo, respectivamente, a fim de aumentar a captação destes fármacos pelos hepatócitos e alcançar a entrega efetiva nos sítios- alvo. Os achados demonstraram que ambos os fármacos encapsulados em nanopartículas foram capazes de eliminar completamente o *P. berghei* na menor dose testada ( $0,07 \text{ mmol/kg}$ ), e, além disso, foram capazes de proteger os animais tratados por mais de 35 dias sem apresentar recrudescência. Em ambos os fármacos a liberação adequada ao longo do tempo foi alcançada através do uso das nanoformulações, e resultou na inibição da progressão da parasitemia, acompanhada pela modulação do sistema imunológico, o qual forneceu uma melhor resposta frente ao parasito e possibilitou a total sobrevivência dos animais tratados.

A artemisinina conjugada a albumina sérica bovina também foi avaliada em outro modelo de nanoformulação. Esta conjugação foi idealizada uma vez que a albumina apresenta propriedades tensoativas que podem melhorar a molhabilidade e a biodisponibilidade do fármaco, diminuindo a agregação de partículas. Além disso, o seu uso aumenta as chances de ligação às hemácias infectadas pelo plasmódio, sendo seletivamente captada e degradada.

Assim, em comparação ao artesunato livre, a nanoformulação foi capaz de alcançar uma redução de 96% da parasitemia, similar ao que foi encontrado com o artesunato livre (redução de 92%). Além disso, este nanossistema permitiu a administração intravenosa da artemisinina sem o uso de solvente orgânico e promoveu alta biodisponibilidade (IBRAHIM, N. *et al.*, 2015).

Um estudo recente mostrou o desenvolvimento e a aplicação de uma formulação injetável de longa ação contendo nanopartículas de atovaquona como uma monoterapia ao invés de terapia combinada para a prevenção e o tratamento da malária. Como resultado, a formulação conferiu profilaxia de longa duração em camundongos C67BL/6 infectados com o *P. berghei* ANKA, bem como apresentou proteção no início da infecção através da eliminação dos parasitos do estágio hepático com uma concentração plasmática abaixo de 200 ng/ml. Os perfis farmacocinético e farmacodinâmico da formulação indicaram que a proteção pode ser translacionada à humanos a uma dose segura e protetiva por pelo menos um mês após uma única administração (BAKSHI *et al.*, 2018).

Apesar da nanotecnologia ainda ser pouco explorada como intervenção terapêutica para malária, as nanoformulações contendo os antimaláricos têm demonstrado resultados promissores e mais eficazes frente ao plasmódio, quando comparado aos antimaláricos administrados livremente. Assim, idealizamos em nosso estudo nanoformulações contendo ivermectina.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Nanocápsulas

#### 4.1.1 Materiais

Poli( $\epsilon$ -caprolactona), ivermectina, monooleato de sorbitano (Span 80) e polissorbato 20 (Tween 20) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Óleo de Semente de Abóbora (PSO), derivado de Cucurbita pepo L. foi obtido por prensagem com temperatura de evaporação a partir de 110C, fornecidos pela ACQ & GBM Comércio e Desenvolvimento Ltda (Brasília, Brasil). Acetona e álcool etílico foram adquiridos da Química Moderna (São Paulo, Brasil). Para cromatografia líquida, O acetonitrilo LiChrosolv® HPLC gradiente foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Milli-Q®água foi utilizada. Todas as pesquisas foram realizadas de acordo com o Sistema Nacional de Governança do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen, Brasil) sob o registro AD56712. ((SOUZA ZILYANE, 2022).

#### 4.1.2 Preparação de nanocápsulas

As NCs foram preparadas usando o método de nanoprecipitação, misturando as fases orgânica e aquosa. Assim, x1 (50- 200 mg) de óleo de semente de abóbora, x2 (20-60 mg) de PCL e 12 mg de Span®80 foram solubilizados em 6 mL de acetona para produzir a fase orgânica. Esta fase foi suavemente injetada gota a gota em 7 mL da fase aquosa contendo 12 mg de Tween®80 e homogeneizado por 20 min a 50 rpm a 25°C (Fisher-Bioblock Scientific AM 3001 K, Illkirch, França). A dispersão coloidal obtida foi concentrada por evaporador rotativo por 40 min (200 rpm/40 °C/65 mBar) (BÜCHI Rotavapor R-125, banho de aquecimento B-491, bomba de vácuo V-700, recirculação Chiller F-108, Flawil, Suíça) para eliminar o solvente. As nanocápsulas foram armazenadas em 4°C por 24 horas antes da caracterização.

### 4.1.3 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio e o índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas foram estimados em triplicata pelo método de espalhamento dinâmico da luz (DLS), enquanto que o potencial zeta ( $\zeta$ ) foi medida por anemometria laser doppler. Ambas as análises foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, UK). Este equipamento baseia-se no direcionamento de um feixe de luz sobre uma amostra em suspensão e calcula o espalhamento decorrido do movimento Browniano das partículas. Dessa forma, para cada avaliação destes parâmetros, uma alíquota de 1 ml de cada lote em suspensão foi inserida em cubeta e as leituras foram realizadas a um ângulo de detecção fixo de 173° e à temperatura de 25°C. As análises de cada amostra foram realizadas automaticamente pelo Zetasizer Software.Ink 7.12 (Malvern Instruments, UK), o qual exibe o resultado em tempo real.

### 4.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliar a morfologia das NCs Vazias e NC-IVM, o MET, modelo JEM-1230 (JEOL), da plataforma de microscopia do Instituto Gonçalo Moniz — FIOCRUZ/Bahia foi utilizado com auxílio do Serviço de Microscopia Eletrônica. Inicialmente, no preparo das amostras, uma alíquota de 20  $\mu$ l de nanopartículas em suspensão vazias ou carregadas, contendo ou não trealose, foi aplicada sobre uma grade de cobre revestida com fino filme de carbono e deixada secar por 2 minutos. Após este tempo, o excesso da amostra foi delicadamente removido com papel absorvente, e, em seguida, a suspensão foi contrastada com acetato de uranila a 2%, a qual permitiu a visualização das nanopartículas pelo microscópio.

## 4.2 Ensaio de citotoxicidade em células de mamíferos

A IVM base livre e NC-IVM foram testados quanto à citotoxicidade *in vitro* em duas linhagens celulares de mamíferos, J774 (macrófagos murinos) e HepG2

(carcinoma hepatocelular humano), e a viabilidade celular foi determinada por bioluminescência usando o kit CellTiter-Glo (Promega, Madison, EUA). As linhagens foram mantidas em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e suplementado com L-glutamina, vitaminas e aminoácidos em frascos de 75cm<sup>2</sup> a 37°C, e manutenção sendo realizada duas vezes por semana. Culturas entre 60 a 80% de confluência foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura para posterior contagem e plaqueamento.

Para o ensaio, foram adicionadas  $4 \times 10^4$  células por poço em placas brancas de fundo chato de 96 poços, e as mesmas foram incubadas por 24 horas à 37°C. Após o tempo de incubação, alíquotas dos compostos (solução estoque em DMSO) diluídas em série de fator 2, cobrindo 7 concentrações diferentes (80 - 1,25 µM), foram plaqueadas em triplicatas, e as placas foram incubadas por mais 72h. Os controles incluíram poços apenas com células e meio DMEM (controle negativo), apenas meio (branco) e poços contendo violeta de genciana em concentrações seriadas (20 µM — 0,312 µM) como controle positivo para citotoxicidade. Após incubação por 72 h a 37°C, as placas foram mantidas em temperatura ambiente durante 30 minutos, o meio de cultura foi removido e o volume de 100 µL da solução contendo o reagente CellTiter-Glo® foi adicionado a cada poço. A bioluminescência foi medida usando um leitor de microplacas Filtermax™ F3 & F5 Multi-Mode instrument (Molecular Devices, San Jose, EUA) e software Softmax. (Pharmaceuticals, 2021).

### **4.3 Atividade antiparasitária *in vivo***

#### **4.3.1 Animais**

Camundongos Swiss Webster foram obtidos e alojados nas instalações do IGM-FIOCRUZ. Os animais foram mantidos em gaiolas climatizadas com filtro de ar e acesso irrestrito a comida e água. O Comitê de Ética em Experimentação animal aprovou os procedimentos experimentais (CEUA) sob o número L-IGM-019/2021.

#### 4.3.2 Manutenção do *Plasmodium berguei* in vivo

Para a manutenção da cepa do *Plasmodium berguei* (pbGFP) in vivo, o camundongo Swiss Webster, com parasitemia entre 1 a 10% é anestesiado com solução de quetamina, xilazina e diazepam para coleta sanguínea. Após anestesiado o animal é realizada a coleta de sangue infectado, com as formas assexuadas do parasito pelo plexo braquial e em seguida é feita a transferência do material coletado para eppendorfs contendo 200 µL de heparina sódica para evitar a aglutinação sanguínea. O sangue coletado é centrifugado à 1500 rpm durante 5 minutos, retirado o plasma e lavado com salina. O pellet resultante é utilizado para posterior contagem de hemácias parasitadas e do hematócrito para, por fim, inocular de  $1 \times 10^6$  hemácias infectadas em um animal saudável e realizar a passagem do plasmódio

#### 4.3.3 Ensaio de toxicidade aguda

Para o ensaio de toxicidade aguda foram utilizados 10 camundongos suíços machos saudáveis. Inicialmente, os animais não infectados foram pesados e separados de acordo com a similaridade dos seus pesos em dois grupos com  $n=5$ . Em um grupo foi administrado 200 µL/animal de IVM base livre e o outro grupo recebeu 100 µL/animal de NC-IVM por via intraperitoneal (i.p.). Para o cálculo de dose da IVM base livre foi considerada a dose de 10 mg/kg, solubilizado em 30% de DMSO e 70% de solução dispersante. Para o cálculo de dose das nanocápsulas de ivermectina foi considerado 10 mg/kg, sendo utilizado um volume de 4,8 mL de suspensão das NC-IVM. Todos os animais foram tratados com seus respectivos tratamentos ao mesmo tempo, uma vez ao dia, durante 4 dias. Após os dias de tratamento foi observada a sobrevivência. Vale ressaltar que os animais tratados com a IVM base livre foram tratados equivocadamente com 200 µL de fármaco, mantendo-se a mesma dose nos dias subsequentes.

#### 4.3.4 Ensaio de atividade antiparasitária *in vivo* (metodologia de Peters)

A avaliação da supressão de parasitemia foi feita através da metodologia de Peters (PETERS *et al.*, 1975). Camundongos Swiss Webster, machos, com peso de 18-22g ( $n=5$ ) foram infectados por inoculação intraperitoneal com  $1 \times 10^6$  eritrócitos parasitados pelo *P.berghei* — GFP. Após 24 horas da infecção, os animais foram tratados por via i.p., com 100  $\mu$ L de IVM base livre, NC-IVM e NC — BLANK, com a dose de 10mg/kg, cada grupo com seu respectivo composto. O tratamento foi realizado uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos. A atividade antiparasitária foi determinada pela avaliação da parasitemia por citometria de fluxo nos dias 7 e 8 após infecção. A sobrevivência foi monitorada todos os dias durante 30 dias após a infecção.

#### 4.4 Estudo da farmacocinética

##### 4.4.1 IVM base livre

Para o estudo experimental da farmacocinética da IVM base livre foram utilizados 24 camundongos suíços machos não infectados, os quais foram divididos em 6 grupos com  $n=4$ . Todos os animais foram pesados para cálculo da dose de 10 mg/kg, sendo a ivermectina BL solubilizada em 80% DMSO e 20% em salina estéril. Foi administrado 100  $\mu$ L do fármaco por animal através da via i.p.. Cada grupo representou um horário de coleta, conforme identificados na tabela abaixo (Tabela 2). Em cada tempo foram coletados plasma e sangue. Contudo, nos grupos de 1 h, 18 h e 48 h, além do plasma e sangue, o fígado também foi coletado.

**Tabela 2.** Estudo da farmacocinética – IVM base livre.

<b>Grupo</b>	<b>Tempo de coleta após tratamento</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Coleta</b>
1	15 min	4	Plasma, sangue
2	1h	4	Plasma, sangue, fígado
3	2h	4	Plasma, sangue
4	6h	4	Plasma, sangue
5	18h	4	Plasma, sangue, fígado
6	48h	4	Plasma, sangue, fígado

#### 4.4.2 Nanocápsulas de Ivermectina

Para o estudo experimental da farmacocinética da ivermectina nanocápsulas foram utilizados 28 camundongos suíços machos não infectados, os quais foram divididos em 7 grupos N = 4. Todos os animais foram pesados para cálculo da dose de 10mg/kg. Foi administrado 100 µL do fármaco por animal através da via intraperitoneal. Cada grupo representou um horário de coleta, conforme indicado na tabela abaixo (Tabela 3). Em cada grupo foi coletado plasma e sangue. Entretanto, nos grupos de 1h, 18h, 48h e 72h, além do plasma e sangue, o fígado também foi coletado. As amostras coletadas foram quantificadas e analisadas pela Universidade Federal de Pernambuco.

**Tabela 3.** Estudo da farmacocinética – NC-IVM

<b>Grupo</b>	<b>Tempo de coleta após tratamento</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Coleta</b>
1	15min	4	Plasma, sangue
2	1h	4	Plasma, sangue, fígado
3	2h	4	Plasma, sangue
4	6h	4	Plasma, sangue
5	18h	4	Plasma, sangue, fígado
6	48h	4	Plasma, sangue, fígado
7	72h	4	Plasma, sangue, fígado

#### 4.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Comparações entre os grupos foram feitas pelo teste ANOVA com correção utilizando o pós-teste de correção Newman-Keuls, aplicado quando os valores mensurados são normalmente distribuídos. Os gráficos gerados e as análises estatísticas foram calculadas usando o software Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). O valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

#### 4.6 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão dos ensaios *in vitro* realizados foram a utilização de linhagens celulares específicas, a J774 e a HepG2, devido ao grupo que cada uma dessas linhagens representam, macrófagos murinos e hepatocarcinoma humano, respectivamente. Além desse critério, foi estabelecido o uso das nanoformulações com até 6 meses de sintetizadas, devido a liberação progressiva do fármaco durante esse período. Os critérios de exclusão para o ensaio de citotoxicidade abrange células contaminadas, nanoformulações com precipitado e não homogêneas.

Os critérios de inclusão utilizados nos ensaios *in vivo* compreendem camundongos suíços (Swiss Wesbter), devido ao seu sistema imunológico ser mais desenvolvido que as outras linhagens disponíveis, com peso entre 15 a 25g. Além disso, para infecção dos camundongos foi utilizado o *Plasmodium berghei* ANKA Luciferase, devido a sua semelhança na manifestação da doença com o *P.falciparum* em humanos. Para o tratamento dos animais foram utilizadas nanoformulações com até 6 meses de sintetizadas.

Como critérios de exclusão para os ensaios *in vivo*: camundongos machucados; *Plasmodium berghei* ANKA Luciferase sem o sinal da luciferase adequado e nanoformulações com precipitado e não homogêneas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaio de citotoxicidade

Para o experimento de citotoxicidade IVM base livre, NC-IVM e NC - BLANK foram testados *in vitro* em duas linhagens celulares de mamíferos, J774 (macrófagos murinos) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), e a viabilidade celular foi determinada por bioluminescência usando o kit CellTiter-Glo (Promega, Madison, EUA). Foram testadas 7 concentrações diferentes (80 - 1,25  $\mu\text{M}$ ), plaqueadas em triplicatas, e as placas foram incubadas por mais 72h. Os controles incluíram poços apenas com células e meio DMEM (controle negativo), apenas meio (branco) e poços contendo violeta de genciana em concentrações seriadas (20  $\mu\text{M}$  – 0,312  $\mu\text{M}$ ) como controle positivo para citotoxicidade. Como resultado obtivemos os valores descritos na tabela (tabela 4) abaixo:

**Tabela 4.** Valor da concentração inibitória média da atividade enzimática celular (IC<sub>50</sub>).

Compostos	IVM base livre	NC - IVM	NC – BLANK	VG
<b>Linhagens celulares</b>	Citotoxicidade (IC <sub>50</sub> +/- SEM $\mu\text{M}$ )			
HepG2	15,77 +/- 2,09	23,125 +/- 0,455	16,545 +/- 1,025	<1,25
J774	9,9715 +/- 1,08	9,763 +/- 3,477	7,705 +/- 2,495	<1,25

\*SEM: Erro padrão da média

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que na linhagem celular da HepG2 a concentração inibitória média da ação enzimática celular é maior que na linhagem da J774, indicando que a HepG2 suporta maiores concentrações dos compostos testados. Além disso, a NC – IVM na HepG2 apresentou um IC<sub>50</sub> maior que a IVM base livre e as NC – BLANK, demonstrando ser a menos tóxica.

Já na linhagem da J774 a NC- BLANK demonstrou ser a menos tóxica, enquanto que a NC – IVM é levemente menos tóxica que a IVM base livre,

demonstrando que nas duas linhagens celulares a NC – IVM representa uma formulação menos tóxica que a IVM base livre, sendo um dado importante na avaliação da toxicidade das nanocápsulas, visto que, a IVM base livre possui uma alta toxicidade quando administrada em dosagens mais elevadas para o tratamento da malária.

## 5.2 Ensaio de Toxicidade Aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado com 10 camundongos suíços machos. Os animais não infectados foram divididos em dois grupos  $n=5$ . Em um dos grupos foi administrado a IVM base livre e no outro NC -IVM, ambos os grupos com administração dos fármacos por via i.p. de 100  $\mu$ L por animal. Conforme apresentado na tabela abaixo (Tabela 5) ao final dos 4 dias de tratamento foi observado a sobrevivência dos animais e se obteve como resultado:

**Tabela 5.** Taxa de sobrevivência do *in vivo* com IVM base livre e NC – IVM

<b>Grupo experimental (N=5)</b>	<b>Dose (mg/kg)</b>	<b>Taxa de sobrevivência (%)</b>
Ivermectina Base Livre (IVM BL)	4x 10mg/kg Uma vez ao dia	3/5 (60%)
Nanocápsulas de ivermectina (IVM/NC)	4x 10mg/kg Uma vez ao dia	5/5 (100%)

A partir dos resultados obtidos com o ensaio de toxicidade aguda pode-se concluir que a ivermectina de base livre apresentou maior toxicidade, com dois óbitos dos representantes do seu grupo. Enquanto que as nanocápsulas de ivermectina apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100%, não havendo óbitos em seu grupo.

Desse modo, pode-se concluir que a administração do fármaco através das nanocápsulas indica uma diminuição da sua toxicidade aguda, importante fator para a administração do medicamento em humanos, visto que, um dos problemas da ivermectina é a sua toxicidade em doses mais elevadas, o que dificulta o ajuste de dose e conseqüentemente o seguimento terapêutico.

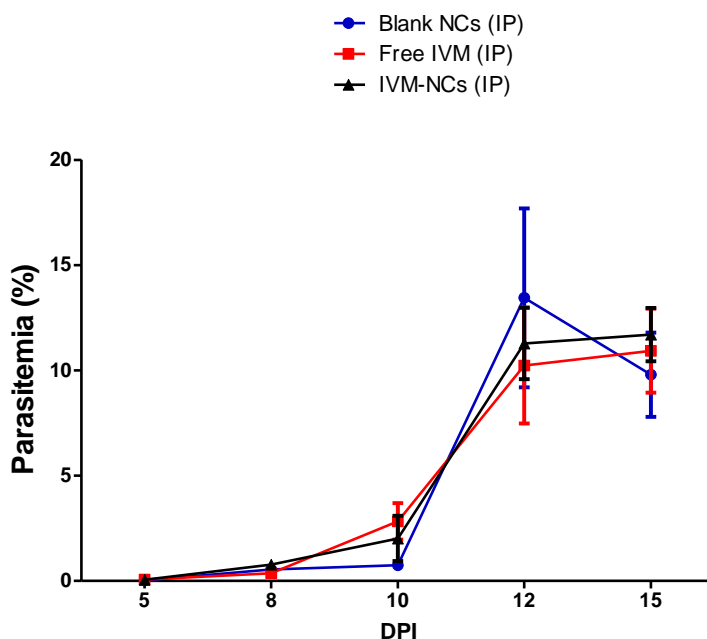
Entretanto, como descrito na metodologia desse ensaio houve um erro na administração da ivermectina BL, foi administrado em todos os animais do grupo

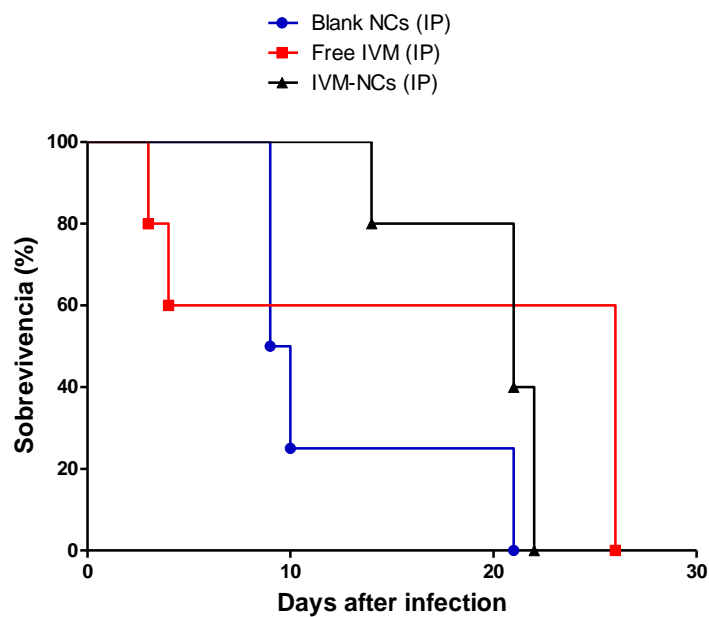
durante os 4 dias de tratamento 200uL de fármaco, invés dos 100uL proposto inicialmente. Ou seja, os animais da IVM BL receberam o dobro da dose administrada nos animais da IVM/NC, logo, a menor taxa de sobrevivência do grupo e a maior toxicidade indicada podem estar relacionadas ao erro da dose administrado. Assim, para uma análise mais concreta é necessário novos ensaios de toxicidade aguda utilizando a mesma dosagem das duas formulações de ivermectina.

### 5.3 Ensaio de atividade antiparasitária in vivo (metodologia de Peters)

O ensaio de Peters realizado com os compostos IVM base livre, NC-IVM e NC – BLANK em 3 grupos de camundongos Swiss webster, machos ( $n=5$ ), obteve como resultado os dados expressos nos seguintes gráficos (Gráfico 1; Gráfico 2) e tabela (Tabela 6):

**Figura 6.** Gráfico de percentual de parasitemia após infecção e tratamento



**Figura 7.** Gráfico de percentual de sobrevivência após infecção e tratamento**Tabela 6.** Sobrevivência dos animais ao longo de 40 dias após infecção.

Compounds	Doses $\mu\text{mol/kg}$ (mg/kg)	%of parasitemia inhibition <sup>a</sup>	Median of survival (days)	Number of mice alive after 40 dpi (%) <sup>b</sup>
NC - BLANK (IP)	10	-, -	9.5	0/5 (0)
IVM BL (IP)	10	-, -	26	0/5 (0)
NC - IVM (IP)	10	-, -	21	0/5 (0)

A partir da análise dos gráficos é possível concluir que nenhum dos três compostos foram capazes de interromper a infecção, sendo os três grupos testados

com parasitemia muito próximas ao longo dos 15 primeiros dias após infecção, como mostra o gráfico 1. O que levou à óbito todos os animais dos três grupos testados, provando que nenhum dos tratamentos foi realmente eficaz no combate a doença. Entretanto, os animais tratados com NC – IVM tiveram um tempo de vida mais longo do que os animais tratados com a IVM base livre e NC - BLANK.

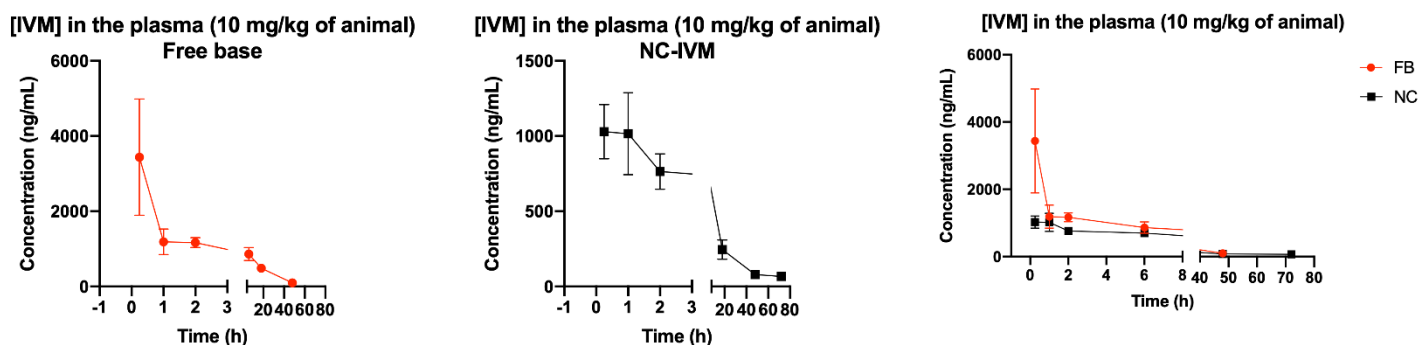
O grupo da IVM base livre apresentou seus dois primeiros óbitos antes do décimo dia após infecção e tratamento, enquanto que os animais tratados com as NC – IVM tiveram seu primeiro óbito no décimo quinto dia após a infecção, o que representa um atraso no avanço da doença.

Desse modo, podemos concluir que nas doses testadas nenhum dos três tratamentos foi eficaz, porém o grupo tratado com NC – IVM teve uma maior sobrevivência com relação aos animais tratados com os outros dois tratamentos, principalmente com o grupo da IVM base livre, tendo uma diferença entre seus primeiros óbitos de 10 dias.

#### 5.4 Estudo da Farmacocinética

Para o estudo experimental da farmacocinética da IVM base livre foram utilizados 24 camundongos suíços machos não infectados, os quais foram divididos em 6 grupos N = 4. No estudo experimental da farmacocinética da IVM – NC foram utilizados 28 camundongos suíços machos não infectados, os quais foram divididos em 7 grupos N = 4. Todos os animais, de ambos os ensaios de farmacocinética, foram administrados com uma dose de 100uL do seu respectivo fármaco através da via intraperitoneal, sendo posteriormente coletado sangue, plasma e fígado. Obtendo-se como resultados comparativos expressos na figura (figura 3) e tabela (tabela 7):

**Figura 3:** Concentração plasmática de IVM BL e NC-IVM ao longo do tempo



**Tabela 7.** Concentração máxima plasmática e tempo de meia vida da IVM base livre e NC-IVM

	<b>Unidades de medida</b>	<b>IVM - BL</b>	<b>NC – IVM</b>
<b>Concentração Máxima (C<sub>máx</sub>)</b>	ng/mL	2787,0483	1029,7903
<b>T <math>\frac{1}{2}</math> (tempo de meia vida)</b>	Horas	16,868184	19,377057

A partir da análise dos gráficos e da tabela 4 pode-se concluir que as NC - IVM, como esperado, possuem uma liberação mais lenta do fármaco, expressando uma concentração máxima plasmática (C<sub>máx</sub>) reduzida, porém mais constante ao longo do tempo e com um menor decaimento da sua concentração, quando comparada a IVM base livre. Esses dados também explicam a toxicidade reduzida das NC-IVM em detrimento da IVM base livre.

As NC-IVM não parecem ter efeito de depósito, apesar de serem bastante lipossolúveis com uma ampla permeabilidade e distribuição. Apesar das conclusões feitas com a análise dos gráficos a curva da IVM base livre se mostrou melhor que a das nanocápsulas de ivermectina. Uma possível razão para isso é o fato de tempos importantes para um sistema de liberação lenta não terem sido contabilizados.

## 6 DISCUSSÃO

A toxicidade apresentada pela ivermectina devido sua afinidade pelos canais gabaérgicos é um obstáculo que precisa ser contornado na administração do fármaco. Os resultados apresentados no ensaio de citotoxicidade celular utilizando as nanoformulações de ivermectina com menos de 6 meses da sua síntese se mostraram positivos nas duas linhagens celulares testadas, sendo zero tóxicas até na maior concentração da placa. Entretanto, as nanopartículas testadas com mais de 6 meses após sua produção apresentaram toxicidade inferior à da ivermectina base livre, porém ainda foram tóxicas as células.

Segundo Souza *et al.* (2023) as nanocápsulas lipídicas não tiveram modificações em seus aspectos físicos (tamanho e conteúdo da droga) em 180 dias de observação, sendo armazenadas em temperaturas de 25°C e 4°C. Esse resultado pode ser explicado pela liberação gradual do fármaco encapsulado que ocorre ao longo dos meses após sua produção, ou seja, a toxicidade apresentada pelos nanocarreadores no primeiro ensaio com as células é advinda do fármaco que já estava desencapsulado da nanocápsula lipídica. Esses resultados demonstram que o nanocarreador testado é seguro para o armazenamento do fármaco de forma atóxica em um período de até 6 meses.

O ensaio de toxicidade aguda realizado com 10 camundongos suíços machos não infectados demonstrou resultados positivos para o grupo tratado com as nanocápsulas lipídicas, obtendo um percentual de 100% de sobrevivência dos animais desse grupo, enquanto que o grupo de animais tratados com a ivermectina base livre apresentou um percentual de 60% de sobrevivência. Com esse experimento pode-se concluir que a ivermectina não encapsulada apresentou maior toxicidade, com dois óbitos dos representantes do seu grupo.

Os principais objetivos no projeto de nanopartículas como um sistema de distribuição são controlar o tamanho das partículas, as propriedades de superfície e a liberação de agentes farmacologicamente ativos para alcançar a ação específica do local do medicamento na taxa e regime de dosagem terapêuticamente ideais (Elmarzugi *et al.*, 2023, p. 8). Assim, entende-se que a administração do fármaco através das nanocápsulas indica uma diminuição da sua toxicidade aguda, visto que, a liberação gradual da ivermectina diminui sua concentração plasmática total ao longo do tempo, importante fator para a administração do medicamento em humanos, uma

vez que, um dos problemas do medicamento é a sua toxicidade em doses mais elevadas, o que dificulta o ajuste de dose e conseqüentemente o seguimento terapêutico.

Os resultados do segundo ensaio realizado *in vivo* com camundongos infectados com *plasmodium* demonstraram que nenhum dos grupos tratados (IVM BL; NC-IVM; NC-BLANK) foram capazes de interromper o avanço da infecção e tratar a doença, pois todos os animais vieram a óbito em até 30 dias após a administração do tratamento. O grupo da IVM base livre apresentou seus dois primeiros óbitos antes do décimo dia após infecção e tratamento, enquanto que os animais tratados com as NC – IVM tiveram seu primeiro óbito no décimo quinto dia após a infecção.

Por conseqüente, nenhum dos tratamentos foi eficaz. Sendo assim, algumas das explicações possíveis para a falha da terapia medicamentosa seriam: a dosagem inadequada do fármaco, sendo necessário um ajuste de dose; um avanço acelerado da parasitemia, visto que, a cepa de *plasmodium* utilizada para infecção dos animais é geneticamente modificada e mais agressiva, tendo uma maior virulência na infecção dos camundongos, o que necessitaria de mais dias de tratamento e/ou uma maior dosagem. Além disso, outra explicação poderia estar diretamente ligada ao fármaco, o qual pode não ser a melhor opção de tratamento para a malária, uma vez que, a ivermectina possui sua ação focalizada no estágio hepático da doença, perdendo seu poder de ação quando o *plasmodium* avança o seu ciclo para o estágio sanguíneo.

Apesar de nenhum dos tratamentos terem sido eficazes, o grupo das NC – IVM tiveram seu primeiro óbito no décimo quinto dia após infecção e tratamento, diferente do grupo da IVM base livre, que tiveram seu primeiro óbito no quinto dia após infecção e tratamento. Esse resultado pode ser explicado pela liberação mais lenta e continua do fármaco encapsulado, que teve a ação do medicamento postergada quando em comparação a ivermectina base livre, aumentando a sobrevivência dos animais tratados com a nanoformulação.

A tecnologia tem sido aplicada para desenvolver diferentes formulações de medicamentos e sistemas de administração para otimizar a potência farmacológica da IVM e de outras lactonas macrocíclicas atualmente disponíveis (Hennessy1997). A abordagem mais promissora para melhorar a formulação está em sistemas de entrega inovadores usando veículos com propriedades físico-químicas definidas. Assim, o ensaio da farmacocinética realizada *in vivo* busca compreender como o

fármaco encapsulado se comporta no organismo em comparação ao fármaco não encapsulado.

Os resultados obtidos demonstram diferentes valores de concentração plasmática máxima e tempo de meia vida do fármaco encapsulado e não encapsulado. As NC - IVM, como esperado, possuem uma liberação mais lenta do fármaco, expressando uma concentração máxima plasmática ( $C_{m\acute{a}x}$ ) reduzida, porém mais constante ao longo do tempo e com um menor decaimento da sua concentração, quando comparada a IVM base livre, que possui um pico expressivo da sua  $C_{m\acute{a}x}$  seguida de um decaimento abrupto da sua concentração após uma hora da sua administração. Esses dados também explicam a toxicidade reduzida das NC-IVM em detrimento da IVM base livre, uma vez que, com a  $C_{m\acute{a}x}$  diminuída a toxicidade da ivermectina é inferior.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A IVM tem um grande potencial terapêutico em certos estágios evolutivos do plasmódio (esporozoítos e estágios sexuais). Todavia, nos estágios sanguíneos assexuais, a concentração ou dose necessária para inibir o crescimento do parasito é relativamente elevada, apresentando efeitos tóxicos. Aqui nesse trabalho, nós observamos que o emprego da nanotecnologia de cápsulas lipídicas contendo IVM aumentou sua solubilidade lipídica e de permeabilidade celular, diminuiu os efeitos tóxicos agudos e apresentou um perfil de distribuição plasmática distinta da IVM não formulada; os resultados como um todo indicam um potencial terapêutica desta tecnologia no tratamento de doenças infecciosas.

O cenário atual do combate a malária tem demonstrado a carência de inovações para o controle e erradicação da doença, uma vez que as diferentes cepas de *Plasmodium* vêm desenvolvendo resistência aos antimaláricos atuais. Assim, o desenvolvimento de novos medicamentos e inovações nas fórmulas farmacêuticas para uma melhor administração, distribuição e conseqüentemente maior biodisponibilidade do fármaco se mostram cada vez mais necessárias.

Desse modo, as NC – IVM estão apresentando resultados promissores nos ensaios *in vitro* e *in vivo* para os testes toxicológicos, sendo menos tóxicos que a IVM base livre. Nos testes farmacocinéticos demonstraram uma liberação mais lenta e controlado do fármaco. Entretanto, mais testes e ensaios em diferentes concentrações e variadas vias de administração ainda precisam ser testados para validar sua potência e eficácia, com o objetivo principal de aumentar o rendimento e eficácia das formulações nanoestruturadas de ivermectina diante da IVM base livre e se esses resultados levam a diminuição da sua toxicidade e ao aumento da biodisponibilidade do fármaco em humanos.

## REFERÊNCIAS

ALOUT, H.; KRAJACICH, B. J.; MEYERS, J. I.; GRUBAUGH, N. D.; BRACKNEY, D. E.; KOBYLINSKI, K. C.; et al. Evaluation of ivermectin mass drug administration for malaria transmission control across different West African environments. **Malaria Journal**, v. 13, p. 417, 2014.

BOUSSINESQ, M.; GARDON, M.; KAMGNO, J.; PION, S. D. S.; GARDON-WENDEL, N.; CHIPPAUX, J.-P. Relationships between the prevalence and intensity of *Loa loa* infection in the central province of Cameroon. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 95, n. 5, p. 495-507, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Descrição do processo de monitoramento dos testes de diagnóstico rápido de malária, Brasil, 2014 a 2016. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 50, p. 1-9.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Guia prático de tratamento da malária no Brasil*. Brasília, 2010.

BROWN, K. R.; RICCI, F. M.; OTTESEN, E. A. Ivermectin: effectiveness in lymphatic filariasis. **Parasitology**, v. 121, Supl., p. S133-S146, 2000.

BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S. A.; HARTMAN, R.; et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 361-367, 1979.

CHACCOUR, C.; HAMMANN, F.; RABINOVICH, N. R. Ivermectin to reduce malaria transmission. I. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations regarding efficacy and safety. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 161, 2017.

DERUA, Y. A.; KISINZA, W. N.; SIMONSEN, P. E. Differential effect of human ivermectin treatment on blood feeding *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 130, 2015.

ELKASSABY, M. H. Ivermectin uptake and distribution in the plasma and tissue of Sudanese and Mexican patients infected with *Onchocerca volvulus*. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 79-81, 1991.

FARRAR, J.; HOTEZ, P.; JUNGHANSS, T.; KANG, G.; LALLOO, D.; WHITE, N. J. *Manson's Tropical Diseases*. 23rd revised ed. UK: **Elsevier Health Sciences**, 2013.

FOLEY, D. H.; BRYAN, J. H.; LAWRENCE, G. W. The potential of ivermectin to control the malaria vector *Anopheles farauti*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 625-628, 2000.

GONZÁLEZ CANGA, A.; SAHAGÚN PRIETO, A. M.; DIEZ LIÉBANA, M. J.; FERNÁNDEZ MARTÍNEZ, N.; SIERRA VEGA, M.; GARCÍA VIEITEZ, J. J. The pharmacokinetics and interactions of ivermectin in humans - a mini-review. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 10, n. 1, p. 42-46, 2008.

IKEDA, T. Pharmacological effects of ivermectin, an antiparasitic agent for intestinal strongyloidiasis: its mode of action and clinical efficacy. **Nihon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacologica Japonica**, v. 122, n. 6, p. 527-538, 2003.

MACEDO, T.; BATISTA, A.; SOARES, M. Platinum (II)–chloroquine complexes are antimalarial agents against blood and liver stages by impairing mitochondrial function. **Metallomics**, p. 1548-1561, 2017.

MACEDO, T.; VEGAS, L.; PAIXÃO, M.; et al. Chloroquine-containing organoruthenium complexes are fast-acting multistage antimalarial agents. **Parasitology**, v. 143, n. 12, p. 1543-1556, 2016.

MAKUNDE, W. H.; KAMUGISHA, L. M.; MASSAGA, J. J.; MAKUNDE, R. W.; SAVAEEEL, Z. X.; AKIDA, J.; et al. Treatment of co-infection with bancroftian

filariasis and onchocerciasis: a safety and efficacy study of albendazole with ivermectin compared to treatment of single infection with bancroftian filariasis.

**Filaria Journal**, v. 2, n. 1, 2003.

MEYERS, J. I.; GRAY, M.; KUKLINSKI, W.; et al. Characterization of the target of ivermectin, the glutamate-gated chloride channel, from *Anopheles gambiae*. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, Pt 10, p. 1478-1486, 2015.

NICOLAS, P.; MAIA, M. F.; BASSAT, Q.; et al. Safety of oral ivermectin during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Global Health**, 2020, p. 92-100.

OUÉDRAOGO, A. L.; BASTIAENS, G. J.; TIONO, A. B.; et al. Efficacy and safety of the mosquitocidal drug ivermectin to prevent malaria transmission after treatment: a double-blind, randomized, clinical trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 3, p. 357-365, 2015.

OZ, B.; MAHMOUD, B. M.; MARSCHKE, C. K.; et al. Ivermectin distribution in the plasma and tissues of patients infected with *Onchocerca volvulus*. **European Journal of Clinical Pharmacology**, 1996.

PHARMACEUTICALS. Studies of Potency and Efficacy of an Optimized Artemisinin-Quinoline Hybrid against Multiple Stages of the Plasmodium Life Cycle. **Pharmaceuticals**, 2021.

SLATER, H. C.; FOY, B. D.; KOBYLINSKI, K.; et al. Ivermectin as a novel complementary malaria control tool to reduce incidence and prevalence: a modelling study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 498-508, 2020.

SOUZA, Z. Ameliorating the in vitro antiparasitic activity of the multifaceted drug ivermectin through a polymer nanocapsule formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, 2022.

WOLSTENHOLME, A. J. Glutamate-gated chloride channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40232-40238, 2012.

**World Health Organization (WHO), Malaria.** 2020.

HENNESSY, D. R. Modificando a formulação ou mecanismo de administração para aumentar a atividade de compostos anti-helmínticos. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 367-382, 1997.