



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CLOROQUINA E
DESETILCLOROQUINA EM AMOSTRAS DE SANGUE ADSORVIDAS EM
PAPEL DE FILTRO POR CROMATOGR AFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE UV**

Margareth Tavares Silva Nascimento

Belém-Pará

2008

MARGARETH TAVARES SILVA NASCIMENTO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CLOROQUINA E
DESETILCLOROQUINA EM AMOSTRAS DE SANGUE ADSORVIDAS EM
PAPEL DE FILTRO POR CROMATOGR AFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE UV**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
graduação em Doenças Tropicais do Núcleo
de Medicina Tropical – UFPA como requisito
exigido para a obtenção do grau de mestre.
Orientador: Dr. José Luiz Fernandes Vieira

Belém-Pará

2008

**Dados Internacionais de Catalogação -na-Publicação (CIP),
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical – NMT/UFPA**

Nascimento, Margareth Tavares Silva.

Validação de método para determinação de cloroquina e desetilcloroquina em amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV / Margareth Tavares Silva Nascimento; orientador, Dr. José Luiz Fernandes Vieira. – Belém: [s.n.], 2008.

89 f. il.

Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais)
– Universidade Federal do Pará, Núcleo de
Medicina Tropical, 2008.

1. Malária. 2. Drogas anti-maláricas. I. Título.

CDD 21. ed. 579.47

MARGARETH TAVARES SILVA NASCIMENTO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CLOROQUINA E
DESETILCLOROQUINA EM AMOSTRAS DE SANGUE ADSORVIDAS EM
PAPEL DE FILTRO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE UV**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical – UFPA como requisito exigido para à obtenção do grau de mestre.

Banca examinadora:

Profº Dr. José Luiz Fernandes Vieira (orientador)

Departamento de Deontologia e Medicina Legal, Instituto de Ciências da Saúde - UFPA

Profª Drª Marinete Marins Povoá

Instituto Evandro Chagas

Profª Drª Maria da Conceição Nascimento Pinheiro.

Núcleo de Medicina Tropical -NMT-UFPA

Profº Dr. Flávio de Vasconcelos

Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde - UFPA

Profº Dr. Jorge Pereira da Silva (suplente)

Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde - UFPA

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Conceito: _____

Belém-Pará

2008



Deus (amado pai), aos meus pais, irmão, marido e meu filho, companheiros de todas as horas... e fundamentais para o sucesso de mais uma etapa. Agradeço a vocês pela educação, amor e ensinamentos transmitidos ao longo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus (pai de amor) que através de Jesus tem demonstrado que me ama incondicionalmente. Amor que escuta, esclarece, briga...faz-me crescer...amo-te.

Agradeço a meus pais (Georgina e Odemar) por todos os incentivos. Palavras que ainda permeiam meus pensamentos... “estude para ser alguém na vida”...o destino não vos deu a oportunidade de estudar, porém, Deus deu a vocês filhos para realizar neles os seus mais belos sonhos...amo vocês.

Ao meu irmão Marcos Valério pela força no início dos meus estudos...os sonhos só se tornam realidade quando pessoas como você estão inserido nele...amo-te.

Falando de sonhos...agradeço a você meu esposo, amor e companheiro de tanto tempo...de todos os meus dias...”você sabe o quanto eu caminhei para chegar até aqui...” o meu sonho tornou -se realidade porque você acreditou em mim, lembro dos teus incentivos desde o ensino médio, aulas de matemática, física, química...brigas, reconciliações...”o fica”, o namoro, o casamento, a família e o filho (amor das nossas vidas)...enfim, quero te dizer que te amo (um amor meio doido de ser) ...são quase quinze anos juntos...repito: amo-te.

Ao meu filho Isan Neto meu eterno amor...o teu nascimento trouxe felicidade, força...a mamãe te ama...sempre...

A Maria Maia (outra mãe que Deus me deu) pela paciência em cuidar da minha família principalmente de meu filho.

Ao meu sogro e sogra (Isan e Dulce) por todo apoio na realização deste sonho.

Ao meu orientador José Luiz Vieira por todas as oportunidades... por acreditar a três anos atrás em uma pessoa que acabara de entrar em seu laboratório...as palavras seriam poucas para expressar toda a gratidão que sinto...disposição, entusiasmo, alegria, paciência, carinho, brigas...tudo faz

parte deste ambiente que vivemos no Laboratório de Toxicologia...nós crescemos um pouco...expresso meus sinceros agradecimentos...

Agradeço as minhas companheiras, a migas...Larissa, Tânia, Kariane e Daniella (fototóxicas)...a Lala tem razão somos cúmplices...será sempre um prazer trabalhar ao lado de vocês...Obrigada por toda ajuda...no momento em que mais precisei (que bom!) eu pude contar com vocês. Não posso esquecer: Priscila, Patricia, Juan, Adnielson, Felipe, Michelle...obrigada por toda ajuda.

Ao Profº Carlos Barros pelo convite para trabalhar no Laboratório de Toxicologia...este convite mudou o rumo da minha vida, agradeço de coração.

A amiga Glaécia por todo o apoio nas aulas do mestrado.

A amiga Ingrid por toda ajuda e apoio desde a graduação...você faz parte deste sonho...obrigada por me ajudar.

A querida Marly (Manaus) que disponibilizou as amostras dos pacientes para realização dessa pesquisa, meus sinceros agradecimentos também.

Quero agradecer ao seu Alberto Begot, Walquiria Viana, Sandra Tapajós e Dr. Reinaldo Braun pelas informações epidemiológicas cedidas.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente no decorrer deste trabalho meus sinceros agradecimentos.

“Há dois tipos de sabedoria: a inferior e a superior. A sabedoria inferior é medida por quanto uma pessoa sabe, e a superior, pela consciência que ela tem do que não sabe. Os verdadeiros sábios são os mais convictos da sua ignorância. Desconfiem das pessoas auto-suficientes. A arrogância é um atentado contra a lucidez e a inteligência. O mal neste mundo é que os estúpidos vivem cheios de si, e os sábios cheios de dúvidas”.

Augusto Cury/Bertrand Russel

RESUMO

Validação de método para determinação de cloroquina e de desetilcloroquina em amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV.

A determinação das concentrações sanguíneas de antimaláricos empregando métodos rápidos, simples e sensíveis, representa importante ferramenta para otimização dos esquemas terapêuticos adotados atualmente no Brasil. Neste sentido, este trabalho objetivou a validação de uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta para determinação de cloroquina em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro, oriundas de pacientes com malária vivax. Foram avaliados: precisão intra e inter ensaio, recuperação, limites de detecção e de quantificação, robustez, estabilidade, linearidade e seletividade. Os resultados demonstraram que os coeficientes de variação intra ensaio em concentrações de 100 a 1000 ng/mL variou de 6 a 10% tanto para cloroquina, quanto para desetilcloroquina. Os coeficientes de variação inter ensaio em concentrações de 100 a 1000 ng/mL variaram de 5 a 10% e 4 a 10% para cloroquina e desetilcloroquina, respectivamente. Os limites de detecção foram 62.5ng/mL para cloroquina e 50.0ng/mL para des etilcloroquina e os limites de quantificação foram 100ng/mL para ambos os analitos. A recuperação em concentração de 100 a 1000 ng/mL variou de 90 a 105% e 95 a 105%, para cloroquina e desetilcloroquina, respectivamente. O método foi linear em intervalo de concentração de 100 ng/mL a 2000 para cloroquina e de 100 a 800 ng/mL para desetilcloroquina. O método foi robusto para pequenas variações de fluxo, pH da fase móvel e composição da fase orgânica. Não foram observados interferentes no procedimento validado dentre aqueles fármacos utilizados no tratamento da malária. A determinação de cloroquina e desetilcloroquina em pacientes com malária vivax cujos valores médios foram de 1266 ± 455 ng/mL e 357 ± 165 ng/mL, caracterizaram a aplicabilidade do procedimento validado para a determinação deste antimalárico nestes pacientes.

Palavras-chave: Malária, Cloroquina, desetilcloroquina, CLAE/UV.

ABSTRACT

Validation of the Method for chloroquine and desethylchloroquine determination in blood samples of adsorbed in filter paper for high-performance liquid chromatographic with ultraviolet detection .

The determination of the antimalarial blood concentrations employing by fast simple and sensitive methods represents important tool for the optimization of therapeutic regimens currently used in Brazil. In this sense, this paper describes the validation of an analytical methodology by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of chloroquine in blood samples adsorbed on filter paper, from patients with vivax malaria. It was evaluated: precision intra and inter assay, recovery, limits of detection and quantification, robustness, stability, linearity and selectivity. The results showed that the coefficients of variation of intra assay, at concentrations of 100 to 1000 ng/ml ranged from 6 to 10% for both chloroquine and desethylchloroquine. The coefficient of variation inter assay, at concentrations of 100 to 1000 ng/ml ranged from 5 to 10% and 4 to 10% for chloroquine and desethylchloroquine, respectively. The limits of detection were 62.5 ng/mL for chloroquine and 50.0 ng/mL for desethylchloroquine and limits of quantification were 100 ng/mL for both analytes. The recovery in the concentration from 100 to 1000 ng/ml ranged from 90 to 105 % and 95% to 105 for chloroquine and desethylchloroquine, respectively. The method was linear in the range of concentration of 100 to 2000 ng/ml for chloroquine and 100 to 800 ng/ml for desethylchloroquine. The method showed to be robust for small changes in flow, pH of the mobile phase and composition of the organic phase. It was not observed interferences in the validated procedure among those drugs used to treat malaria. The determination of chloroquine and desethylchloroquine in patients with vivax malaria whose average values were 1266 ± 455 ng/mL and 357 ± 165 ng/mL, characterized the applicability of the validated procedure for the determination of antimalarial drugs in these patients.

Keywords: Malaria, chloroquine, desethylchloroquine, HPLC/UV.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Distribuição da malária no mundo	24
Figura 2.	Número de casos notificados de malária por estado (UF) da Amazônia legal, 2008.....	25
Figura 3.	Proporção de casos de malária por espécie de plasmódio na região Amazônica, 2008.....	25
Figura 4.	Ciclo de vida do parasito.....	28
Figura 5.	Fórmula estrutural da cloroquina	33
Figura 6.	Processo digestivo do eritrócito infectado com <i>P lasmodium</i>	34
Figura 7.	Fórmula estrutural da desetilcloroquina	35
Figura 8.	Papel de filtro com sangue total	49
Figura 9.	Esquema de extração da cloroquina e des etilcloroquina.....	50
Figura 10.	Representação gráfica da linearidade da cloroquina	57
Figura 11.	Representação gráfica da linearidade da desetilcloroquina	58
Figura 12.	Representação gráfica da curva de calibração cloroq uina.....	60
Figura 13.	Representação gráfica da curva de calibração desetilcloroquina ...	60
Figura 14.	Representação gráfica da variação encontrada na concentração de cloroquina e desetilcloroquina em “spots” mantidas a temperatura ambiente durante 30 dias.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Malária - transmissão fora da região Amazônica - número de casos por estado: 1999 – 2005.....	26
Tabela 2.	Características do metabolismo de dois antimaláricos as custas do citocromo P-450.....	36
Tabela 3.	Tratamento da infecção por <i>Plasmodium vivax</i> cloroquina 25mg/kg em 3 dias e primaquina 0,5mg/kg 7 dias.....	46
Tabela 4.	Parâmetros cromatográficos utilizados para validação da metodologia analítica.....	56
Tabela 5.	Tempos de retenção de quinina, desetilcloroquina e cloroquina na concentração de 20µg/ml e 1000 ng/ml.....	69
Tabela 6.	Medicamentos com seus respectivos tempos de retenção para identificar a possível interferência de quimioterápicos administrados em associação com cloroquina.....	59
Tabela 7.	Precisão intra ensaio e inter ensaio da cloroquina, expressa como coeficiente de variação.....	61
Tabela 8.	Precisão intra ensaio e inter ensaio da desetilcloroquina, expressa como coeficiente de variação.....	61
Tabela 9.	Recuperação absoluta do método de extração para a determinação de diferentes concentrações de cloroquina e desetilcloroquina.....	62
Tabela 10.	Avaliação da robustez do método alterações no valor da proporção dos solventes, ph de acordo com as condições cromatográficas previamente padronizadas.....	63
Tabela 11.	Concentrações plasmáticas de cloroquina e desetilcloroquina (ng/ml) em D3, em pacientes com máalaria vivax, oriundas de manaus, no período de setembro a outubro de 2008.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
°C	Celcius
C8	Grupo Octil
C18	Grupo Octadecil
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CQ	Cloroquina
CV	Coeficiente de Variação
CYP-450	Complexo enzimático P-450
D3	3º dia
DESCQ	Desetilcloroquina
FDA	Food and Drug Administration
FMTAM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
FNS	Fundação Nacional de Saúde
FpIX	Ferriprotoporfirina
GIBMV	Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonization
L/kg	litro/kilograma
LQ	Limite de Quantificação
M	Molar
min.	Minutos
mm	Milímetro
mg	miligrama
mg/Kg	miligrama/kilograma
mg/mL	miligrama/mililitro
MTBE	Éter metil-terc-butílico
m/v	Massa/volume

MS	Ministério da Saúde
nº	Número
N	Normal
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng/mL	nanograma/mililitro
Nm	Nanômetro
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI	Padrão interno
pH	Potencial de hidrogênio
QUI	Quinina
r	Coefficiente de correlação de Pearson (r)
rpm	rotações por minuto
RP8	Phase reverse
RAVREDA	Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
v/v	Volume/volume
UF	Unidade federativa
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Ultravioleta
µg	micrograma
µg/mL	micrograma/mililitro
µg/L	micrograma/litro
WHO	World Health Organization
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	OBJETIVO	22
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO	24
3.	REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1.	MALÁRIA.....	24
3.1.1.	Epidemiologia	24
3.1.2.	Biologia do parasita	26
3.1.3.	Patogenia da malária	29
3.1.4.	Tratamento da malária	30
3.2.	COROQUINA.....	32
3.2.1.	Química	32
3.2.2.	Mecanismo de ação da cloroquina	33
3.2.3.	Propriedades farmacocinéticas da cloroquina	34
3.2.4.	Desetilcloroquina	35
3.2.5.	Terapêutica da cloroquina	37
3.2.6.	Concentrações efetivas da cloroquina	37
3.2.7.	Determinação das concentrações séricas da cloroquina	38
3.3.	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	39
3.4.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	42
4.	MATERIAIS E MÉTODO	45
4.1.	CASUÍSTICA.....	45
4.2.	AMOSTRAS.....	45
4.3.	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	46
4.4.	REAGENTES E SOLVENTES.....	47
4.5.	SOLUÇÕES-PADRÃO.....	47
4.5.1	Soluções estoques	47
4.5.2.	Soluções intermediária	47
4.5.3.	Soluções de trabalho	47
4.5.4.	Solução do padrão interno	48
4.5.5.	Calibradores	48

4.6.	PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO	49
4.7.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	51
4.7.1.	Otimização das condições cromatográficas	51
4.7.2.	Parâmetros de desempenho analítico	51
4.7.2.1.	Linearidade.....	51
4.7.2.2.	Seletividade.....	52
4.7.2.3.	Limite de detecção.....	52
4.7.2.4.	Limite de quantificação.....	52
4.7.2.5.	Curva de calibração	52
4.7.2.6.	Precisão do método	53
4.7.2.7.	Recuperação.....	53
4.7.2.8.	Estabilidade.....	53
4.7.2.9.	Robustez.....	54
4.7.3.	Aplicação do método validado em papel de filtro contendo sangue total de pacientes com malária vivax.....	54
4.10.	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	54
4.11.	ASPECTOS ÉTICOS	54
5.	RESULTADOS.....	56
5.1.	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	56
5.2.	PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO.....	57
5.2.1.	Linearidade.....	57
5.2.2.	Seletividade.....	58
5.2.3.	Limite de detecção.....	59
5.2.4.	Limite de quantificação.....	59
5.2.5.	Curva de calibração	59
5.2.6.	Precisão do método	61
5.2.7.	Recuperação.....	61
5.2.8.	Estabilidade.....	62
5.2.9.	Robustez.....	63
5.2.10.	Resultados da aplicação do método validado em papel de filtro contendo sangue total de pacientes com malária vivax.....	64
6.	DISCUSSÃO.....	66

7. CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	73
ANEXO (Carta de aprovação do comitê de ética e termo de consentimento livre e esclarecido).....	86

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma enfermidade infecciosa com considerável morbidade e mortalidade e significativo impacto econômico e social (ALRAJHI; FRAYHA, 1997). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008), 3.2 bilhões de pessoas vivem em zonas de risco de transmissão da doença em 104 países e territórios, principalmente África, Ásia e América Latina.

É uma doença infecciosa febril aguda, que surge com quadro clínico variável, que inclui calafrios, febre alta, dores de cabeça e musculares, taquicardia, aumento do baço e, por vezes delírios, que ocorrem em padrões cíclicos, a depender da espécie do parasito infectante (TORRES; DOMINGOS, 2005).

Os parasitos responsáveis pela malária pertencem ao gênero *Plasmodium*. Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras da doença em diferentes hospedeiros vertebrados. Destas, quatro espécies infectam humanos e podem ser distinguidas por sua morfologia. O *P. Vivax* e *P. falciparum* são as duas espécies com maior prevalência mundial. O *P. malariae* tem ampla difusão em toda a África subsaariana, a maior parte do sudeste da Ásia, Indonésia, e em muitas ilhas do Pacífico Ocidental. Também é relatado em áreas da bacia amazônica da América do Sul. Já o *P. ovale*, era encontrado em áreas restritas ao continente africano, no entanto, infecções no Oriente Médio, Papua Nova Guiné e sudeste da Ásia já foram encontrados (DAILY, 2006).

No Brasil, ocorrem predominantemente as espécies *P. falciparum* e *P. vivax* sendo o último, responsável pela maioria dos casos e o *P. falciparum* pelo maior número de mortes (BRASIL/MS/FUNASA, 2005).

A Amazônia legal concentra o maior número de casos do País. Nesta região são registrados perto de 300 mil novos casos por ano (BRASIL/MS/FUNASA/SIVEP, 2008). A doença, os vetores ou as cepas de plasmódio não se distribuem geograficamente de forma homogênea. Conforme ressalta López-Antuñano (1992), a malária é um problema global, mas com características locais. Sendo assim, é extremamente importante que se conheça a epidemiologia da doença em cada lugar para implementar medidas de prevenção e controle adequadas. As diferenças nos perfis de eficácia e efetividade dos tratamentos podem ser explicadas, em parte, pelo contexto epidemiológico (WHO, 2008).

A utilização de drogas e esquemas de tratamentos seguros e eficazes são pressupostos básicos para a efetividade e alcance da meta de redução da morbimortalidade causada pela malária (BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI, 2005). Segundo Björkman e Bhattarai (2005), o aumento da resistência às drogas antimaláricas de primeira linha, como a cloroquina, é a principal causa da elevação destas taxas em alguns países tropicais, tornando -se uma ameaça para o sistema de saúde.

Com o objetivo de estimar a magnitude e a distribuição da farmacoresistência dos parasitos da malária aos medicamentos atualmente disponíveis, foi criada em 2001 a Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas (RAVREDA), que visa monitorar o tratamento dos pacientes e avaliar a eficácia das drogas utilizadas (BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI, 2005). Para tanto, há necessidade da realização de vários estudos, dentre estes, a monitorização terapêutica dos antimaláricos utilizados.

Considerando a rápida dispersão da resistência aos antimaláricos nas últimas décadas, em especial a cloroquina, faz -se necessário o desenvolvimento de métodos novos, de baixo custo e eficazes para a quantificação deste medicamento. A dificuldade de transporte e conservação das amostras de sangue total, plasma ou

soro, uma vez que a doença é característica das áreas rurais, distantes dos laboratórios especializados, torna-se imprescindível adoção de procedimentos alternativos de acondicionamento das amostras para análise, como a utilização de papel de filtro para adsorção, secagem e transporte aos laboratórios analíticos (PATCHEN et al, 1983).

A utilização do papel de filtro contendo amostras de sangue total apresenta, vantagens, tais quais: coleta, armazenamento e transporte para análise em laboratório. Entretanto, o pequeno volume de material biológico, leva a um grave problema metodológico, ou seja, necessita de detectores de fluorescência para determinação de cloroquina, o que torna a análise inviável economicamente, na maioria dos laboratórios de análise de antimaláricos nos países da América Latina (informação verbal)¹.

Portanto, é de fundamental importância à validação de uma metodologia analítica para determinação de cloroquina empregando -se o detector de ultravioleta, universal, de preço acessível e facilmente disponível.

¹Notícia fornecida no Encontro Taller Sobre La Medicion de Niveles Sericos de Antimaláricos, Belém, Brasil, em 29 de maio a 02 de junho de 2006.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS:

2.1. GERAL

Validar metodologia analítica para determinação de cloroquina e desetilcloroquina em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando-se detector de ultravioleta.

2.2. ESPECÍFICO

- Revisar literatura buscando métodos analíticos capazes de identificar e quantificar cloroquina em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro; selecionando técnicas cromatográficas passíveis de serem validadas para a este objetivo;
- Validar a metodologia analítica para determinação das concentrações plasmáticas de cloroquina e desetilcloroquina, por ultravioleta, através dos estudos de precisão, recuperação, linearidade, limite de detecção e de quantificação, interferentes e robustez;
- Aplicar o método validado CLAE/UV na determinação das concentrações de cloroquina e desetilcloroquina em amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro de pacientes com malária

REVISÃO DA LITERATURA



3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. MALÁRIA

3.1.1. Epidemiologia

A malária é um problema mundial grave que afeta a saúde e o bem-estar das comunidades mais pobres do mundo (figura 1). Até o ano de 2004, aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas viviam em zonas de risco de transmissão da doença em cerca de 104 países e territórios. Estima-se que ocorram 350 a 500 milhões de episódios de malária anualmente (WHO, 2006).

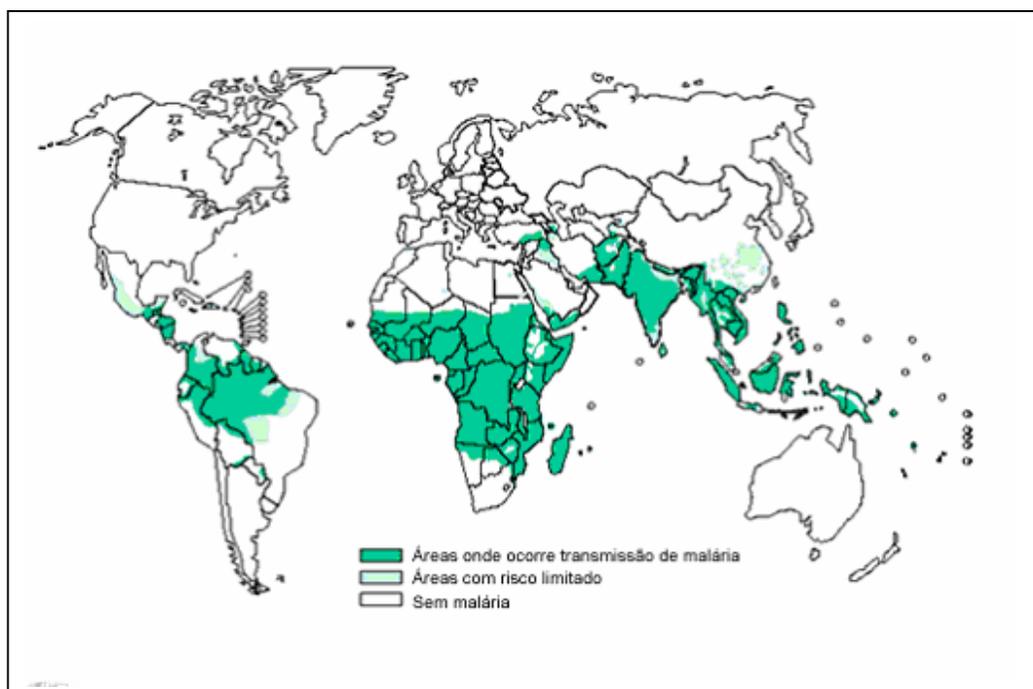


Figura 1: Distribuição da malária no mundo.
Fonte: WHO, 2006.

Estimativa atual indica que pelo menos um a três milhões de crianças morre de malária a cada ano na África (NTOUMI, et al 2004). No Brasil, 99,5% dos casos são registrados na Amazônia Legal (figura 2). Considera-se que os demais adoeceram na Amazônia, mas o diagnóstico e

tratamento foram realizados em outras regiões (casos importados) (Brasil/MS/FUNASA, 2005; Brasil/MS/SVS/SIVEP, 2008).

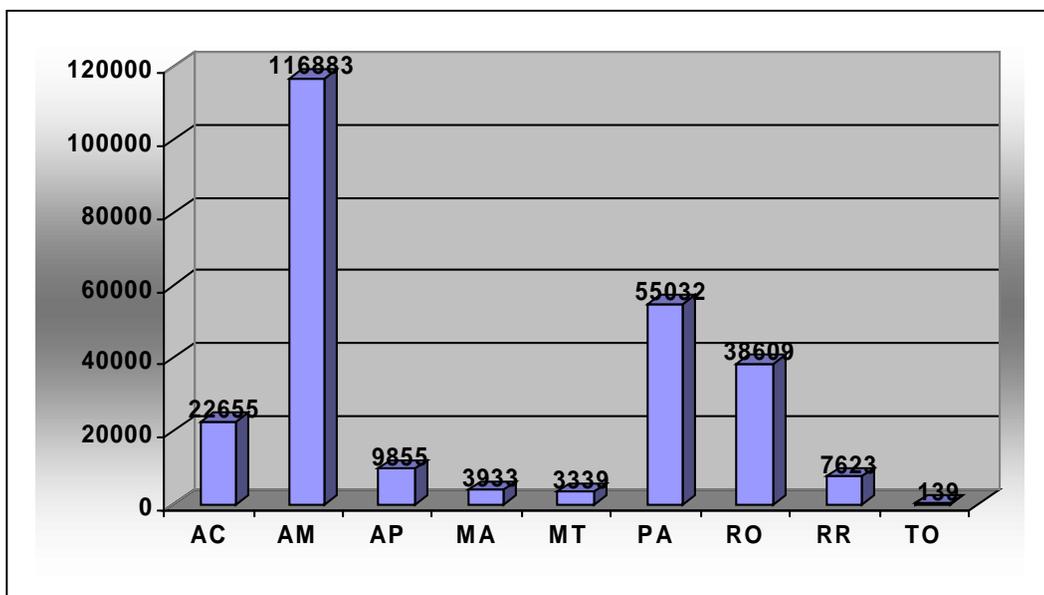


Figura 2: Número de casos notificados de malária por estado (UF) da Amazônia legal, 2008.

Fonte: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008.

Destacaram-se pela intensidade de transmissão os estados do Amazonas, Pará e Rondônia, os quais foram responsáveis por 85% dos casos relatados, prevalecendo as infecções pelo *P. vivax* (figura 3), com cerca de 218.301, correspondendo a 85% das notificações (Brasil/MS/SVS/SIVEP, 2008).

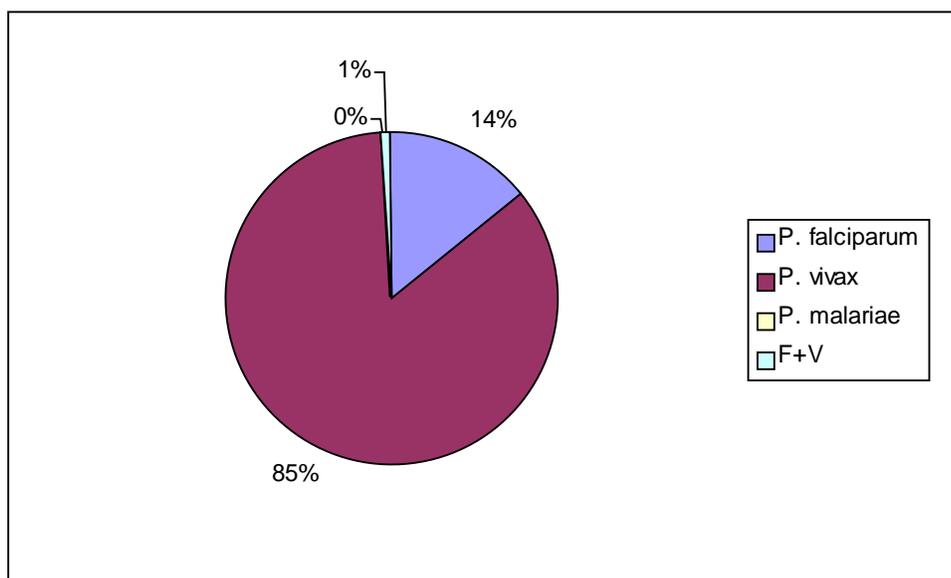


Figura 3: Proporção de casos de malária por espécie de plasmódio na região amazônica, 2008.

Fonte: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008.

Nos últimos anos, tem sido observada a ocorrência de surtos de transmissão da doença em diversos estados não-Amazônicos, como o Ceará, que apresentou 402 casos autóctones de malária por *P. vivax* em 2002. Já no ano de 2004, os registros mais importantes ocorreram nos estados do Piauí e Espírito Santo, com 120 e 74 casos, respectivamente (tabela 1). (Brasil/MS/FUNASA, 2005).

Tabela 1: Malária – extra-amazônica - número de casos por estado: 1999 – 2005.

Estado/Ano	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Bahia	0	1	72	14	71	1	0
Ceará	0	2	0	402	4	3	1
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	2
Espírito Santo	13	5	14	0	0	74	68
Goiás	2	24	0	5	0	10	9
Mato Grosso do Sul	0	0	2	38	0	1	0
Minas Gerais	0	0	14	1	31	2	17
Paraná	47	16	133	106	5	4	2
Pernambuco	0	0	0	0	0	15	2
Piauí	3	29	13	9	38	120	23
Rio de Janeiro	1	0	0	1	19	2	3
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	1	2
Santa Catarina	0	0	0	0	0	4	1
São Paulo	0	3	0	4	20	12	30
Total	66	80	234	580	188	249	160

Fonte: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008.

3.1.2. Biologia do parasita

A malária humana é causada por quatro espécies de protozoários intracelulares obrigatórios. São parasitas pertencentes à ordem *Apicomplexa* e ao gênero *Plasmodium*, fazem parte do grupo dos coccídeos, com ciclos complexos de multiplicação sexuada e assexuada (SILVA; OLIVEIRA, 2002).

As quatro espécies de plasmódios que infectam o homem, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, são transmitidas por mosquitos do gênero *Anopheles*. O plasmódio da malária tem elevada especificidade de hospedeiro, resultante de um longo processo de adaptação no curso da evolução. Assim, os parasitos da malária humana são específicos do homem. Embora possam infectar outros primatas em laboratório, tal fato não é comum nas condições naturais (CORNEJO; ESCALANTE, 2006).

Faz exceção o *P. malariae*, que é encontrado em primatas da região neotropical, sendo denominado *P. brasilianum*. Por outro lado, os plasmódios não infectam qualquer anofelino. Dentre as centenas de espécies do gênero, poucas dezenas são vetores eficazes, e nas diversas áreas geográficas, os anofelinos têm capacidade vetorial diferente para as espécies de *Plasmodium* presentes (SILVA; OLIVEIRA, 2002). Embora mais de 400 espécies de mosquitos anofelinos já tenham sido identificadas, somente 40 são consideradas vetores importantes da doença (MURY; KUMAR, 2005).

O ciclo de vida sexuado do *Plasmodium* ocorre na fêmea do mosquito anófeles, e o assexuado ocorre no homem (figura 4). O *Plasmodium falciparum* tem um ciclo eritrocitário de 48 horas no homem e produz a malária denominada terçã maligna (febre recidiva de 3 em 3 dias). No *Plasmodium vivax* é de 48 horas e produz a malária chamada terçã benigna, assim denominada por ser de menor gravidade e raramente fatal. Já no *Plasmodium ovale* é de 48 horas e um estágio exoeritrocitário, causando uma forma rara de malária. Por fim, *Plasmodium malariae*, causador da malária quartã, é de 72 horas e não possui ciclo exoeritrocitário (CAMARGO, 2003; CORNEJO; ESCALANTE, 2006).

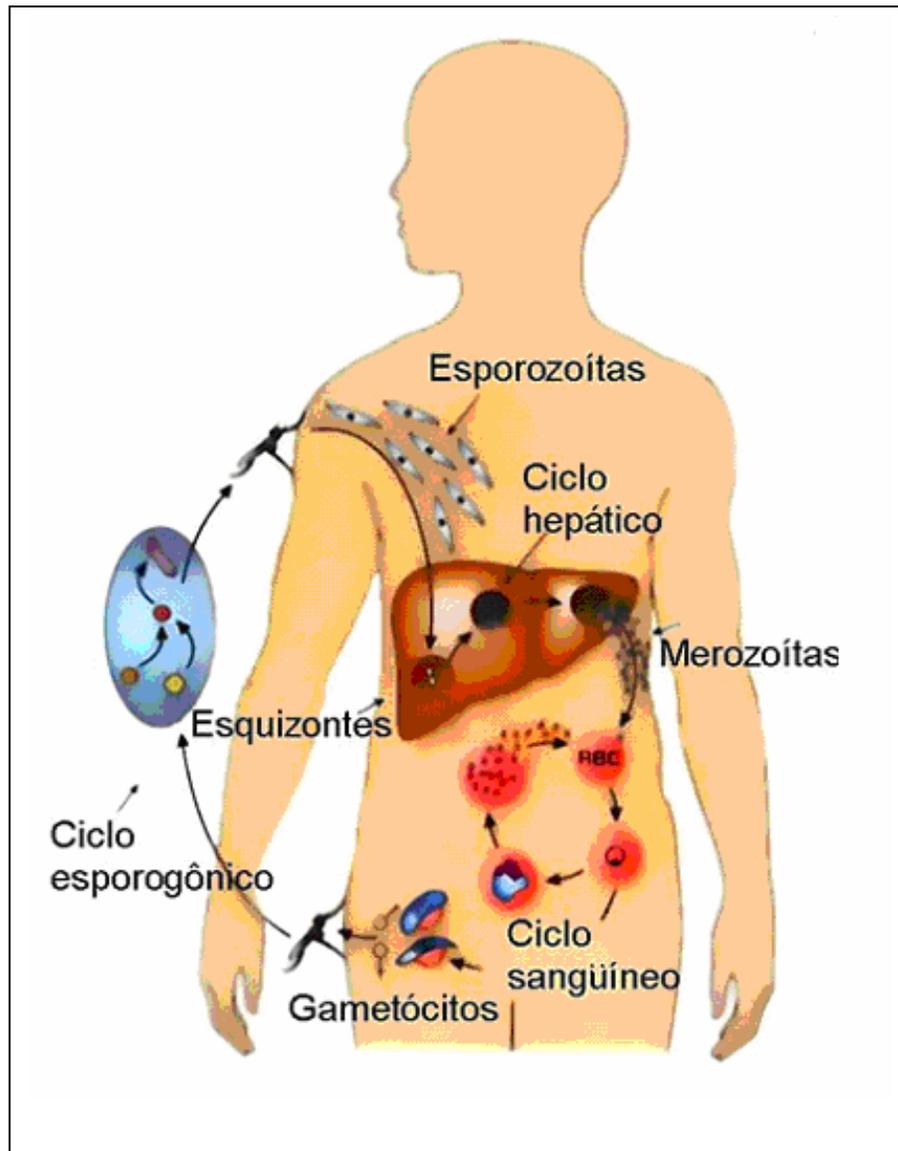


Figura 4: Ciclo de vida do parasito.
 Fonte: Adaptado RICHIE; SAUL, 2002.

Esporozoítos infectam células do fígado e amadurecem em esquizontes, que rompem e liberam merozoítos. (Nota, o *P. vivax* e *P. o* ovale têm um estágio de latência [os hipnozoítas] pode persistir no fígado e causar relapsos invadindo a circulação sanguínea, em semanas do ou mesmo anos mais tarde.) Após esta replicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica), os parasitas submetem-se à multiplicação assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica). Merozoítos infectam células vermelhas do sangue. Alguns parasitas diferenciam-se em estágios eritrocítico sexual (gametócitos). Os parasitas do estágio sanguíneo são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Os gametócitos macho (microgametócitos) e fêmea (macrogametócitos), são ingeridos por um mosquito anófeles durante uma refeição de sangue. A multiplicação dos parasitas no mosquito é sabida como o ciclo esporogônico. Quando no estômago do mosquito, os microgametas penetram nos macrogametas que geram os zigotos. Os zigotos tornam-se por sua vez móveis e alongados (ocinetos) que invadem a parede do intestino médio do mosquito onde se tornam oocistos. Os oocistos crescem, rompem, e esporozoítos são liberados, os quais irão para glândulas salivares do mosquito. Há inoculação dos esporozoítos em um hospedeiro humano e novo ciclo de vida da malária.

3.1.3. Patogenia da malária

O ciclo eritrocítico assexuado é responsável pelas manifestações clínicas da malária. A destruição dos eritrócitos e conseqüente liberação dos parasitas e seus metabólitos na circulação provocam uma resposta do hospedeiro, caracterizada por um quadro clínico de febre alta acompanhada de calafrio, sudorese intensa e cefaléia, que ocorrem em padrões cíclicos, dependendo da espécie de plasmódio infectante. Em alguns pacientes, ocorrem sintomas prodrômicos, vários dias antes dos paroxismos, a exemplo de náuseas, vômitos, astenia, fadiga, anorexia (BRASIL/SVS/GVE, 2005, PIMENTEL et al. 2007).

Cada espécie de *Plasmodium* produz um padrão de doença característico (PIMENTEL et al. 2007). O *P. falciparum* pode acarretar manifestações e complicações severas, tais como malária cerebral, insuficiência renal aguda, acidose metabólica, edema pulmonar agudo, disfunção hepática e hemoglobinúria (WHO, 1990). Hipoglicemia, convulsões, vômitos repetidos, hiperpirexia, icterícia e distúrbios da consciência são indicadores de prognóstico desfavorável. (BRASIL/SVS/GVE, 2005).

O *P. vivax* produz sinais e sintomas clínicos mais brandos quando comparados aqueles provocados pelo *P. falciparum*. A infecção é caracterizada pelas recidivas ocasionadas pelas formas tissulares latentes. (PIMENTEL et al. 2007).

A sintomatologia da malária por *P. vivax* é variada, sendo que na primeira infecção os pacientes podem apresentar febre alta, artralguas, náuseas, vômitos e icterícia. Porém, manifestações atípicas vem sendo relatadas na literatura, como coagulopatias, comprometimento cerebral, insuficiência renal, complicações pulmonares e icterícias. A malária por *P. vivax*, embora mais raramente que na infecção pelo *P. falciparum*, pode evoluir de forma grave, geralmente associada ao retardo no diagnóstico e tratamento, porém costuma responder

de forma satisfatória à instituição da terapia (MOHAPATRA et al, 2002; MYOUNG-DON et al, 2001).

Diferenças na biologia do parasita explicam parcialmente os diversos padrões da doença. Primeiro, o *P. falciparum* pode invadir grande porcentagem dos eritrócitos, já o *P. vivax* fica limitado aos reticulócitos. Uma segunda diferença é a surpreendente redundância de vias de invasão do *P. falciparum* quando comparada ao *P. vivax*. Este último invade somente os eritrócitos do grupo sanguíneo Duffy positivo, sendo largamente limitada para reticulócitos. As limitações de invasão pelo *P. vivax* levou a descoberta de duas famílias de receptores de parasita: a molécula do parasita que liga ao sistema do grupo sanguíneo Duffy e proteínas homólogas “duffy – binding – like” (DBL) e as proteínas homólogas “reticulocyte -binding-like” (RBL) ambas do *P. falciparum* (MILLER et al, 2002).

Os vários membros das famílias DBL e RBL podem reconhecer diferentes receptores nos eritrócitos para aqueles grupos sanguíneos Duffy ou de reticulócitos. Estes receptores são responsáveis, em parte, pela flexibilidade para invasão pelas várias espécies de *Plasmodium*, que, por sua vez, dita o máximo da parasitemia e dos sinais e sintomas da doença (MILLER et al, 2002).

3.1.4. Tratamento da malária

O tratamento adequado e oportuno tanto previne a ocorrência de casos graves e, conseqüentemente a morte por malária, quanto elimina as fontes de infecção para os mosquitos, contribuindo para a redução da transmissão da doença (BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI, 2001). Uma vez que o diagnóstico da malária foi confirmado, a terapêutica apropriada deve ser iniciada imediatamente. Esta deve ser guiada por três fatores principais: a espécie infectante do *Plasmodium*, o estado clínico do paciente e a susceptibilidade da droga aos parasitas, que é determinada pela área geográfica onde a infecção foi adquirida (CDC, 2006).

A quimioterapia da malária tem como objetivos interromper a esquizogonia sangüínea responsável pela patogenia e pelas manifestações clínicas da infecção; proporcionar a erradicação das formas latentes do parasito (hipnozoítas) do *P. vivax* e do *P. ovale* no ciclo tecidual, evitando as recaídas; e reduzir as fontes de infecção para os mosquitos, eliminando as formas sexuadas dos parasitos (BRASIL/SVS/GVE, 2005).

A tomada de decisão para o tratamento adequado de um paciente com malária deve ser precedida de informações sobre a gravidade da doença, espécie e de plasmódio, idade do paciente, histórico anterior de malária e a suscetibilidade dos parasitas aos antimaláricos convencionais (PIMENTEL, et al. 2007).

Para cada espécie de plasmódio, vem sendo utilizadas associações de medicamentos específicos, em dosagens adequadas à situação particular de cada doente. Dentre os agentes terapêuticos eficazes estão as famílias das quinolinas (quinina, cloroquina, primaquina, mefloquina, amodiaquina, halofantrina), diclorobenzilidina (lumefantrina), biguanidas (proguanil, clorproguanil), diaminopiridinas (pirimetamina), sulfonas (dapsona), hidroxinaftoquinonas (atovaquona) e lactonas sesquiterpênicas (derivados da artemisinina, artesunato e artemeter) (LOISEAU; LE BRÁS, 2007).

Sendo o tratamento da malária complexo, são utilizadas associações com outros quimioterápicos tais como sulfonamidas (sulfadoxina), tetraciclina (tetraciclina, doxicilina) e lincosaminas (clindamicina e lincomicina). As associações acarretam diversos inconvenientes, pois compreendem complexos regimes de administração e várias reações adversas, o que contribui para redução da aderência ao tratamento e o possível desenvolvimento de resistência pelo parasita (CRAWLEY, 1999; WINSTANLEY, 2001).

Há uma busca contínua por novas drogas antimaláricas ou novos métodos que reforcem a aceitação das drogas pelos pacientes. Muitos autores têm investigado se a redução da dose, duração ou freqüência do

tratamento, poderiam ser tão eficazes quanto aquele dos esquemas padrões (FERRARONI, 1983; ANDRADE et. al, 1992 e PINTO et. al, 2003).

3.2. CLOROQUINA

3.2.1. Química

A cloroquina foi uma das 4-aminoquinolinas investigadas como parte de um extenso programa cooperativo de pesquisa de novos agentes antimaláricos durante a segunda guerra mundial. A partir de 1943, milhares destes compostos foram sintetizados e testados quanto a sua atividade antimalárica. A cloroquina provou ser a mais promissora e foi liberada em 1944 com o nome comercial de Aralen. Porém, logo após foi descoberto que o composto havia sido sintetizado e estudado sob o nome de Resochin pelos alemães em 1934 (TRACY; WEBSTER, 2002).

Quimicamente a cloroquina (figura 5) é a 7 cloro-4-[[4-(dietilamino-1-metilbutil)amino] quinolina, com peso molecular de 319,88 e fórmula molecular $C_{18}H_{26}ClN_3$. É um pó cristalino branco ou levemente amarelo, inodoro e de sabor amargo. É pouco solúvel em água, porém solúvel em ácidos diluídos, clorofórmio e éter. Como base livre, apresenta-se como pó cristalino amarelo ou branco, inodoro. Também é encontrada como fosfato ou cloridrato (Farmacopéia brasileira, 1977).

As formas d, l e dl da cloroquina têm potência igual para o tratamento da malária em aves, mas o isômero d é menos tóxico do que o isômero l nos mamíferos. Nas infecções em roedores (*P. vinckei* e *P. berghei*), (+)-cloroquina é 2 a 4 vezes mais ativa e menos tóxica do que seu antípoda, mas ambos isômeros são equipotentes em diferentes cepas de *P. falciparum*. Já nas cepas resistentes o isômero (-)-cloroquina tem baixa atividade quando comparado (+)-cloroquina (KRISHNA; WHITE 1996). Ressalta-se que a presença de um átomo de cloro na posição 7 do anel quinolínico, confere maior atividade antimalárica tanto na malária aviária quanto na humana (TRACY; WEBSTER, 2002).

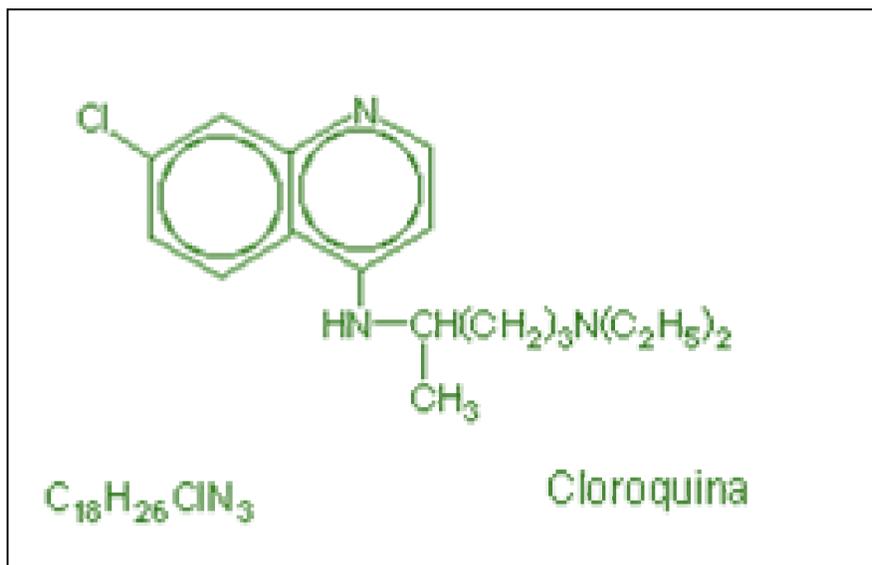


Figura 5: Fórmula estrutural da cloroquina.
 Fonte: BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI, 2001.

3.2.2. Mecanismo de ação da cloroquina

A cloroquina é uma 4-aminoquinolina com rápida atividade esquizotóxica para todas as espécies de plasmódios que infectam o homem e gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae*. Não tem ação contra as formas hepáticas. Além de seu efeito antimalárico, tem também ação antipirética e anti-inflamatória. Embora poucas cepas de *P. falciparum* sejam ainda sensíveis a este antimalárico (BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI, 2001).

A cloroquina parece interferir na alimentação do Plasmodio. Ela pode atravessar a membrana dos eritrócitos e concentra-se nos vacúolos digestivos dos parasitas aumentando o seu pH (FOLLEY; TILLEY, 1997).

Diversas enzimas foram propostas como alvos possíveis de ação da droga, mas evidências recentes, apontam a detoxificação do heme como local de ação mais provável. A degradação da hemoglobina produz um subproduto do heme livre (ferriprotoporfirina IX). Este composto é tóxico para o parasita, que o polimeriza em hemozoína (pigmento malárico). Foi demonstrado *in vitro* que a cloroquina impede a polimerização do heme expondo os parasitas a este subproduto tóxico (FOLLEY; TILLEY, 1997).

Outro mecanismo proposto é a formação de complexos fármaco-heme tóxicos, que não é universalmente apoiado pelos estudos de interações entre uma série de drogas antimaláricas estruturalmente relacionadas a cloroquina e o heme (figura 6) (TRACY; WEBSTER, 2002).

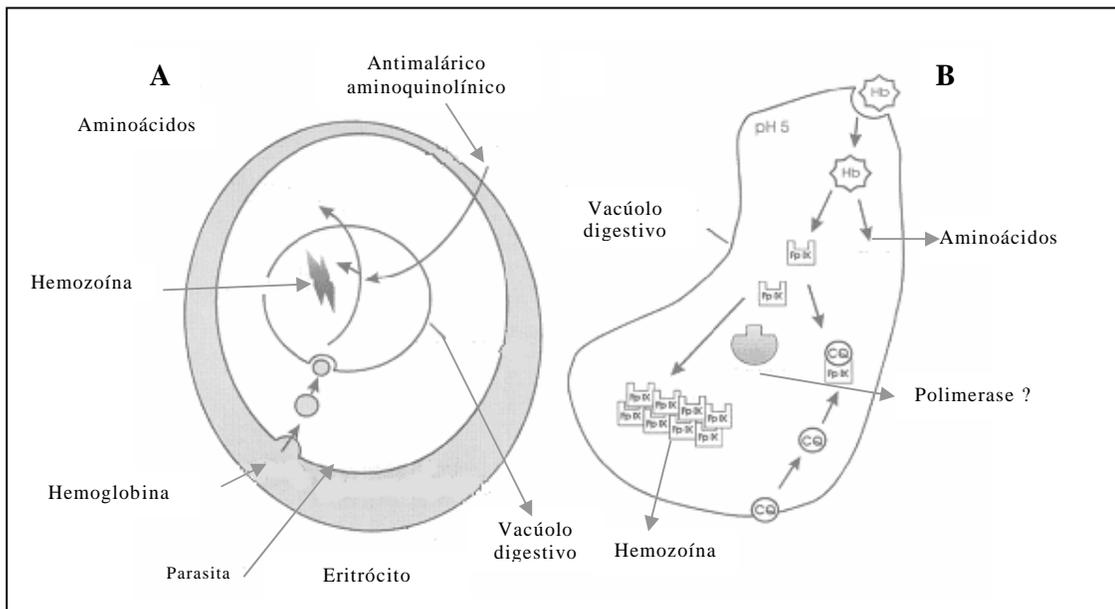


Figura 6: Processo digestivo no eritrócito infectado com Plasmodium.

Fonte: FOLLEY; TILLEY, 1997.

- (A) Alimentação intraeritrocítica do parasita da malária ingerindo pequenos pacotes de hemoglobina no citoplasma do hospedeiro. A hemoglobina é degradada por uma série de proteases no interior do vacúolo alimentar ácido.
- (B) Como subproduto da degradação da hemoglobina, o heme tóxico, ferriprotoporfirina IX (FpIX), é liberado. As moléculas heme são detoxificadas no vacúolo alimentar do parasita pela polimerização em grânulos insolúveis (hemozoína). Uma heme polimerase foi proposta na catálise do processo de polimerização.

3.2.3. Propriedades farmacocinéticas da cloroquina

A cloroquina é bem absorvida após administração via oral, alcançando concentrações plasmáticas máximas em cerca de 3 horas (variando entre 2 a 12 h). A biodisponibilidade via oral é de 70 a 80%. Por via intramuscular ou intravenosa a concentração sanguínea assemelha-se a via oral, porém o nível máximo é atingido em 5 a 20 minutos. Liga-se às proteínas plasmáticas em torno de 50 a 60%. Sua meia-vida plasmática em níveis terapêuticos é de 6 a 10 dias. Tem elevada capacidade de ligação tecidual, inclusive no sistema nervoso central, mas

sua biodisponibilidade no líquido cefalorraquidiano é baixa. Concentra-se nos tecidos dérmicos e oculares contendo melanina. Acumula-se nos eritrócitos, sobretudo os infectados (BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI, 2001).

No interior das hemácias alcança concentrações três vezes superiores aquelas do plasma. Também se concentra nos leucócitos e nas plaquetas. Atravessa a barreira placentária e nos tratamentos prolongados pode causar lesão ao feto. É excretada, principalmente, pela via renal, 20% inalterada e o restante como produto de biotransformação, com meia vida de eliminação de 1 a 2 meses (WHO, 2006).

É liberada lentamente dos locais de depósito, sofrendo intensa biotransformação hepática, originando metabólitos que apresentam atividade antimalárica como a desetilcloroquina. (KRISHNA; WHITE, 1996).

3.2.4. Desetilcloroquina

É um produto de biotransformação que apresenta atividade antimalárica similar ao fármaco original (figura 7) (WHO, 2006).

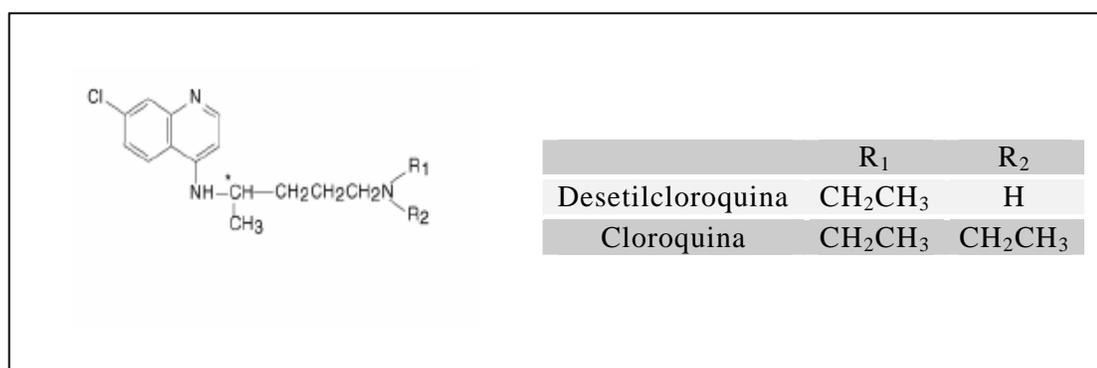


Figura 7: Fórmula estrutural da desetilcloroquina

Fonte: CARDOSO; BONATO, 2005.

Em um estudo de disposição cinética Holmberg et. al. (1983) demonstraram que a meia vida da desetilcloroquina corresponde apenas a 25% do fármaco original, porém pode ser prolongada de maneira dose

dependente. A maior parte da biotransformação da cloroquina em desetilcloroquina ocorre no fígado com a participação do complexo enzimático P-450 (CYP-450). Várias enzimas deste complexo participam do metabolismo dos antimaláricos no organismo humano (tabela 2) (GUZMAN; CARMONA-FONSECA, 2006).

Tabela 2: Características do metabolismo de dois antimaláricos à custa do citocromo p-450.

Variável	Cloroquina	Mefloquina
Dose mg/kg/dia	25	15-25 (dose única)
Enzima de metabolismo hepático	CYP2C8, CYP3A4 e CYP2D6	CYP3A4
Metabólitos	Ativos: desetilcloroquina e bisdesetilcloroquina. Outros menores: 7-cloro 4aminoquinolina e outros.	Caboximefloquina (inativo)
Vias	Desaminação oxidativa, eliminação da cadeia lateral e outras vias N-oxidativas.	Carboxilação
Toxicidade das doses	Mínima	Náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, tontura.
Enzimas inibidas	CYP2D6	CYP1A2

Fonte: Adaptada GUZMAN; CARMONA-FONSECA, 2006.

3.2.5. Terapêutica da cloroquina

Os comprimidos contendo 250 mg do sal, equivalentes a 150 mg de base, são os mais usados pelo Ministério da Saúde, porém existem comprimidos contendo 50 mg, 100 mg e 150 mg de base (como difosfato ou sulfato). Apresentações injetáveis de cloroquina não são recomendadas pelo alto risco de efeitos cardiotóxicos agudos e graves (BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI, 2001).

Tanto adultos quanto crianças devem receber uma dose total de 25 mg de base/kg, administrada no transcorrer de três dias. Um regime adequado, sob o aspecto farmacocinético, consiste em administrar uma dose inicial de 10 mg de base/kg, seguida de 5 mg/kg, seis a oito horas após e 5 mg/kg em cada um dos dois dias seguintes. Outro esquema terapêutico mais prático, utilizado em diversas regiões, consiste em 10 mg/kg no primeiro dia, seguida de 7,5 mg/kg no segundo e terceiro dias. Ambos correspondem a uma dose total de 25 mg/kg (1.500 mg de base para um adulto com 60 kg) (BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI, 2001).

3.2.6. Concentrações efetivas da cloroquina

Diversos estudos realizados nas décadas de 1940 a 1950 (BERLINER et. al, 1948; COATNEY et. al, 1949; CRAIGE et. al, 1947; MOST, et al, 1946; WHORTON et al, 1950) mostraram que a concentração efetiva mínima de cloroquina deve ser 10 ng/mL de plasma. Entretanto duas questões emergem deste valor, quer sejam a metodologia utilizada e a correlação entre os níveis plasmáticos e no sangue total do fármaco (BAIRD, 2004).

Os métodos iniciais de análise não faziam a distinção entre a cloroquina e seu principal produto de biotransformação, desetilcloroquina, portanto tal valor de 10 ng/mL representa a soma do fármaco e de seu produto de biotransformação, que possuem atividade antimalárica equivalentes (BAIRD, 2004).

O valor de 10ng/mL no plasma deverá servir de orientação para determinação dos teores do fármaco no sangue total, que pode ser estimado em 100 ng/mL (BAIRD, 2004).

Baseando-se nestes valores pode-se inferir que a parasitemia recorrente, após 35 dias de terapia, com concentrações no sangue total de cloroquina e desetilcloroquina superior a 100ng/mL, caracteriza a resistência do parasito ao fármaco (BAIRD, 2004).

3.2.7. Determinação das concentrações de cloroquina

Diversas metodologias estão disponíveis atualmente para determinação da cloroquina e de seu principal metabólito em fluídos biológicos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (FDA, 2001; PAREDES et al, 2002).

Patchen et. al (1983) descreveram um método de quantificação de cloroquina e do seu principal metabólito, desetilcloroquina, em sangue total coletado em papel de filtro, usando a CLAE com detecção de fluorescência. A metodologia permitiu efetiva avaliação da resistência do parasita a cloroquina em regiões endêmicas.

Determinação de cloroquina e de desetilcloroquina empregando detecção por fluorescência foram feitas por PROJEAN et. al (2003) para identificação de isoformas de P450 (CYP2C8, CYP3A4 e CYP2D6), envolvidos a N-desetilação da cloroquina, para uma melhor caracterização da biotransformação do fármaco em humanos. Cardoso e Bonato (2005), também descrevem um método de quantificação de desetilcloroquina e desetilhidroxicloroquina aplicando a CLAE. Na Tanzânia, Yonemitsu et.al (2005) descreveram um método para análise de cloroquina e desetilcloroquina em sangue total e tecido oriundo de exame necroscópico.

Samanidou et. al (2005), publicaram a validação de um método simultâneo de determinação de quinina e cloroquina em fluidos biológicos.

Green et. al (2006), usando a CLAE com detector de UV analisaram especialidades farmacêuticas contendo em sua composição cloroquina, quinina e sulfadoxina com o objetivo de comparar a validação de dois métodos (refractométrico e colorimétrico). Desenvolvimento e validação de métodos usando fase reversa para potencial análise de adulteração de medicamentos antimaláricos como cloroquina, quinina e mefloquina, também foram descritos na literatura por Gaudiano et. al (2006).

Determinação simultânea de desetilcloroquina, cloroquina, cicloguanil e proguanil em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro, foi realizada por Lejeune et. al (2007) utilizando a cromatografia líquida em fase reversa.

3.3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos é um processo que fornece evidência documentada de que o mesmo é confiável ao que se aplica (CASS; DEGANI, 2001), isto é, atende as exigências desejadas (BRITTAN, 1998).

A validação é realizada para garantir que o método seja exato, específico e reprodutível, assegurando credibilidade durante seu uso rotineiro (FDA, 2001). Consiste em uma série de procedimentos que visam assegurar veracidade às medidas obtidas, sendo aplicada a quantificação de fármacos e/ou modelos de biotransformação em diferentes matrizes biológicas (sangue total, soro, plasma, urina e tecido) (CASS; DEGANI, 2001).

Conforme descrito no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos (FDA, 2001) e por Brito et. al (2003), os parâmetros para a validação de um método incluem: limite de detecção e quantificação, especificidade/seletividade, linearidade, exatidão, precisão e estabilidade.

A especificidade, muitas vezes utilizada como sinônimo de seletividade é definido como a habilidade de um método analítico em diferenciar e quantificar o composto de interesse na presença de outros componentes na amostra. Já a seletividade refere-se à capacidade de detecção do analito (BRITO et. al 2003). Estas podem ser determinadas analisando-se diversas amostras da matriz ($n \geq 6$), na presença de interferentes, bem como deve ser assegurada no limite mais baixo de detecção. A exatidão descreve a proximidade entre os valores médios obtidos em relação ao verdadeiro, sendo aceita a diferença de 15% entre estes. (FDA, 2001).

A precisão é a capacidade do método de reproduzir o mesmo resultado, embora não necessariamente o correto, sempre que o procedimento seja executado. É subdividida em três etapas (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), que são diferenciadas pelo intervalo de tempo em que são feitas as análises e pelas condições de realização destas (CASS; DEGANI, 2001).

A repetibilidade (precisão intra-ensaio) é avaliada no mínimo em nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta; em triplicata cada. A precisão intermediária (precisão inter-ensaio) é determinada em dois dias diferentes, no mínimo, com analistas diferentes (ANVISA, 2003).

A reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em certas situações, como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, nas farmacopéias. Normalmente, os resultados dos estudos de precisão são expressos como desvio padrão, variância ou coeficiente de variação, e de acordo com as recomendações dos órgãos reguladores se aceita um coeficiente de variação de 15% e 20%, em função das concentrações dos analitos presentes na matriz (ANVISA, 2003; RIBANI; BOTTOLI; COLLINS; JARDIM, 2004).

Sensibilidade é a habilidade de um método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. A avaliação da sensibilidade compreende a determinação dos limites de quantificação (menor concentração do composto que pode ser medida com uma precisão especificada dentro do critério de aceitação do método) e detecção (menor concentração do composto que produz uma resposta maior do que três vezes o ruído do detector) (CASS; DEGANI, 2001 e FDA, 2001).

A recuperação é a resposta do valor obtido de uma quantidade de analito adicionado (“fortificação” da amostra) e extraído da matriz biológica, comparada com a concentração verdadeira do padrão autêntico (FDA, 2001). A fortificação tenta simular condições reais, não interferindo significativamente nas interações que ocorrem na própria amostra. Isso nem sempre é possível, visto que a solução da fortificação é preparada com solventes orgânicos, geralmente não presentes na matriz. Aceita-se valores de recuperação no intervalo de 85% a 115% (BRITO; AMARANTE; POLESE; RIBEIRO 2003).

A estabilidade de uma droga em um líquido biológico é função das condições de armazenamento, das propriedades físico-químicas e matriz (FDA, 2001).

A validação de métodos analíticos também inclui a determinação de curva de calibração, linearidade e robustez (CASS; DEGANI, 2001). Uma curva (padrão) é a relação entre a resposta do detector e as respectivas concentrações do analito. Para sua construção é necessária a escolha de controles cujas concentrações variam em função da escala da concentração esperada de acordo com a finalidade da análise (CASS; DEGANI, 2001 e FDA, 2001).

A linearidade é a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração do composto em questão, dentro de

uma faixa analítica especificada, sendo possível relacionar a resposta do detector à concentração. É avaliada por intermédio da relação entre as medidas das áreas das amostras das soluções-padrões. A seguir é estabelecida a correlação entre estas duas variáveis através do coeficiente de correlação de Pearson (CASS; DEGANI, 2001).

A robustez fornece resultados inalterados quando sujeito a pequenas mudanças (diferentes analistas, pH da fase móvel, etc). Pode ser determinada por intermédio da análise individual ou simultânea dos parâmetros comumente sujeitos à variação (CASS; DEGANI, 2001 e FDA, 2001).

3.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis, rápidos, precisos e de baixo custo para determinação de princípios ativos é objeto constante de estudos científicos (PAREDES et al., 2004), dentre as técnicas modernas de análise, a cromatografia ocupa lugar de destaque devido a facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas (COLLINS, 1990).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido a técnica analítica de escolha para quantificação dos níveis plasmáticos de antimaláricos e seus metabólitos no sangue. São utilizadas tanto a cromatografia em fase normal (a fase estacionária é mais polar) quanto de fase reversa (a fase móvel é mais polar) após extração líquido-líquido ou sólido-líquido (CARDOSO et. al, 2005; DENG et. al, 2006; GAUDIANO et. al 2006; GREEN et. al, 2006; SAMANIDOU et. al, 2005).

A CLAE utiliza instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob alta pressão. Possui a capacidade para realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em

vários tipos de amostras, poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (GUIMARÃES; COLLINS,1990).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

Para a validação da metodologia analítica foi utilizado *pool* de sangue total de indivíduos, o qual foi cedido pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFPA, que relataram não estar usando nenhum medicamento.

Para determinação das concentrações de cloroquina e desetilcloroquina foram coletadas 10 amostras de sangue de pacientes portadores de malária por *P.vivax*, diagnosticados por exame hemoparasitoscópico, no terceiro dia após instituição da terapia (D3). Os pacientes selecionados foram adultos de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos. Cada coleta do material biológico foi acompanhada do preenchimento de protocolo contendo identificação da amostra, o nome do paciente, idade e sexo. O esquema terapêutico empregado no tratamento dos pacientes foi o recomendado pelo Ministério da Saúde (tabela 3).

4.2. AMOSTRAS

Nos pacientes com malária vivax, as amostras foram coletadas por punção digital com auxílio de lanceta, e transferidas para papel de filtro Whatman, com cinco aplicações de 100 µL cada, em gotas concêntricas de aproximadamente 5 cm de diâmetro. A seguir, o papel de filtro foi seco a temperatura ambiente por 3 horas e acondicionado em envelope comum devidamente identificado a temperatura ambiente.

As coletas foram realizadas na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMTAM - (situada em Manaus–Amazonas), no período de setembro a outubro de 2008. Esta instituição é uma autarquia estadual de referência para assistência, ensino e pesquisa em doenças tropicais.

Tabela 3: Tratamento das infecções por *Plasmodium vivax*. Cloroquina 25mg/Kg em 3 dias e primaquina 0,5mg/Kg 7 dias.

Grupos Etários	Drogas e doses							
	1° dia			2° e 3° dias			4° ao 7° dias	
	CQ comprimido	Primaquina comprimido		CQ comprimido	Primaquina comprimido		Primaquina comprimido	
		Adultos	Inf.		Adultos	Inf.	Adultos	Inf.
Menor de 6 meses	¼	-	-	¼	-	-	-	-
6 a 11 meses	½	-	1	½	-	1	-	1
1 a 2 anos	1	-	1	½	-	1	-	1
3 a 6 anos	1	-	2	1	-	2	-	2
7 a 11 anos	2	1	1	1 e ½	1	1	1	1
12 a 14 anos	3	1 e 1/2	-	2	1 e ½	-	1 e ½	-
15 ou mais	4	2	-	3	2	-	2	-

Fonte: Ministério da Saúde –FUNASA- Manual de Terapêutica da Malária, 2001.

4.3. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência *Varian*[®], composto por uma bomba isocrática modelo *ProStart 300*, injetor manual reodyne, com loop de 50µL, detector duplo canal ultravioleta e visível *ProStar, modelo 220*. A separação cromatográfica foi realizada a temperatura ambiente empregando-se uma coluna *X-TERRA*[®] *RP8* 5µm 4.6 X 150mm (Waters, Saint Quentin-en-Yvelines, France).

No preparo das amostras também foram utilizados um agitador de tubos vortex, Q-22ob1, *Quimis*®; Ultra-som, Q-335D, *Quimis*®; Centrífuga, 2K15, *Sigma Laborzentrifugen*®; peagâmetro digital PHS-3B, *pHte*®k; Balança, VL-1mg, *Acculab*®; Homogeneizador BHS-300, *Benfer*®; Bomba de vácuo, *Fabbe*®; desionizador de água *Aquapur AQ 0010*®; microseringa de 50µL, *Hamliton*®; Papel de filtro *Whatmann*® (14µg de poro) ; micropipetas automáticas com volume regulável Finnpiquette (10µL a 100µL, 20µL a 200µL e 200µL a 1000µL), *Labsystems*®.

4.4. REAGENTES E SOLVENTES

Acetonitrila, metanol, trietilamina (grau cromatográfico) foram obtidos da *Merck*®. Hidróxido de sódio e ácido clorídrico da *Labsynth*®. A água foi purificada com o sistema *Aquapur AQ 0010*® para a preparação da solução de hidróxido de sódio a 2 M e ácido clorídrico a 0,01 e 1 N.

4.5. SOLUÇÕES-PADRÃO

4.5.1. Soluções estoque

As soluções estoques de cloroquina (*Sigma*®) em concentração de 1,4 mg/mL e desetilcloroquina (*Sigma*®) em concentração de 12µg/mL foram preparadas em ácido clorídrico a 0,01 N. Já a solução de quinina (*Sigma*®) em concentração de 2,04mg/mL foi preparada pela dissolução em metanol.

4.5. 2. Soluções intermediárias

A solução estoque de cloroquina foi diluída em ácido clorídrico a 0,01 N e desetilcloroquina em metanol, a fim de obter -se as concentrações de 20,0 µg/mL e 8 µg/mL, respectivamente.

4.5. 3. Soluções de trabalho

Foram efetuadas diluições da solução intermediária de cloroquina em ácido clorídrico a 0,01 N e desetilcloroquina em metanol, para obtenção

das soluções de trabalho em concentrações de 5,0 µg/mL e 5,0 µg/mL, respectivamente.

4.5. 4. Solução do padrão interno

A solução estoque de quinina foi diluída em metanol, para obtenção de concentração de 20,0 µg/mL.

Todas as soluções padrão foram acondicionadas em frasco âmbar e armazenadas a 4 °C.

4.5.5. Calibradores

Os calibradores empregados para validação da metodologia analítica foram preparados em sangue total, oriundo de pessoas que nunca fizeram uso de antimaláricos. Estes foram preparados contendo concentrações de cloroquina e desetilcloroquina variando de 2000 ng/mL a 100 ng/mL. Alíquotas das soluções padrões dos antimaláricos foram dissolvidas em volumes apropriados de sangue total humano através de agitação mecânica por 1 hora.

Um volume de 100µL de cada amostra de sangue com concentração conhecida de cloroquina e desetilcloroquina foi aplicado sobre o papel de filtro, os quais foram secos por 3 horas e armazenados em envelopes a temperatura ambiente, e usados de acordo com as necessidades de trabalho (figura 8). O tempo decorrido entre o preparo dos papéis de filtro e a análise foi inferior a 10 dias.



Figura 8: Papel de filtro com sangue total.
FONTE: AUTOR.

4.6. PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Os “spots” em pequenas peças foram transferidos para tubos de centrífuga de polipropileno de capacidade de 15m L e adicionados 1.5mL HCl 0.1N. Os tubos foram transferidos para um agitador mecânico e submetidos à agitação por 20 minutos. A seguir, os mesmos foram para banho de ultra-som por uma hora. O papel de filtro foi retirado, com auxílio de um palito de madeira e adicionado 0,5mL de NaOH 2M, 100 μ l do padrão interno e 6mL de metil terc butil éter. Os tubos foram agitados por 15 minutos e centrifugados a 2000 rpm por 15 minutos. A camada orgânica foi separada e evaporada em banho de água a 60 °C. O resíduo foi res suspenso com 100 μ L da fase móvel e injetado, em volume de 50 μ L no cromatógrafo (figura 9).

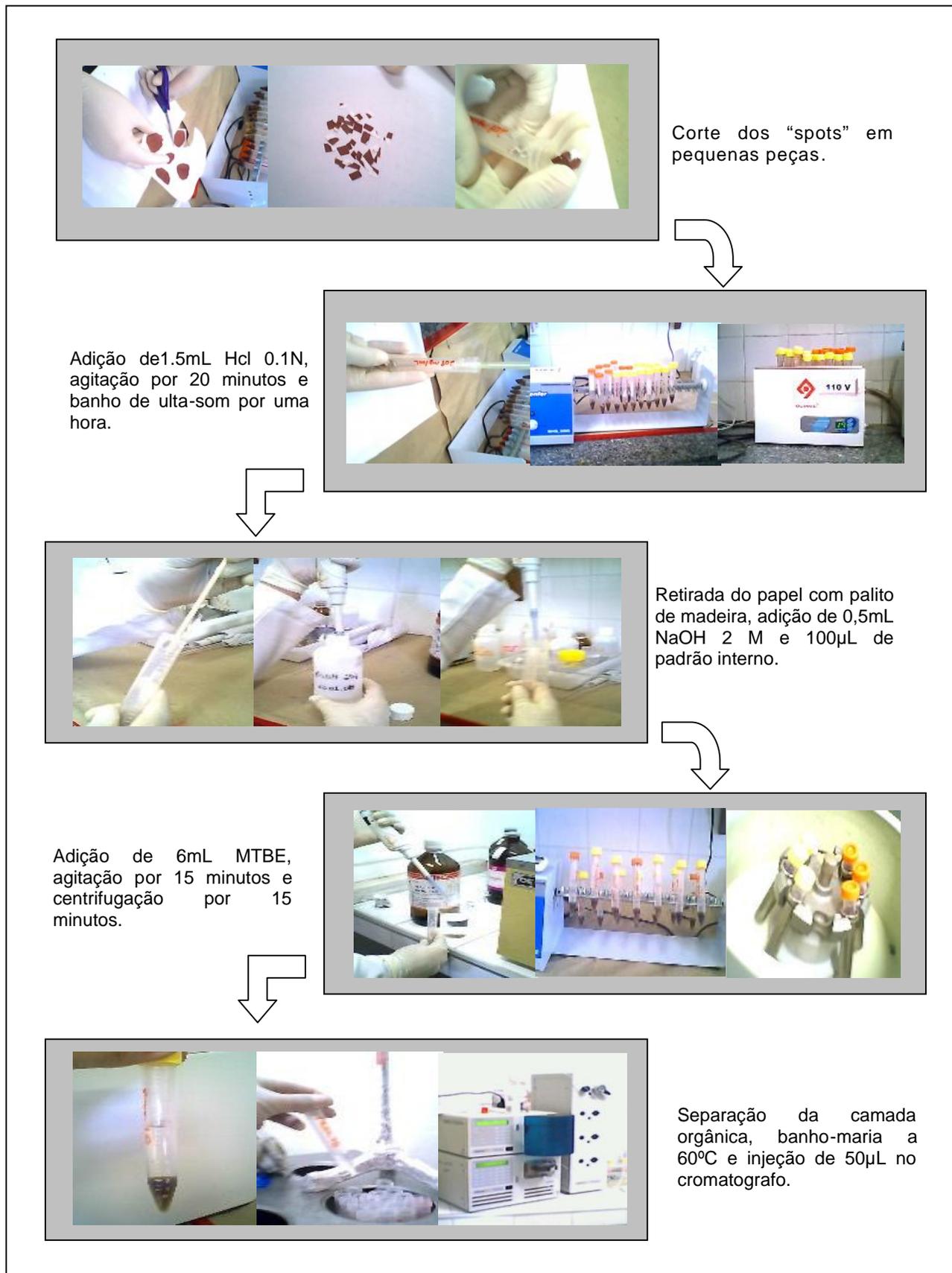


Figura 9: Esquema de extração da cloroquina e desetilcloroquina.

Fonte: Autor.

4.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação da metodologia analítica foi realizada segundo os critérios propostos pelo FDA (1994), "Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (GIBMV)", (2001) e resolução da ANVISA RE nº 899, de 29/5/2003. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, seletividade, precisão intra e inter ensaio, recuperação, estabilidade, limites de detecção e quantificação e robustez.

4.7.1. Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas apropriadas para o objetivo do trabalho foram obtidas utilizando-se soluções padrões de cloroquina e desetilcloroquina. Foram otimizadas a vazão, a composição da fase móvel e o comprimento de onda de detecção, com o propósito de obter as primeiras informações sobre as condições cromatográficas ideais, a fim de subsidiar os experimentos de otimização da análise, (PATCHEN et. al. 1983).

4.7.2. Parâmetros de desempenho analítico

4.7.2.1. Linearidade

Para avaliação da linearidade, alíquotas de fase móvel em quintuplicata, foram enriquecidas com cloroquina nas concentrações de 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 ng/mL e desetilcloroquina nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 ng/mL, todas elas adicionadas de quinina (padrão interno), na concentração de 20,0 µg/mL e submetidas às condições cromatográficas apresentadas no item 5.1.

A seguir, a concentração de cada um dos analitos de interesse foi plotada no eixo das abscissas e as relações entre as áreas da cloroquina ou desetilcloroquina e do padrão interno em cada concentração no eixo das ordenadas. Por fim, foram obtidos a equação da reta e o coeficiente de correlação de Pearson (r).

4.7.2.2. Seletividade

Foi realizado a fim de caracterizar a possível interferência nos tempos de retenção dos analitos de interesse e do padrão interno, utilizando-se alíquotas de *pool* de sangue total adsorvidos em papel de filtro, enriquecidas ou não com as soluções padrões de primaquina, mefloquina e paracetamol, os quais podem ser administrados conjuntamente com a cloroquina para o tratamento da malária. As amostras foram submetidas à extração conforme item 4.6 e analisadas segundo as condições cromatográficas descritas no item 5.1.

4.7.2.3. Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado a partir da injeção no cromatógrafo das diluições sucessivas das soluções de trabalho de cloroquina e desetilcloroquina. O limite de detecção foi considerado 3 vezes o desvio padrão da linha de base (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

4.7.2.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação foi determinado com calibradores diluídos contendo cloroquina e desetilcloroquina os quais foram submetidos ao procedimento de extração descrito no item 4.6 e analisadas segundo as condições cromatográficas descritas no item 5.1. As relações das áreas da cloroquina, desetilcloroquina e do padrão interno nas diversas concentrações avaliadas foram empregadas para obtenção do coeficiente de variação. As análises foram realizadas em quintuplicata e o limite de quantificação foi considerado aquele que apresentou coeficiente de variação inferior a 15% (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

4.7.2.5. Curva de calibração

Foram utilizados calibradores contendo cloroquina e desetilcloroquina, em concentrações de 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 ng/mL, respectivamente, os quais foram analisados em quintuplicata. As relações das áreas e do padrão interno foram plotadas no eixo da ordenada e as concentrações na abscissa. Foi realizada a regressão linear para obtenção da equação da reta e calculado o coeficiente de correlação de Pearson (r).

4.7.2.6. Precisão do método

A precisão intra-ensaio foi determinada por meio da análise, em um mesmo dia, de cinco réplica de calibradores enriquecidos com os analitos de interesse, nas concentrações de 1000, 500 e 100 ng/mL. Já a precisão interensaio foi estudada por meio da análise, em cinco dias seguidos, em quintuplicata, empregadas amostras controle contendo cloroquina e desetilcloroquina, nas concentrações de 1000, 500 e 100 ng/mL. Todas as réplicas da precisão intra e interensaio foram submetidas às condições de extração descritas no item 4.6 e cromatográficas apresentadas no item 5.1.

A precisão do método (intra e inter ensaio) foi avaliada por meio da determinação do coeficiente de variação (CV).

4.7.2.7. Recuperação

No estudo da recuperação absoluta do método, foram empregado s controles contendo cloroquina e desetilcloroquina e m concentrações de 1000, 500 e 100 ng/mL. As relações das áreas da cloroquina e de seu metabólito e do padrão interno nas diversas concentrações das amostras controle, obtidas após o procedimento de extração foram comparadas aquelas resultantes da injeção direta no cromatógrafo da solução de cloroquina e do padrão interno, nas respectivas concentrações. Os resultados foram expressos em porcentagem da área da amostra extraída, em relação aquela da solução injetada diretamente no cromatógrafo, que representa 100%. As amostras foram analisadas em quintuplicata durante três dias consecutivos.

4.7.2.8. Estabilidade

As estabilidades da cloroquina e desetilcloroquina em sangue total adsorvido em papel de filtro foram determinadas por meio de calibradores adicionados dos referidos analitos em concentração de 1000 ng/mL. Três “spots” foram submetidos, no mesmo dia do preparo, às condições de extração especificada no item 4.6 e cromatográfica conforme 5.1., sendo o resultado obtido considerado como o do tempo zero do experimento. Os “spots” foram armazenados em

envelopes a temperatura ambiente e analisados separadamente em diferentes dias após o preparo. Os resultados obtidos nestes dias foram comparados com aquele encontrado no tempo zero, aceitando-se uma variação máxima de 15%. A estabilidade dos analitos foi acompanhada até um período considerável satisfatório aos objetivos do trabalho (30 dias).

4.7.2.9. Robustez

Para estudo de robustez foram testadas algumas condições dos parâmetros mais sujeitos a variação: pH e composição da fase móvel.

4.7.3. Aplicação do método validado em papel de filtro contendo sangue total de pacientes com malária vivax

Alíquotas de sangue total adsorvidas em papel de filtro de indivíduos com diagnóstico positivo para malária vivax, utilizando cloroquina na dose de 25mg/dia obtidas como descrito no item 4.2 foram submetidas ao procedimento de extração descrito em 4.6. e às condições cromatográficas relatadas em 5.1.

4.10. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Considerando-se que as concentrações plasmáticas de quimioterápicos devem apresentar distribuição normal e variâncias iguais na população de estudo, foram empregados testes paramétricos para a avaliação dos diversos parâmetros de validação analítica, com auxílio dos programas *BIOSTAT 5.0®* E *INSTAT®*. O nível de significância aceito foi de 5%.

4.11. ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi desenvolvido com amostras biológicas coletadas para as pesquisas associadas ao projeto RAVREDA. Este foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas sob o protocolo nº 004/2003/CEP/IEC/SVS/MS (ver anexo). Todos os procedimentos seguiram as orientações da resolução 196/96 do CONEP.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas otimizadas que foram utilizadas para validação da metodologia analítica estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros cromatográficos utilizados para validação da metodologia analítica

PARÂMETRO	CONDIÇÃO
Detecção	UV (λ = 333 nm)
Fluxo	1,2 mL/min
Coluna	C8, 5 μ m X-terra 4.6 X 150mm (Waters, Saint Quentin-en-Yvelines, France [®]).
Fase móvel	Acetonitrila:solução aquosa de trietilamina a 0,2 %, pH de 10,5 (40:60)
Volume de injeção	50 μ L

Nestas condições cromatográficas, os tempos de retenção da cloroquina, desetilcloroquina e da quinina estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Tempos de retenção de quinina, desetilcloroquina e cloroquina na concentração de 20 μ g/ml e 1000 ng/ml.

ANALITO	TEMPO DE RETENÇÃO
Quinina	6,0 minutos
Desetilcloroquina	14,0 minutos
Cloroquina	20,0 minutos

5.2. PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO

5.2.1. Linearidade

A linearidade do procedimento, juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação de Pearson (r) para a cloroquina e desetilcloroquina estão apresentados nas figuras 10 e 11, respectivamente.

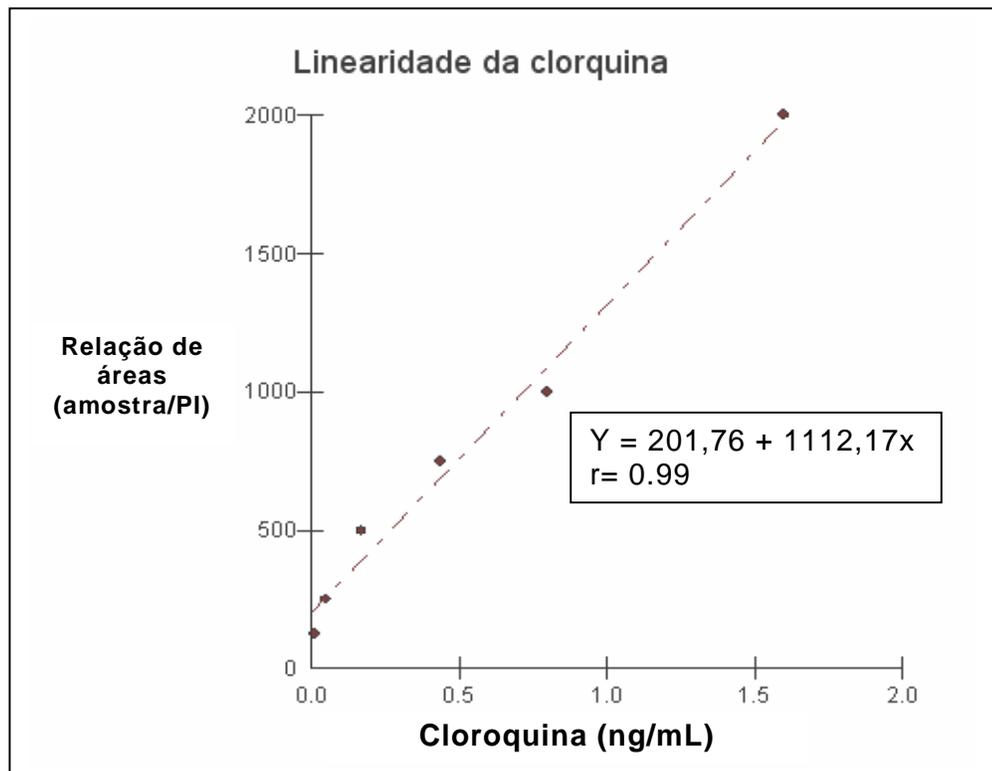


Figura 10: Representação gráfica da linearidade da cloroquina

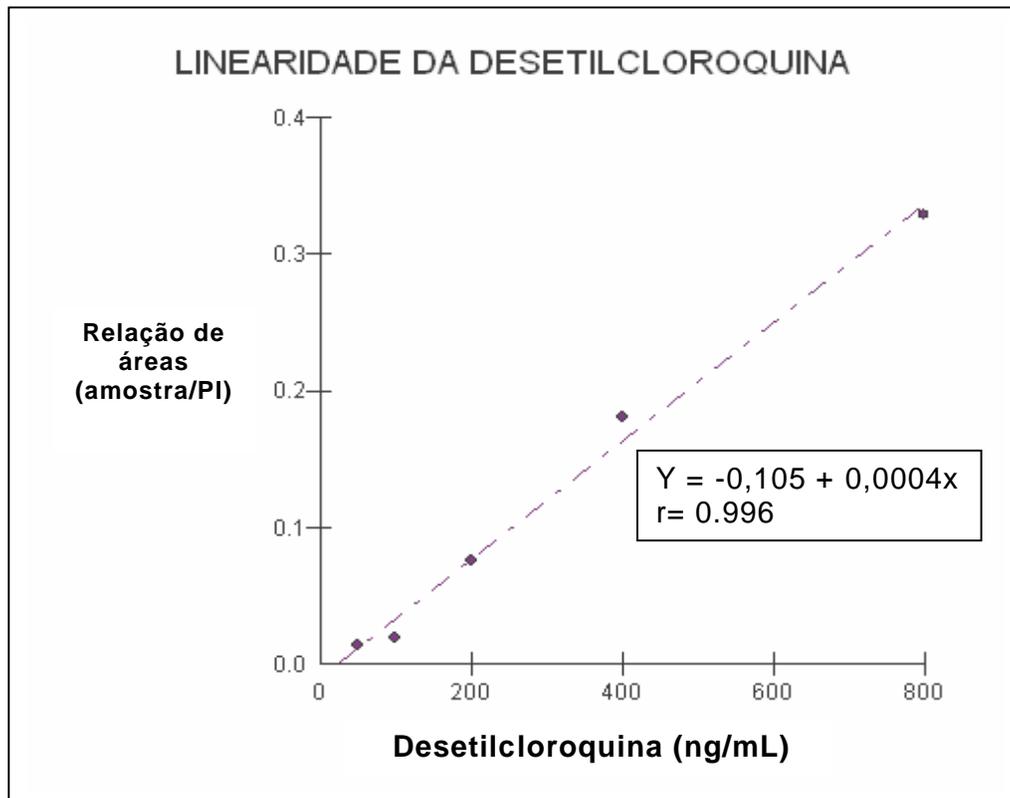


Figura 11: Representação gráfica da linearidade da desetilcloroquina

5.2.2. Seletividade

Como mostrado na tabela 6 todos os eventuais interferentes selecionados apresentaram tempos de retenção distintos daqueles encontrados para os analitos de interesse, assim como para o padrão interno.

Tabela 6: Medicamentos com seus respectivos tempos de retenção para identificar a possível interferência de quimioterápicos administrados em associação com cloroquina

MEDICAMENTOS	TEMPO DE RETENÇÃO
Primaquina	NE
Mefloquina	8,2
Paracetamol	3,5
Quinina	6,0
Desetilcloroquina	14,0
Cloroquina	20,0

N.E: Não eluiu nas condições cromatográficas padronizadas

5.2.3. Limite de detecção

O limite de detecção do método, obtido conforme descrito no item 4.7.2.3. foi de 62,5 ng/mL para a cloroquina e de 50 ng/mL para desetilcloroquina.

5.2.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação do determinado conforme especificado no item 4.7.2.4., foi de 100 ng/mL para a cloroquina e de 100 ng/mL para desetilcloroquina.

5.2.5. Curva de calibração

A curva analítica, com a respectiva equação da reta e o coeficiente de correlação de Pearson (r), para cloroquina e desetilcloroquina, obtidos conforme 4.7.2.5 são mostrados nas figuras 12 e 13, respectivamente.

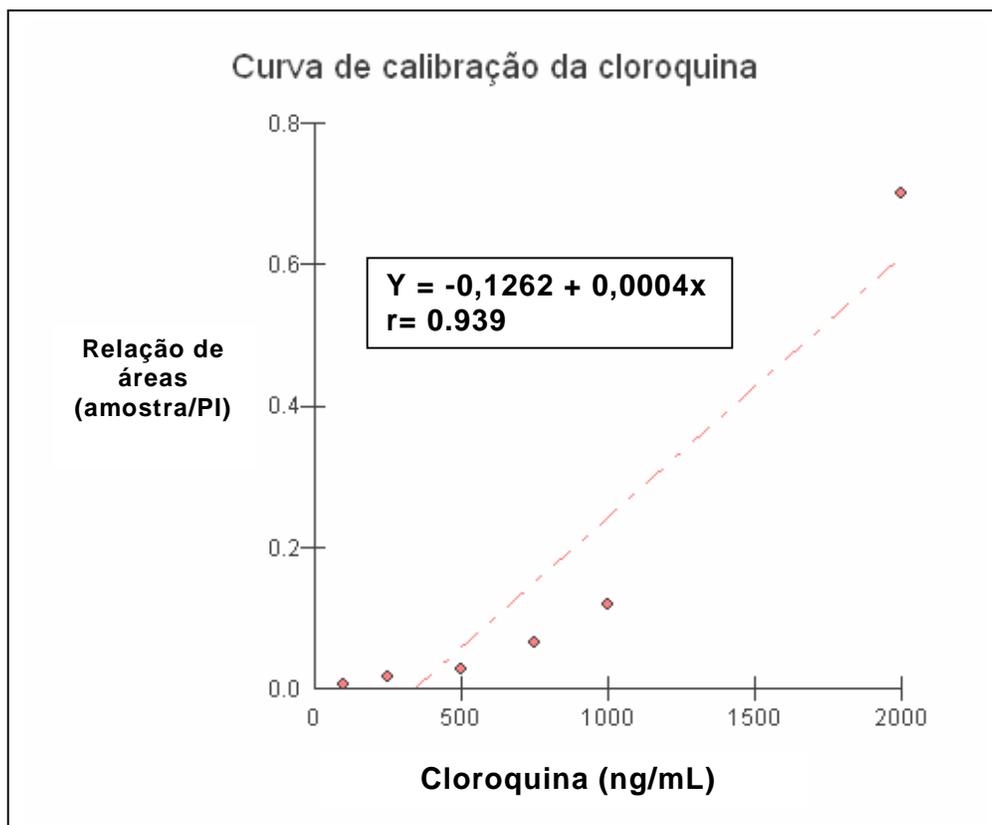


Figura 12: Representação gráfica da curva de calibração cloroquina

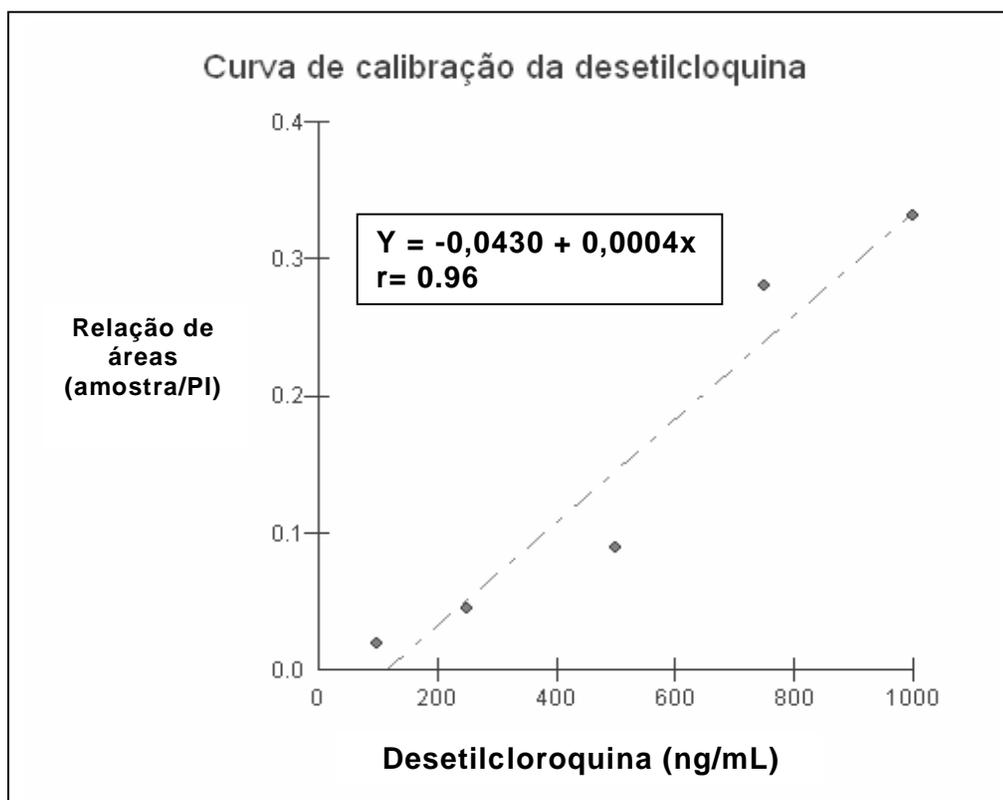


Figura 13: Representação gráfica da curva de calibração da desetilcloroquina

5.2.6. Precisão do método

Os valores dos coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio do método cromatográfico selecionado, calculados conforme o descrito no item 4.7.2.6 estão mostrados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Precisão intra ensaio e inter ensaio da cloroquina, expressa como coeficiente de variação.

CLOROQUINA ng/ml	n	COEFICIENTE DE VARIÇÃO INTRA ENSAIO (%)	n	COEFICIENTE DE VARIÇÃO INTER ENSAIO (%)
1000	5	10	25	10
500	5	6	25	5
100	5	6	25	8

Tabela 8: Precisão intra ensaio e inter ensaio da desetilcloroquina, expressa como coeficiente de variação.

DESETILCLOROQUINA ng/ml	n	COEFICIENTE DE VARIÇÃO INTRA ENSAIO (%)	n	COEFICIENTE DE VARIÇÃO INTER ENSAIO (%)
1000	5	10	25	10
500	5	6	25	4
100	5	8	25	8

5.2.7. Recuperação

As recuperações da cloroquina e desetilcloroquina, obtidas conforme descrito no item 4.2.3.7, estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9: Recuperação absoluta do método de extração para a determinação de diferentes concentrações de cloroquina e desetilcloroquina

COLORQUINA ng/ml	n	REC (%)	n	DESETILCOLORQUINA ng/ml	REC (%)
1000	5	105	5	1000	105
500	5	103	5	500	98
100	5	90	5	100	95

5.2.8. Estabilidade

A figura 14 mostra os resultados obtidos no estudo da estabilidade química da cloroquina e desetilcloroquina (item 4.2.3.8). Foi observado que, durante 30 dias, as amostras mantidas a temperatura ambiente, não apresentaram concentrações com variações superiores a 15%.

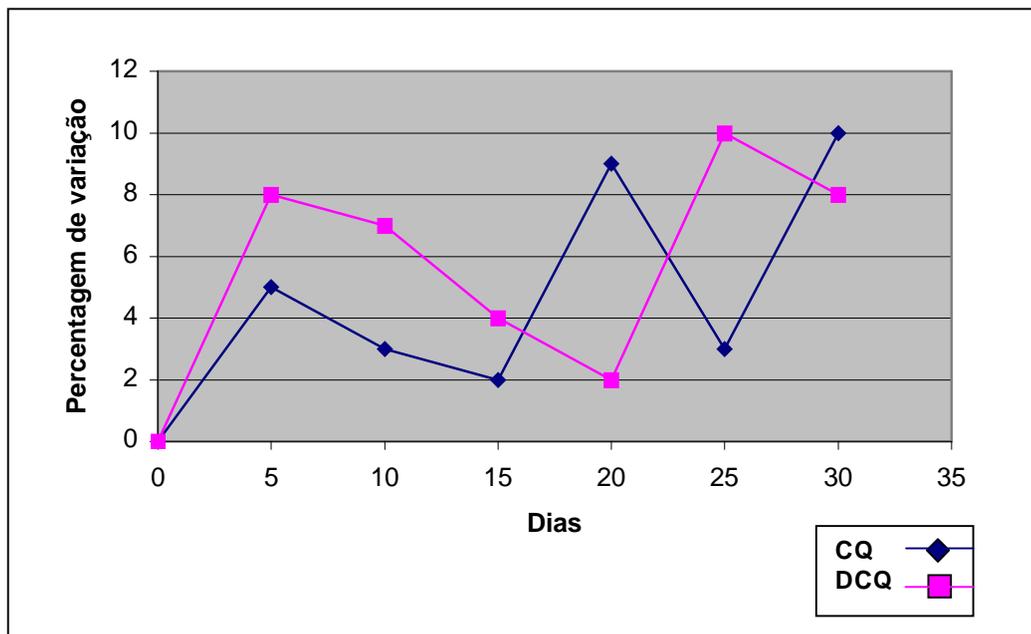


Figura 14: Representação gráfica da variação encontrada na concentração de cloroquina e desetilcloroquina em "spots" mantidos a temperatura ambiente durante 30 dias.

5.2.9. Robustez

Para avaliação da robustez do procedimento foi variada a concentração do solvente orgânico, acetonitrila, nas proporções de 40:60 (v/v), 50:50 (v/v) e 60:40 (v/v), assim como o pH da fase móvel. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Avaliação da robustez do método alterações no valor da proporção dos solventes, pH de acordo com as condições cromatográficas previamente padronizadas.

Variação	Tempo de Retenção (min)			
	n	Quinina	desetilcloroquina	Cloroquina
Acetonitrila : H₂O 0,01%triethylamina (40:60, v/v) , fluxo 1ml/min. pH= 9,8	5	5,3	9,6	16,5
Acetonitrila : H₂O 0,01%triethylamina (40:60, v/v) , fluxo 1ml/min. pH= 10,8	5	4,7	5,6	11,4
Acetonitrila : H₂O 0,01%triethylamina (60:40, v/v), fluxo 1ml/min. pH= 11	5	2,9	7,2	6,8
Acetonitrila : H₂O 0,01%triethylamina (50:50, v/v) , , fluxo 1ml/min. pH= 11	5	2,0	5,0	8,3

5.2.10. Resultados da aplicação do método validado em papel de filtro contendo sangue total de pacientes com malária vivax

Os resultados da análise da cloroquina e desetilcloroquina nos pacientes com malária vivax, submetidos ao método validado, são apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Concentrações plasmáticas de cloroquina e desetilcloroquina (ng/mL) em D3, em pacientes com malária vivax, oriundas de Manaus, no período de setembro a outubro de 2008.

PACIENTES	n	CQ ng/mL	DESCQ ng/mL
1	3	467,245	270,554
2	3	733,042	239,585
3	3	1165,823	379,221
4	3	808,597	193,085
5	3	1357,3	ND
6	3	1814,724	315,940
7	3	1588,029	755,197
8	3	1478,478	514,868
9	3	1708,427	271,459
10	3	1538,948	281,255
\bar{X}	30	1266±455	357±165

CQ= Cloroquina; DESC= Desetilcloroquina; n= n° de replicatas;

ND= Não determinado; X= média aritmética; ± desvio padrão.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de um método analítico envolve processos que estimem sua eficiência na rotina laboratorial. Este processo costuma ser denominado de validação, que deve ser realizada quando se desenvolve ou se efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos (BRITO et al, 2003).

No presente trabalho o método foi validado para a identificação de cloroquina e de desetilcloroquina, empregando -se detector de ultravioleta, disponível em boa parte dos laboratórios dos países da América Latina.

A literatura dispõe de vários trabalhos que relatam a determinação da cloroquina e de seu principal metabólito (PATCHEN et. al, 1983; YONEMITSU et.al, 2005; SAMANIDOU et. al, 2005; DENG et. al , 2006; LEJEUNE et. al, 2007), sendo sua quantificação de extrema importância, por exemplo, para estudos farmacocinéticos ou na avaliação epidemiológica de resistência do *Plasmodium vivax* a esta droga. Ressalta-se que a cada ano, registra-se na literatura médica um número cada vez maior de relatos e ensaios terapêuticos, sobre a possível emergência da resistência *in vivo* do *Plasmodium vivax* as doses de cloroquina usadas rotineiramente pelos serviços de saúde (GARRAVELLI et al, 1992; ARIAS et al, 1989; PHILLIPS et al, 1996; KSHIRSAGAR et al, 2000, F RYAUFF et al, 1998; MALAR-THAN, et al, 1995).

As condições cromatográficas para a análise de cloroquina e desetilcloroquina basearam-se no trabalho de Patchen et. al, (1983), que utilizaram detector de fluorescência para a identificação e quantificação destes compostos presentes em sangue total adsorvido em papel de filtro e apresentaram concentrações na faixa de nanogramas por mililitro.

A escolha do sangue total como amostra biológica para validação desta metodologia analítica é justificada pelo estudo de Bergqvist et. al (1983), que

demonstraram que 70 a 85% da cloroquina e desetilcloroquina foram recuperadas das células sanguíneas isoladas de sangue total, indicando que esta droga acumula-se na parte figurada do sangue.

Para o desenvolvimento desta técnica foram testadas várias condições cromatográficas, procurando encontrar aquelas mais adequadas a separação da cloroquina, desetilcloroquina e quinina (padrão interno). Modificações no pH, comprimento de onda, composição e vazão da fase móvel foram testadas, buscando sempre o máximo da relação sinal/ruído (tabela 5). Deng et. al (2006), ao utilizarem condições cromatográficas semelhantes obtiveram boa separação de uma candidata a 4 -aminoquinolina (AQ-13), cloroquina e seus metabólitos em sangue total, empregando uma coluna C18 (Xterra RP18), fase móvel contendo 60% de tampão borato e 40% de acetonitrila, fluxo de 1,0 mL/min e pH 9,0.

O padrão interno selecionado foi a quinina. Neste sentido, sabe-se que a utilização do padrão interno confere maior reprodutibilidade ao método, pois minimiza as variações que podem ocorrer nas diversas etapas do procedimento, quanto as oscilações do próprio equipamento (detector, coluna, bomba ou vazão). Assim, a identificação dos analitos de interesse por meio do tempo de retenção em relação ao padrão interno, garante maior confiabilidade à análise qualitativa, enquanto a quantificação por meio da relação de áreas dos picos cromatográficos obtidos após a análise do analito de interesse e do padrão interno assegura maior qualidade dos resultados (RIBANI et. al, 2004).

Outro parâmetro analítico essencial na validação dos métodos bioanalíticos é a seletividade ou especificidade, pois a identificação errônea (falso positivo ou falso negativo) de uma substância compromete os resultados da análise. Os resultados dos testes de seletividade realizados (item 5.2.2) indicaram que a matriz utilizada não apresentou interferência para a identificação dos analitos de interesse. A adequada seletividade do método foi confirmada frente às diversas substâncias testadas como possíveis interferentes, como por exemplo, a primaquina e o paracetamol (tabela 7).

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram a adequada separação das substâncias analisadas tanto da cloroquina como do seu metabólito por CLAE.

Pequenas modificações nos parâmetros estabelecidos no método foram realizadas, e nenhuma alterou significativamente a identificação ou quantificação dos analitos. Variações nas proporções do solvente orgânico, pH e na vazão da fase móvel não modificaram de maneira significativa a resolução dos analitos de interesse, sugerindo uma robustez adequada do método, característica indispensável para a qualidade analítica (BRITO et. al 2003). Neste sentido, optou-se pela proporção 40:60 v/v e fluxo de 1,2 mL/min para melhor separação dos compostos de interesse mantendo-se a adequada resolução cromatográfica considerando possíveis interferentes na extração da matriz biológica.

A linearidade apresentou baixa dispersão dos pontos experimentais, com relação das áreas diretamente proporcionais às concentrações dos analitos, que foi caracterizado pelo coeficiente de correlação (r) superior a 0,99 (FDA, 1994; GIBMV, 2001; ANVISA, 2003).

Não foi possível comparar os resultados dos limites de detecção e de quantificação encontrados no método CLAE/UV com os dados da literatura, uma vez que a maioria destes valores foi obtida em condições cromatográficas distintas das empregadas no presente estudo, alguns destes utilizando detecção por fluorescência (PATCHEN et. al, 1983; YONEMITSU et.al, 2005; SAMANIDOU et. al, 2005; DENG et. al , 2006; LEJEUNE et. al, 2007).

A precisão do método avaliada a partir do coeficiente de variação das relações das áreas, tanto intra-ensaio, quanto inter-ensaio, apresentou valores adequados, segundo as recomendações vigentes, isto é, inferiores a 15% (FDA, 1994; GIBMV, 2001; ANVISA, 2003).

A extração dos analitos foi realizada de forma simples e rápida, sem exigir o uso de instrumentos ou reagentes dispendiosos. É desejável que os valores de recuperação estejam próximos a 100%, indicando perdas mínimas durante o processo. Entretanto, valores de recuperação entre 85 a 115%, são aceitos quando se trabalha com matrizes complexas, métodos com várias etapas analíticas e baixas concentrações do analito na matriz biológica (RIBANI, et al. 2004). Os dados apresentados na tabela 10 demonstraram recuperação satisfatória, sempre acima de 85%, concordando com outros trabalhos que empregaram meios líquidos para separação e extração de cloroquina e desetilcloroquina de amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro (DENG, H. et al. 2001; LEJEUNE, D. et al. 2007).

É desejável que uma amostra apresente resultados confiáveis e reprodutíveis por certo período de tempo sob determinadas condições ambientais, ou seja, que a estabilidade química dos analitos seja suficiente para que o armazenamento possa ser feito com segurança (FDA, 2001).

O presente trabalho avaliou a estabilidade dos analitos de interesse adicionados em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro (temperatura ambiente) durante 30 dias. Os resultados foram adequados de acordo com as recomendações vigentes, isto é, a diferença entre as concentrações após o período de armazenamento foi inferior a 15%.

Considerando um desenvolvimento cromatográfico de 25 minutos para cada análise, houve o cuidado de avaliar a estabilidade da cloroquina e desetilcloroquina tanto nas soluções padrões, preparadas com ácido clorídrico 0,01 N e metanol como na amostra processada para análise. No primeiro caso foi verificado que as substâncias de interesse preparado com o ácido diluído foram estáveis em intervalo de pH de 4,0 a 6,5 (WINDHOLZ et. al, 1983) não verificando interferência na utilização do solvente orgânico. Já no segundo caso foi caracterizada a estabilidade dos analitos nas amostras processadas para análise de até 7 horas e de 24 horas acondicionadas a uma temperatura de 4° C.

A aplicação da metodologia proposta para identificação de cloroquina e desetilcloroquina nas amostras de sangue de pacientes com malária vivax utilizando cloroquina, por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta, demonstrou adequada capacidade de quantificar os compostos de interesse, pois a curva de calibração com ampla faixa linear, foi capaz de quantificar com precisão tanto concentrações baixas quanto aquelas altas.

Ao analisar as alíquotas de sangue total (100 µL) adsorvidas em papel de filtro de pacientes com malária vivax usando cloroquina, cedidas pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMTAM - (situada em Manaus-Amazonas), os resultados encontrados corroboraram com o trabalho de Baird et al. (1996). Neste estudo sobre resistência do *P. vivax* a cloroquina realizado na Indonésia, os níveis desta droga no sangue total no último dia do regime terapêutico empregado (3 doses de 10 mg/kg, 10 mg/kg, 5 mg/kg em um intervalo de 24 horas) variaram de 413 a 3248 ng/mL com média de 1141 ng/mL ± 616 ng/mL. Estes valores corroboram com o presente trabalho onde a média de concentração de cloroquina encontrada foi de 1266,061 ± 455 ng/mL.

Em outro estudo de diagnóstico da resistência do *P. vivax*, a média da soma dos níveis de cloroquina e desetilcloroquina foi de 141 ng/ml, 28 dias após o início da terapia padrão (25 mg base/Kg) (BAIRD K., et al., 1997).

Ressalta-se, portanto, a importância da quantificação destas substâncias em amostras biológicas, como indicador de aderência ao tratamento auxiliando de forma única o trabalho de pesquisadores no combate da malária.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Após a realização do presente trabalho pode -se concluir que:

- O método validado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta, apresentou parâmetros de desempenho condizentes aos objetivos do trabalho e estão em conformidade com os parâmetros recomendados pelos órgãos internacionais e pela legislação sanitária vigente no país;

- A cloroquina e seu metabólito apresentaram estabilidade quando adicionadas as alíquotas de sangue total adsorvidas em papel de filtro, o que demonstra sua aplicabilidade na coleta de material biológico de pacientes;

- Os níveis de cloroquina em sangue total adsorvidas em papel de filtro em pacientes com malária vivax variou de 467,245 ng/mL (acima LQ) a a 1814,724 ng/mL;

- Os níveis de desetilcloroquina em sangue total adsorvidas em papel de filtro em pacientes com malária vivax variou de 193,05 ng/mL (acima LQ) a valores superiores 755,197 ng/mL (dentro limite superior da faixa linear do método);

- Os baixos custos operacionais e a possibilidade de ser realizado na maioria dos laboratórios de médio porte de países em desenvolvimento como o Brasil, integrados ao RAVEDRA, justifica a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para Validação de Métodos Analíticos. Resolução** – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

ALRAJHI, A.; FRAYHA, H. H. Chloroquine-Resistant *Plasmodium Falciparum*: Is it our turn?. **Annals of Saudi Medicine**, v. 17, n. 2, p. 151-155, 1997.

ANDRADE, J. G.; ANDRADE, A. L. S. S.; ARAUJO, E. S. O. Ensaio clínico aleatório duplo cego com cloroquina em dose alta para tratamento da malária por *Plasmodium falciparum* no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.34, n.5, p.467-473, 1992.

AYRES, M; AYRES Jr, M; AYRES, D. L; SANTOS, A. A. S. **Bioestatísticas aplicações estatísticas nas áreas das ciências Bio -Médicas**. 4 ed. Belém, 2005.

ARIAS AE, CORREDOR A. Low response of Colombian strains of *Plasmodium vivax* to classical antimalarial therapy. **Trop Med Parasitol**; 40:21–23, 1989.

BAIRD, J.K. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4075-4083, 2004.

BAIRD K.; LEKSANA., B.; MASBAR S.; FRYAUFF D. J.; SUTANI HARDJA M. A.; STEPHEN F. S.; HOFFMAN S. L. Diagnosis of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax*: timing of recurrence and whole blood chloroquine levels. **The American of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56(6), p. 621-626, 1997.

BAIRD K.; NALIM, S.; BASRI, H.; MASBAR S.; LEKSANA, B.; TJITRA, E.; DEWI, R. M.; KHAIRANI, M.; WIGNALL, F. S. Survey of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Indonesia. **Transactions of The Royal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 90, p. 409-411, 1996.

BERGQVIST, Y.; NYBERG, B. D. Distribution of chloroquine in human blood cells and its implication for the quantitative determination of these compounds in serum and plasma. **Journal of chromatography**. V. 272, p. 137-148, 1983.

BERLINER, R. W., D. P. EARLE, JR., J. V. TAGGART, C. G. ZUBROD, W. J. WELCH, N. J. CONAN, E. BAUMAN, S. T. SCUDDER, AND J. A. SHANNON. Studies on the chemotherapy of the human malaria. VI. The physiological disposition, antimalarial activity, and toxicity of several derivatives of 4-aminoquinoline. **Journal Clinical Investigation**. V. 27, p. 98–107, 1948.

BJÖRKMAN, A.; BHATTARAI, A. Public health impact of drug resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Acta Tropica**, v. 94, p. 163-169, 2005.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE / CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA / ASSESORIA DE DESCENTRALIZAÇÃO E CONTROLE DE ENDEMIAS / CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. **Manual de Terapêutica da Malária**. 6 ed., Brasil, 2001.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE / CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA / ASSESORIA DE DESCENTRALIZAÇÃO E CONTROLE DE ENDEMIAS / CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. **1º Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6 ed., Brasília, 2005.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE / CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA / SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Situação epidemiológica da Malária no Brasil 2005**, Brasil, 2005.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE / CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA / SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica**, Brasil, 2008.

BRITAIN, H.G. Validação de Métodos analíticos não cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, junho, 1998.

BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. J.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. v. 13, p. 129-146, 2003.

CAMARGO E. P. Malária, maleita, paludismo. **Ciência e Cultura**, v.55, n.1 São Paulo Jan./Mar, 2003.

CARDOSO, C. D.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of the metabolites of hydroxychloroquine and application to an in vitro metabolic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p.703-708, 2005.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de método por HPLC fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: Ed. de São Carlos, p.71, 2001.

CDC – Center of Disease Control and Prevencion. Schema of the Life Cycle of Malaria, 2006. Disponível em:

< http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm >. Acesso em: 15 de outubro de 2006.

COATNEY, G. R., D. S. RUHE, W. C. COOPER, E. S. JOSEPHSON, AND M. D. YOUNG. Studies in human malaria. X. The protective and therapeutic action of chloroquine (SN 7618) against St. Elizabeth strain of vivax malaria. **The American of Tropical Medicine and Hygiene** . 49:49–59, 1949.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia In.: **Introdução a métodos cromatográficos**. 4 ed. Campinas: Ed. da Unicamp, cap. 1, p.13., 1990.

CORNEJO, O. E.; ESCALANTE, A. A. The origin and age of *Plasmodium vivax*. **Trends in Parasitology** v.22, n.12, 2006.

CRAIGE, B., JR., A. S. ALVING, R. JONES, JR., C. M. WHORTON, T. N. DULLMAN, AND L. EICHELBERGER. The Chesson strain of *Plasmodium vivax* malaria. II. Relationship between prepatent period, latent period, and relapse rate. **Journal Infectology Disease**. V. 80, p. 228–236, 1947.

CRAWLEY, J. Malaria: new challenges, new treatments. **Current. Paediatrics**, n.9, p.34-41, 1999.

DAILY, J. P. Antimalarial Drug Therapy: The Role of Parasite Biology and Drug Resistance. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, p.1487-1497, 2006.

DEGANI, G.L.A.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova Escola – Cromatografia**, v. 7, p. 21-25, 1998.

DENG, H.; LIU, H.; KROGSTAD, F. M.; KROGSTAD, D. J. Sensitive fluorescence HPLC assay for AQ-13, a candidate aminoquinoline antimalarial, that

also detects chloroquine and *N*-dealkylated metabolites. **Journal of chromatography B**. v. 833, p. 122-128, 2006.

Farmacopéia Brasileira, 3ª ed, Organização Andrei Editora, 1977.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation, may 2001. Acessado em setembro de 2006. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance>>. Acesso em: setembro de 2006.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – Reviewer guidance Validation of chromatographic methods, november 1994. Acessado em outubro de 2006. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance>>. Acesso em: outubro de 2006.

FERREIRA, M. S. Malária: Conceito, etiologia e ciclo evolutivo, In.: Veronesi, R. **Tratado de Infectologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 1589 -1613.

FERRARONI, J. J. Malária falciparum resistente a cloroquina e ao Fansidar tratada com minociclina. **Revista de Saúde Pública**, S. Paulo, v. 17, p. 328-31, 1983.

FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: Mechanisms of action and resistance. **International Journal for Parasitology**. v. 27, p. 231-240, 1997.

GAUDIANO, M. C.; ANTONIELLA, E.; BERTOCCHI, P.; VALVO, L.; Development and validation of reversed-phase LC method for analysing potentially counterfeit antimalarial medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**,v.42, p.132-135, 2006.

FRYAUFF DJ, SOEKARTONO, TUTI S, LEKSANA B, SURADI, TANDAYU S, BAIRD JK. Survey of resistance *in vivo* to chloroquine of *Plasmodium falciparum* and *P.*

vivax in North Sulawesi, Indonesia. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**; 92(1):82-83, 1998.

GARRAVELLI OL, CORTI E. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: the first case in Brazil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**; v. 86, p. 128, 1992.

GDDIP- Guia Digital de doenças Infecciosas e Parasitárias 2006. disponível em: <<http://www.pdamed.com.br>>. Acesso em: 25 de julho de 2006.

GREEN, M. D.; NETTEY, H.; ROJAS, O. V.; PAMANIVONG, C.; KHOUNSAKNALATH, L., ORTIZ, .G.; NEWTON, P. N.; FERNANDEZ, F. M.; VONGSACK, L.; MANOLIN, O. Use of refractometry and colorimetry as field methods to rapidly assess antimalarial drug quality. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** , v.43, p.105-110, 2006.

GIBMV-GUIDANCE FOR INDUSTRY-BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION, 2001. Acessado em outubro de 2006. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance>>. Acesso em: outubro de 2006.

GUIMARÃES, L.F.L; COLLINS, C.H.; Cromatografia líquida de alta eficiência. In. : **Introdução a métodos cromatográficos**. 4 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1990. cap. 9 p. 184.

GUZMÁN V., CARMONA-FONSECA, J. El citocromo P-450 y la respuesta terapéutica a los antimaláricos. **Revista Panamericana Salud Publica** , v.19(1), p.9-22, 2006.

HOLMBERG, M. F.; BERGQUIST, Y.; TERMOND, E.; NYBERG, B.D. The single dose kinetics of chloroquine and its major metabolite desethylchloroquine in

healthy subjects. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 26, p. 521-530, 1983.

KRISHNA, S.; WHITE, N.J. Pharmacokinetics of Quinine, Chloroquine and Amodiaquine. Clinical Implications. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 30, p. 263-299, 1996.

KSHIRSAGAR NA, GOGTAY NJ, RAJGOR D, DALVI SS, WAKDE M. An unusual case of multi-drug resistant *Plasmodium vivax* malaria in Mumbai (Bombay), India. **Annals Tropical Medicine Parasitology**; v. 94: p. 189–190, 2000.

KUMAR, G. N.; SURAPANENI, S. Role of drug metabolism in drug discovery and development. **Medicinal Research Reviews**. v. 21, p. 397-411, 2001.

LANÇAS, F. M. 10o Congresso Latino Americano de Cromatografia COLACRO. **Revista Analytica**, Brasil, v. 5, n. 2, p. 60-63, 2004.

LEJEUNE, D.; SOULETIE, I.; HOUZE, SANDRINE; BRICON, T. L.; BRAS, J. L.; GOURMEL, B.; HOUZE, P. Simultaneous determination of monodesethylchloroquine, chloroquine, cycloguanil and proguanil on dried blood spots by reverse-phase liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 43, p. 1106-1115, 2007.

LÓPES-ANTUÑANO F. Epidemiology and control of malaria and other arthropod born diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 105-14, 1992.

LOISEAU, P.M.; LE BRAS, J. New drugs against parasitic diseases. **Revista. Praticiens**, v.57, p.175-182, 2007.

MALAR-THAN, MYAT-PHONE-KYAW, AYE-YU-SOE, KHAING-KHAINGGYI, MA-SABAI, MYINT-DO. Development of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Myanmar. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene** ; v. 89, p. 307–308, 1995.

MARSH, K; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 51–60, 2006.

MILLER, H. M.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673-679, 2002.

MOHAPATRA, M. K.; PADHIARY, K.N.; MISHAR, D.P., SETHYG. Atypical manifestations of *P. vivax* malaria. **Journal of Mariology**. v. 39, p. 18-25, 2002.

MOITA, J. M. N.; MOITA, G. C. Fundação do Amparo a Pesquisa do Estado do Piauí 2006. Disponível em:<<http://www.fapepi.pi.gov/ciencia/documentos>> Acesso em: 01 de fevereiro de 2007.

MOST, I. M., C. A. KANE, P. H. LAVIETES, E. F. SCHROEDER, AND J. M. HAYMAN Chloroquine for treatment of acute attacks of vivax malaria. **Journal of the American Medical Association** v. 131, p. 963–967, 1946.

MURY, C. B.; KUMAR S. Plasmodium-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. **Cellular microbiology**, v. 7, p. 1539-1545, 2005.

MYONG-DON, O.H.; HYUNGSHIK, S.; DONGHYUN, S.; SUNHEE, L., NAMJOUNG, K. Clinical features of vivax malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p143-146, 2001.

NTOUMI, F.; DJIMDE, A. A.; MBACHAM, W.; EGWANG, T.; The importance and future of malaria research in Africa. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, pp.iv, 2004.

OPAS – Organização Pan- Americana da Saúde. 126ª sessão do comitê executivo,CE 126/18 (Port.), 2000.

OTELO, V.A.; LA-SCALEA, M.A.; FERREIRA, E.I.; MENEZES, C.M.S.; Análise comparativa das propriedades físicas e químicas entre compostos tricíclicos e cloroquina, **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, 2002.

PAREDES, S. F.; SANT´ANA, P.; MOREIRA, A. B.; KUBOTA, L.T.; SOTOMAYOR, M. D. P.T.; LANZA, M. R. V.; DIAS, I. L. T. Determinação Fluorimétrica de Cloroquina em Fase Sólida: Aplicação em Amostras Farmacêuticas, **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química** , Poços de Caldas, 2002.

PATCHEN, L.C.; MOUNT, D.L.; SCHWARIZ, I.K.; CHURCHIL, F.C. Analysis of filter- paper- absorbed, finger-stick blood samples for chloroquine and its major metabolite using high performace liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of chromatography** , v. 278, p.81-89, 1983.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, v. 64(2), p. 227-229, 2007.

PHILLIPS EJ, KEYSTONE JS, KAIN KC. Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America. **Clinical Infection Disease**; v. 23, p. 1171–1173, 1996.

PIMENTEL, L. F.; JACOME JUNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F. ; MAGALHÃES, N. S. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento

da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 503-514, n 4, 2007.

PINTO, A. Y. N., AZEVEDO, C. H., SILVA, J. B.; SOUZA, J. M. Cloroquina em dose simples no tratamento da malária por *Plasmodium vivax* na Amazônia brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol.45, n.6, p.327-331, 2003.

PIRES, A.; BORGES, A.; ADRAGÃO, T.; SILVA, M.; BORGES, F. Malária e Rim. **Medicina Interna**, v. 8, p. 99-100, 2001.

PROJEAN, D.; BAUNE, B.; FARINOTTI, R.; FLINOIS, J. P.; BEAUNE, P.; TABURET, A. M.; DUCHARME, J. In vitro metabolism of chloroquine: identification of CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing n-desethylchloroquine formation. **The American Society for Pharmacology Therapeutics**, v. 31, p. 748-754, 2003.

PRUDENCIO, M; RODRIGUEZ, A; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 849-856, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koongan, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, p. 771-780, 2004.

RICHIE TL, SAUL A. Progress and challenges for malaria vaccines. **Nature**, v. 415, p. 694-70, 2002.

SAMANIDOU, V. F.; EVAGGELOPOULOU, E. N.; PAPADOYANNIS, I. N. Simultaneous determination of quinine and chloroquine anti-malarial agents in pharmaceuticals and biological fluids by HPLC and fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 21-28 2005.

SILVA, L.H.P.; OLIVEIRA, V.E.G. The malaria challenge: the Brazilian case and what can be expected from progress in genomics. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.7, 2002.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil. **Centro de Documentação da Organização Pan-Americana da Saúde**. Brasília, 2001.

STORPIRTIS, S.; SANTOS, R. C. J. Cromatografia líquida de alta eficiência aplicada a terapêutica. **Centro Avançado de Estudos em Farmacologia Clínica**. São Paulo, 1990.

TORRES, F. R.; DOMINGOS, C. R. BONINI. Hemoglobinas humanas – hipótese malária ou efeito materno? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. V. 27, p. 53-60, 2005.

TRACY, J.W; WEBSTER, L.T.Jr. Fármacos usados no tratamento das protozooses – Malária In. : Goodman, S.L.; Gilman, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogman, 2002. cap. 40, p. 709-713.

YONEMITSU, K.; KOREEDA A.; KIBAYSHI, K.; NG'WALALI, P.; MBONDE, M.; KITINYA, J.; TSUNENARI, SHIGEYUKI. HPLC analysis of anti-malaria agent, chloroquine in blood and tissue from forensic autopsy cases in Tanzania. **Legal Medicine**. v. 7, p. 113-116, 2005.

WHITTEN, M. M; SHIAO, S. H; LEVASHINA, E. A. Mosquito midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology. **Parasite Immunology**, v. 28, n.4, p.121-130, 2006.

WHORTON, C. M., E. YOUNT, JR., R. JONES, JR., A. S. ALVING, T. N. PULLMAN, B. CRAIGE, JR., AND L. EICHELBERGER. Studies in human malaria. The Chesson strain of *Plasmodium vivax* malaria. III. Clinical aspects. **Journal Infectology Disease**. V. 80, p. 237–249, 1950.

WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; BLUMETTI, R.F.; OTTERBEIN, E. S. Chloroquine. In: **The Merck Index. An Encycloppedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 10 ed., USA, p.304,1983.

WINSTANLEY, P.O. Modern chemotherapeutic options for malaria. **Lancet**, Amsterdam, v.1 p. 242-250, 2001.

WORLD HEALT ORGANIZATION. **Expert Committee on Malaria 20th** Reporter, Geneva, 2000.

WORLD HEALT ORGANIZATION. Division of Control of Tropical Diseases. Severe and complicated malaria. **Transactions of the Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84(2 suppl), p. 1-65, 1990.

WORLD HEALT ORGANIZATION/ROOL BACK MALARIA/UNICEF. World Malaria, 2005.

WORLD HEALT ORGANIZATION. Guidelines for the treatment of Malaria 2006. Disponível em:<<http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>>. Acesso em: 25 de julho de 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Malaria Report. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://rbm.who.int/wmr2005/>
Acesso em: 24 de março de 2008.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Processo N°: 004/2003/CEP/IEC/SVS/MS

Título do Projeto: Rede Amazônica de Vigilância às Drogas Antimaláricas no Brasil
(RAVREDA)

Pesquisador Responsável no Centro: Marinete Marins Póvoa

PARECER

Após exame do Projeto em apreço e atendendo ao dispositivo regimental e a peculiaridade da proposta, a coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa deste Instituto APROVA, *ad referendum*, o projeto “Rede Amazônica de Vigilância às Drogas Antimaláricas no Brasil (RAVREDA)”.

Este CEP assume a responsabilidade em acompanhar o desenvolvimento do projeto, bem como os relatórios do mesmo.

Belém, 24 de julho de 2003.


MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC/SVS

ANEXO**Anexos****MINISTÉRIO DA SAÚDE**

Secretaria de Vigilância em Saúde

Projeto RAVREDA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Efetividade curativa da cloroquina em associação à primaquina no tratamento da Malária causada pelo *P. Vivax* em pacientes da FMTAM

DESCRIÇÃO E OBJETIVO DO ESTUDO

Este estudo está sendo proposto pelo Ministério da Saúde e tem o objetivo de fazer uma avaliação contínua do efeito dos medicamentos que são utilizados para tratar a malária no município que você reside. Queremos saber se esses medicamentos estão sendo capazes de curar completamente a doença ou se o parasito já apresenta resistência aos remédios que estão sendo utilizados. Caso isso esteja ocorrendo com muita frequência neste município, o Ministério da Saúde poderá fornecer novos medicamentos para tratar a malária na região.

Você, ou a pessoa pela qual é responsável, será tratado para malária com o mesmo medicamento que está sendo usado pelo serviço de saúde de seu município para o tratamento dessa doença. Com a sua autorização iniciaremos um acompanhamento do tratamento no 1°, 2°, 3°, 7°, 14°, 21° e 28° dias após o paciente ter recebido a primeira dose do medicamento.

As visitas de acompanhamento serão feitas por um profissional da equipe, o qual irá pedir informações sobre o seu estado de saúde e coletará sangue da ponta do dedo para fazer exames laboratoriais de controle do tratamento.

Serão coletados 10 ml de sangue da veia do braço, antes do tratamento. No 3° dia e 28° dia, serão tomadas amostras de sangue em papel de filtro através da punção do dedo indicador. Eventualmente, caso aconteça falha do tratamento, para outra amostra de sangue será coletada para outros exames de laboratório. No momento da coleta o braço poderá ficar com uma mancha roxa que desaparecerá em um curto espaço de tempo.

Depois que os resultados dos exames estiverem prontos, a pessoa que participar da pesquisa poderá ver estes resultados. Esse sangue também poderá ser usado para outros exames relacionados a malária.

Durante o acompanhamento do tratamento poderão surgir sinais ou sintomas da malária grave, ou de alguma reação ao remédio. Caso isso aconteça, um profissional da equipe na sua cidade irá encaminhar você (ou o paciente) ao serviço médico mais próximo da sua casa.

Participando deste estudo você (ou o paciente) receberá cuidados médicos durante todo o seguimento do seu tratamento, e, em caso de qualquer complicação decorrente da malária e do uso dos medicamentos, estaremos disponíveis para qualquer problema. Também você estará contribuindo com essa pesquisa para o conhecimento científico da malária no nosso estado.

Os nomes e todas as informações obtidas por nós só serão utilizados pelo Ministério da Saúde e serão mantidas em segredo. Nesse município, existe um profissional do Ministério da Saúde, da Secretaria Estadual de Saúde e/ou da Secretaria Municipal de Saúde, que é o responsável por este estudo. Qualquer informação a mais pode ser solicitada a qualquer momento pelo pesquisador responsável pelas informações contidas neste consentimento livre e esclarecido, cujo número de telefone encontra-se junto a sua assinatura.

A PARTICIPAÇÃO É VOLUNTÁRIA. ISTO QUER DIZER QUE O PACIENTE TEM TODO O DIREITO DE NÃO PARTICIPAR OU SE RETIRAR DO ESTUDO, EM QUALQUER FASE DA PESQUISA, e isto não trará nenhum prejuízo, e que terá garantido o seu tratamento, conforme a rotina do serviço local. A reparação de eventuais danos está disponível a você sem quaisquer compensações financeiras decorrentes do dano.

A pessoa que aceitar participar da pesquisa guarda uma cópia deste documento que será assinado duas vezes, uma cópia fica com o pesquisador e a outro com o paciente.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO:

Eu,

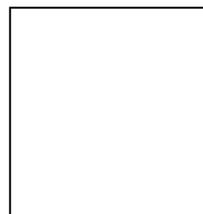
[] participante do estudo, recebi a explicação de que serei um(a) dos(as) participantes dessa pesquisa. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome.

[] responsável pelo participante do estudo, recebi a explicação sobre a metodologia e objetivo do estudo do qual o menor , será participante.

E por estar devidamente informado (a) e esclarecido (a) sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresse meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

.....
..

Assinatura do paciente ou representante legal



Impressão do polegar direito do paciente,
caso este não saiba escrever seu nome.

.....
LOCAL E DATA

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Franklin Simões de Santana Filho

FONE (92) – 32285748 / 99029158

ASSINATURA: (Testemunhas).....