

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PRIMAQUINA E METEMOGLOBINEMIA
EM PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium vivax***

Autora: Michelli Erica Souza Ferreira

Orientador: prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da saúde da Universidade federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

BELÉM-PA

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Michelli Erica Souza Ferreira

Concentrações plasmáticas de primaquina e metemoglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará para a obtenção do título de Mestre
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira

Instituição: UFPA Assinatura _____

Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva

Instituição: UFPA Assinatura _____

Prof. Dr. Sandro Percário

Instituição: UFPA Assinatura _____

Aos meus pais Pedro e Marizete, que com carinho, compreensão, atenção e apoio incondicional se tornaram minha fonte de inspiração em mais uma etapa de minha vida profissional.

Aos meus irmãos Michel e Marcelle, que são amigos e companheiros de uma vida de luta e também de muita felicidade.

A minha sobrinha Milena, que com apenas um simples sorriso consegue iluminar minha vida de alegria.

Ao meu namorado Manoel, que com amor e carinho faz meu mundo ficar mais calmo e bonito, em meio aos estudos, pacientes, leituras no HPLC e diversas análises estatísticas.

AGRADECIMENTO

Á Deus, a quem recorria quando minha força havia fugido de minhas capacidades físicas e psicológicas.

Á Taysa, mais do que uma amiga, quase uma irmã que com suas palavras traz alegria e nos acalenta em momentos difíceis.

Á Priscila, uma amiga muito delicada e compreensiva ao extremo

Á Margarete Gomes, uma profissional cinco estrelas e amiga que me amparou em seu lar e sempre que pode me passa um pouco de sua experiência de vida.

Aos estagiários, João, Rafaela e Breno que com suas mentes “famintas” por conhecimento ajudavam nas tarefas do laboratório.

Ao Laboratório de Toxicologia-UFPA que forneceu a instrumentação necessária para realização da pesquisa.

Á Universidade Federal do Pará que através de sua estrutura e organização me ajudou a ampliar meus conhecimentos.

Ao CNPQ que me forneceu subsídio para que a pesquisa fosse realizada.

RESUMO

A malária vivax é uma doença que a cerca de 40% da população mundial, utiliza-se no tratamento desta, cloroquina (150 mg) e primaquina (15 mg). Esta é uma 8-aminoquinolina com ação esquizotóxica tecidual. Dentre seus efeitos adversos se destaca a capacidade de oxidar a hemoglobina, de maneira dose dependente, que é agravada nos indivíduos com deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase. Ao se considerar a ausência de estudos referentes aos teores de metemoglobina e sua correlação com as concentrações plasmáticas de primaquina nos pacientes com malária vivax, justifica-se a realização deste estudo empregando-se como ferramentas a monitorização das concentrações sanguíneas de primaquina e sua correlação com os teores de metemoglobina. Neste sentido, foi realizado seguimento clínico-laboratorial de 20 pacientes com malária vivax antes (D0) e após três (D3), sete (D7) e quatorze (D14) dias iniciado o tratamento, bem como a validação do método para determinação de primaquina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metemoglobinemia foi avaliada pela técnica de Hegesh et al. (1970) e a glicose-6-fosfato desidrogenase pelo teste colorimétrico de Brewer et al. (1962). A metodologia validada demonstrou parâmetros aplicáveis à determinação de primaquina, cujos teores médios em D3, D7 e D14 foram de 227 ± 106 ng/mL, 191 ± 97 ng/mL e 160 ± 128 ng/mL. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações do fármaco quanto ao sexo dos pacientes participantes e nos diversos dias do estudo. Os teores médios de metemoglobina em D0, D3, D7 e D14 foram de $1,15 \pm 0,9\%$, $4,1 \pm 2\%$, $5,7 \pm 2\%$ e $3 \pm 1,4\%$, respectivamente. Foi observado aumento no teor de metemoglobina após administração do fármaco, sem diferença quanto ao sexo. Não foi observada correlação significativa entre os teores de metemoglobina e as concentrações plasmáticas de primaquina em ambos os sexos. Os coeficientes de correlação de Pearson para os sexos masculino e feminino foram 0.8296 e 0.8137, respectivamente. Foi observada deficiência da expressão da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase em seis pacientes do sexo masculino sem diferenças entre os teores de metemoglobina e das concentrações plasmáticas de Primaquina, quando comparados com pacientes com expressão normal da enzima.

Plavra chave: Antimalárico, primaquina, malária vivax, CLAE, metemoglobina.

ABSTRACT

The vivax malaria is a disease that effects around 40% of the world, to treat it, chloroquine (150 mg) and primaquine (15 mg). This is an 8-aminoquinoline with tissue schizonticide action. Among the adverse effects enhance the capacity to hemoglobin oxidation, dose-dependent, which is exacerbated in individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. When considering the lack of studies concerning the methemoglobin levels and its correlation with primaquine concentrations plasma in patients with vivax malaria, is justified this study using as tools to monitor the plasma primaquine concentrations and its correlation with methemoglobin levels. In this sense, it was followed up clinically and laboratory findings of 20 patients with vivax malaria before (D0) and after three (D3), seven (D7) and fourteen (D14) days starting the treatment, as well as validation of the method for primaquine determination by high performance liquid chromatography (HPLC). Methemoglobinemia was evaluated using the method of Hegesh et al. (1970) and glucose-6-phosphate dehydrogenase by colorimetric method of Brewer et al. (1962). The methodology validated was demonstrated efficient for primaquine determination, whose average levels at D3, D7 and D14 were 227 ± 106 ng / mL, 191 ± 97 ng / mL and 160 ± 128 ng/mL. In the analysis according to gender was not observed differences significant in the drug levels in several days of study. The average methemoglobin levels in D0, D3, D7 and D14 were $1.15 \pm 0.9\%$, $4.1 \pm 2\%$, $5.7 \pm 2\%$ and $3 \pm 1.4\%$, respectively. There was an increase in the methemoglobin level after drug administration, without difference by gender. There was not significant correlation between the methemoglobin levels and primaquine concentrations plasma in both sexes. The coefficients of Pearson correlation for males and females were 0.8296 and 0.8137, respectively. We observed impaired expression of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase in six male patients without differences between the methemoglobin levels and primaquine concentrations plasma, compared with patients with expression normal of the enzyme.

Keywords: Antimalarials, primaquine, vivax malaria, HPLC, methemoglobin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição geográfica da malária.....	21
Figura 2 –	Proporção de casos de malária por espécies registrados.....	22
Figura 3 –	Número de casos de malária por estado (UF) brasileiro.....	23
Figura 4 –	Ciclo de vida do plasmódio no homem.....	25
Figura 5 –	Local de ação dos quimioterápicos utilizados no tratamento da malária.....	28
Figura 6 –	Estrutura química da primaquina.....	28
Figura 7 –	Oxidação e redução do ferro pertencente à hemoglobina.....	30
Figura 8 –	Ação da Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	32
Figura 9 –	Cromatograma contendo os picos de Quinidina (5µg/mL) = 7.058 min e Primaquina (50ng/mL) = 8.778min.....	56
Figura 10 –	Representação gráfica da linearidade da primaquina.....	57
Figura 11 –	Representação gráfica da curva de calibração da primaquina.....	58
Figura 12 –	Significância estatística dos teores de metemoglobina expressos em porcentagem de todos os pacientes do estudo nos dias de análise.....	65
Figura 13 –	Frequência de distribuição de metemoglobina antes (D0) e durante o uso de primaquina (D3, D7 e D14).....	66
Figura 14 –	Significância estatística dos teores de metemoglobina expressos em porcentagem de pacientes do sexo masculino, nos diversos dias de análise.....	67
Figura 15 –	Significância estatística dos teores de metemoglobina expressos em porcentagem dos pacientes do sexo feminino, nos diversos dias de análise.....	68
Figura 16 –	Significância estatística dos teor de metemoglobina expressos em porcentagem, dos pacientes com expressão normal da glicose-6-fosfato desidrogenase nos diversos dias de estudo.....	70
Figura 17 –	Significância estatística dos teor de metemoglobina expressos em porcentagem, dos pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato	

	desidrogenase nos diversos dias de estudo.....	71
Quadro 1 –	Esquema terapêutico para o tratamento da malária causada por <i>P. vivax</i>	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos pacientes participantes do estudo, segundo o sexo.....	53
Tabela 2 – Número de caso por local de infecção dos pacientes participantes do estudo.....	54
Tabela 3 – Condições cromatográficas para determinação de primaquina...	55
Tabela 4 – Tempo de retenção da primaquina e da quinidina.....	55
Tabela 5 – Repetibilidade e precisão intermediária expressos como coeficiente de variação (CV), em porcentagem.....	61
Tabela 6 – Recuperação em porcentagem, obtida a partir das concentrações de 50, 300 e 900ng/mL.....	59
Tabela 7 – Tempo de retenção da quinidina e primaquina de acordo com a variação do pH da fase móvel.....	60
Tabela 8 – Tempo de retenção da quinidina e primaquina de acordo com a variação do fluxo da fase móvel.....	60
Tabela 9 – Concentrações plasmáticas de primaquina, expressas como média e desvio-padrão, juntamente com a amplitude, de todos os pacientes do estudo durante os dias de monitorização.....	61
Tabela 10 – Concentração plasmática de primaquina em ng/mL, expressas como média e desvio padrão, de acordo com o sexo do paciente.....	62
Tabela 11 – Concentrações médias de Primaquina (ng/mL), expressa como média e desvio-padrão, em pacientes do sexo masculino, em função da expressão da glicose-6-fosfato desidrogenase.....	63
Tabela 12 – Índices hematimétricos dos participantes do estudo, segundo o sexo, juntamente com os valores de normalidade.....	64
Tabela 13 – Teores médios de metemoglobina, em porcentagem, de todos os participantes do estudo, expresso como média e desvio-padrão, juntamente com a amplitude nos diversos dias de análise.....	64

Tabela 14 – Porcentagem de metemoglobina, expressos como média e desvio-padrão, nos diferentes dias de estudos conforme o sexo do paciente.....	67
Tabela 15 – Teores médios da porcentagem de metemoglobina, expresso como média e desvio padrão dos pacientes do sexo masculino, considerando a presença ou ausência da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase.....	69

ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HPQ	5-hidroxiprimaquina
6-MAQ	6-metoxi-8-aminoquinolina
A ₁ - A ₃	Porcentagem de metemoglobina na amostra
A ₂ - A ₄	100% de metemoglobina
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
CQ	Cloroquina
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco
DPa	Desvio padrão do interceptor do eixo Y
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
FDA	Food and Drug Administration
G-6-PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPEPS	Gerência do Projeto Ensino e Pesquisa em Saúde
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
IC	Inclinação da curva de calibração
IL-1	Interleucina 1
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
M	Média das recuperações
MAQ-NOH	6-metoxi-8-hidroxiaminoquinolina
MeHb	Metemoglobina
NADP	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Forma reduzida do NADP
NaOH	Hidróxido de Sódio
PQ	Primaquina

r	Coeficiente de Pearson
RNA	Ácido Ribonucleico
S	Desvio-padrão das recuperações
T	Teste
UV	Ultravioleta
VCM	Volume Corpuscular Médio
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1. Malária	21
2.1.1. EPIDEMIOLOGIA	21
2.1.2. BIOLOGIA DO PARASITA	23
2.1.3. PATOGENIA	25
2.1.4. TRATAMENTO DA MALÁRIA	26
2.2. Características químicas e farmacológicas da primaquina	28
2.3. Metemoglobinemia	30
2.4. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase	31
2.5. Primaquina e a metemoglobinemia	33
2.6. Validação de métodos cromatográficos	34
2.6.1. SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE	34
2.6.2. LINEARIDADE E FAIXA DE CONCENTRAÇÃO	35
2.6.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO	35
2.6.4. RECUPERAÇÃO	36
2.6.5. LIMITE DE DETECÇÃO (LD)	36
2.6.6. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO(LQ)	37
2.6.7. PRECISÃO	37
2.6.7.1. Repetibilidade	38
2.6.7.2. Precisão intermediária	38
2.6.7.3. Reprodutibilidade	38
2.6.8. ROBUSTEZ	38
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVO	41
4.1. Geral	42
4.2. Específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1. Casuística	44
5.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	44

5.1.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	44
5.2. Amostras	45
5.3. Esquema terapêutico	45
5.4. Equipamentos e acessórios	46
5.5. Reagentes e solventes	46
5.6. Condições cromatográficas para análise de primaquina	47
5.7. Solução-padrão, controle e calibradores	47
5.7.1. SOLUÇÕES ESTOQUE DE PRIMAQUINA	47
5.7.2. PADRÃO INTERNO	47
5.7.3. CALIBRADORES	47
5.8. Procedimento de extração da primaquina	47
5.9. Validação do método para determinação de primaquina	48
5.10. Determinação do teor de metemoglobina	48
5.10.1. SOLUÇÕES	48
5.10.2. PROCEDIMENTO	49
5.11. Avaliação da redução da metemoglobina	49
5.11.1. SOLUÇÕES	49
5.11.2. PROCEDIMENTO	50
5.12. Índices hematimétricos	50
5.13. Análise estatística	50
5.14. Aspectos éticos	51
6. RESULTADOS	52
6.1. Características gerais dos pacientes	53
6.2. Validação da metodologia para determinação de primaquina	54
6.2.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	54
6.2.2. TEMPO DE RETENÇÃO	55
6.2.3. PARÂMETRO DE VALIDAÇÃO	56
6.2.3.1. Seletividade	56
6.2.3.2. Linearidade	57
6.2.3.3. Limites de Detecção e de Quantificação	57
6.2.3.4. Curva de calibração	58
6.2.3.5. Precisão do método	58
6.2.3.6. Recuperação	59

6.2.3.7. Robustez	60
6.3. Concentrações plasmáticas de primaquina em pacientes com malária vivax	61
6.4. Índices hematimétricos, atividade da G-6-PD e teores de metemoglobina dos participantes do estudo	63
6.5. Correlação entre as concentrações plasmáticas de primaquina com a porcentagem de metemoglobina.	71
7. DISCUSSÃO	73
8. CONCLUSÕES	79
9. REFERÊNCIAS	81
ANEXO A- Autorização da Vigilância em Saúde do Município de Macapá para realização da coleta de sangue dos pacientes atendidos na Unidade Básica de Saúde Brasil Novo	91
ANEXO B – Autorização do Hospital Alberto Lima para realização do Hemograma	92
ANEXO C – Autorização do Laboratório central de Saúde Pública do Amapá para análise de metemoglobina e prova de redução enzimática	93
ANEXO D – Carta de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará	94
ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	95

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença que afeta a humanidade há tempos, e seus elevados índices de morbidade e mortalidade a caracterizam como importante problema de saúde pública, ameaçando cerca de 40% da população mundial, em mais de 100 Países, com 350 a 500 milhões de casos e cerca de 1.1 milhões de óbitos ao ano (CDC, 2007).

Em 2008, foram registrados nas Américas 572.000 casos, sendo o *P. vivax* responsável pela maioria (77%). No Brasil, foram notificados 313.922 casos, dos quais 84% causados pelo *P. vivax*. Destes, 97% concentrados em seis estados da região amazônica, a saber: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima. A incidência parasitária anual média foi de 13 casos por 1.000 habitantes, com letalidade de 1,5 em 10.000 casos. Medidas de controle implantadas no ano de 2006 resultaram na redução de 43% de sua ocorrência até 2008. A doença ocorre nas áreas rurais e nas periferias urbanas, associando-se às deficiências na atenção básica à saúde nas áreas endêmicas (FERREIRA, 2008; MS, 2008; MS, 2009; WHO, 2009b).

O controle da malária envolve as seguintes intervenções: gestão dos pacientes (diagnóstico e tratamento); prevenção da infecção através do controle do vetor (uso de mosquiteiro e inseticidas) e da doença (administração de antimaláricos). As últimas representam os alicerces para o controle e diminuição dos gastos em saúde pública, pois são meios de prevenir casos graves e conseqüente óbito, bem como eliminar as fontes de infecção para os mosquitos, contribuindo assim, para a redução da transmissão (WHO, 2009a).

A quimioterapia desempenha papel fundamental no tratamento dos pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial da malária, pois interrompe o ciclo de vida do parasita, impedindo as manifestações clínicas da infecção (WHO, 2007). Diversos medicamentos são utilizados no tratamento das diferentes formas de malária em humanos, atuando em pelo menos duas etapas do ciclo de vida do plasmódio. São empregados em associações medicamentosas, nas quais um possui ação esquizontocida sanguínea ou/e gametocitocida, e no caso do *P. vivax*, ação hipnozoitocida. No Brasil, são disponibilizados a quinina, doxiciclina, mefloquina,

lumefantrina, cloroquina (CQ), derivados da artemisinina e a primaquina (PQ) (MS, 2001; WHO, 2007).

A PQ é uma 8-aminoquinolina, administrada na forma de comprimido, ativa contra os gametócitos de todas as espécies de plasmódios e hipnozoítos de *P. vivax*. Geralmente é associada à CQ, uma 4-aminoquinolina, com ação esquizotocida para todas as espécies de plasmódios e gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae* (MS, 2001).

O uso das 8-aminoquinolinas vem crescendo atualmente, não apenas pela resistência do plasmódio aos outros antimaláricos, como também, pelo seu potencial uso contra outros microorganismos como *Pneumocystis carinii*, *Leishmania tropica* e *Trypanosoma cruzi* (BOLCHOZ et al., 2001; VALE et al., 2009b).

No tratamento da malária pelo *P. vivax*, são empregados de acordo com o Ministério da Saúde a cloroquina e a primaquina. Apesar da eficácia destes medicamentos, estudos demonstraram o surgimento de cepas de *P. vivax* resistentes a CQ, o que é responsável pela recrudescência, devido à permanência do parasito na circulação em concentrações acima das terapêuticas do fármaco, isto é, 100ng/mL (MS, 2001; AGYEPONG et al., 2002; BAIRD, 2004).

Foi demonstrada diferença na intensidade de ação da PQ em diversos países. Na Tailândia, durante a fase aguda da infecção pelo *P. vivax*, o fármaco foi eficaz quando utilizado em conjunto com a CQ, enquanto que no oeste da Indonésia e em Chesson, Nova Guiné, observou-se tolerância intrínseca dos parasitas a esta 8-aminoquinolina (KRUDSOOD et al., 2008). Estudo realizado por Muñoz et al. (2006) em três pacientes espanhóis, destes, dois com provável contaminação por malária vivax da região indiana e o outro da Colômbia, tratados com PQ sugeriu a presença de cepas resistentes. Tal achado também foi documentado na Somália, África Oriental e Sudeste da Ásia (BAIRD and HOLFFMAN, 2004; COLLINS and JEFFERY, 1996; LOOAREESUWAN et al., 1997; SMOAK et al., 1997; WILAIRATANA et al., 1999; apud Yeshiwondim, 2009, p. 9).

A PQ pode oxidar a hemoglobina à metemoglobina (MeHb), nas doses terapêuticas comumente utilizadas, não ocorrendo o transporte de oxigênio aos tecidos. Ressalta-se que a administração de agentes metemoglobinizantes, como alguns medicamentos, à pacientes com deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD), deve ser realizada com cautela, pois leva ao agravamento dos sinais e sintomas característicos desta condição, aumentando a taxa de MeHb,

com consequente cianose e hemólise, que pode evoluir, inclusive, para óbito (SILVA et al., 2004; HILL et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007). De acordo com Brossi et al. (1987) a atividade antiparasitária e a hemolítica desse fármaco estão relacionadas à formação de produtos de biotransformação ativos.

Greaves et al. (1980) sugeriram que o emprego da associação CQ e PQ pode aumentar a formação de metemoglobina, o que pode se relacionar tanto ao fato da 4-aminoquinolina interferir no metabolismo da 8-aminoquinolina, modificando o tipo ou a quantidade de metabólito formado, influenciando no efeito da metemoglobina redutase, enzima capaz de reduzir a hemoglobina oxidada.

Para que estes medicamentos apresentem eficácia sem causar danos ao organismo humano, pois a maioria das reações adversas é dose dependente, é importante a monitorização das suas concentrações plasmáticas e o acompanhamento dos efeitos adversos (OGA, 1996; HILL et al., 2006; SANTANA et al., 2007).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Malária

2.1.1. EPIDEMIOLOGIA

É uma doença endêmica, característica das áreas tropicais e subtropicais do mundo, que apresenta como fatores determinantes para ocorrência: a presença do mosquito, vetor do parasita e do homem. Soma-se a isto, as condições climáticas regionais, principalmente as chuvas e a temperatura, cujos valores entre 20-30°C, favorece o crescimento do vetor, exercendo assim, importante influência na sua distribuição geográfica (NEVES et al., 2007).

Em 2008 foram registrados 243 milhões de casos de malária em todo mundo, a maioria destes no Continente Africano (85%), em seguida no Sudeste Asiático (10%), região oriental do Mediterrâneo (4%) e Continente Americano (WHO, 2009b).

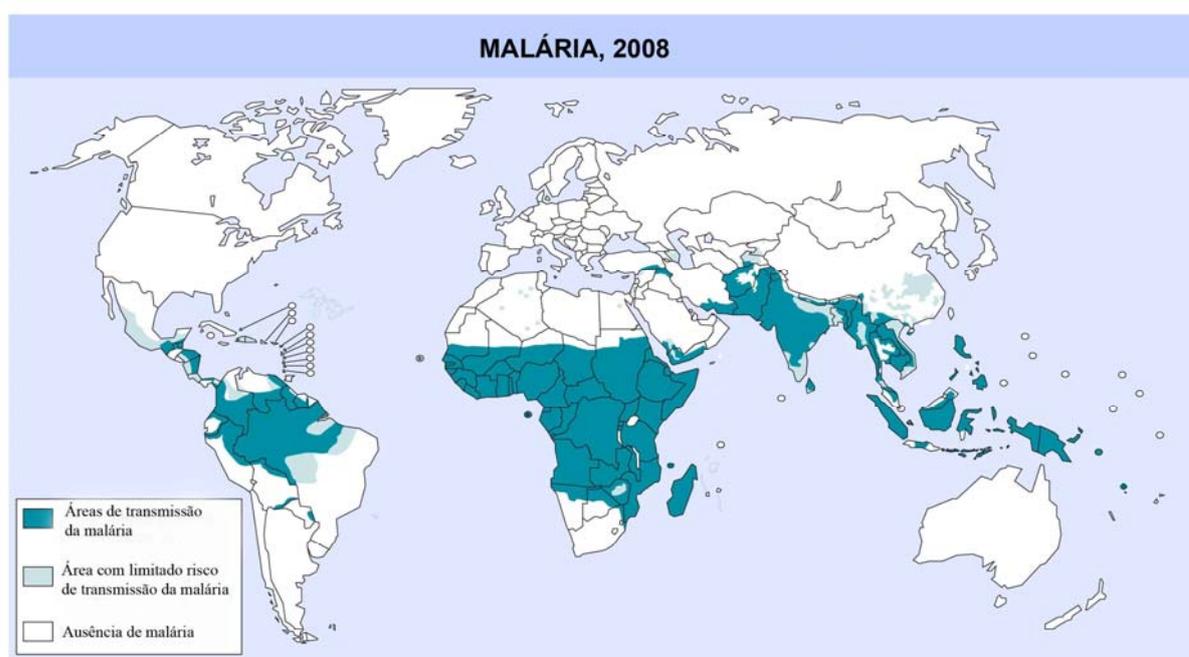


Figura 1 – Distribuição Geográfica da Malária

Fonte: WHO, 2008

Dentre as quatro espécies que podem infectar o homem, se destaca o *P. vivax* (Figura 2), responsável por 85% dos casos registrados no Brasil (MS, 2008).

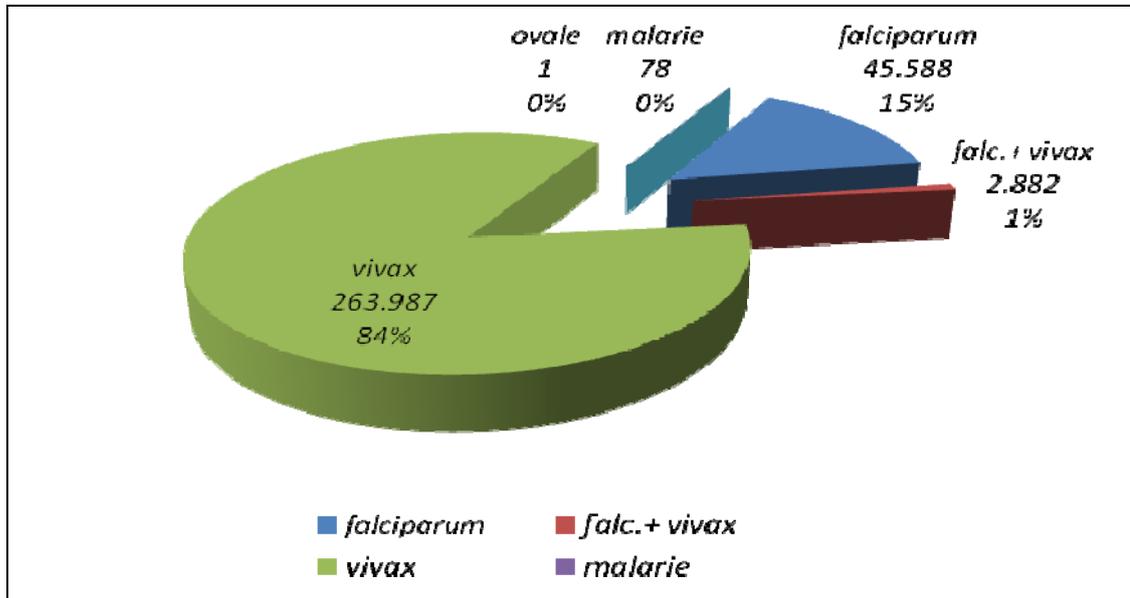


Figura 2 – Proporção de casos de malária por espécie registrados no Brasil em 2008.

Fonte: DATASUS, 2008.

No Brasil, a distribuição da doença está associada à atividade exercida pela população exposta, sendo frequente nos garimpeiros e trabalhadores envolvidos nos projetos agropecuários e de colonização. Nas periferias das grandes cidades como Belém e Manaus, as más condições de habitação e a proximidade desta aos criadouros do mosquito vetor, propiciam a ocorrência dos focos epidêmicos. De acordo com dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica da Amazônia (SIVEP) foram notificados em 2008 na Amazônia Legal 263.987 casos de malária vivax com maior prevalência nos Estados (Figura 3) do Amazonas, Pará, Rondônia, Acre e Amapá (DATASUS, 2008).

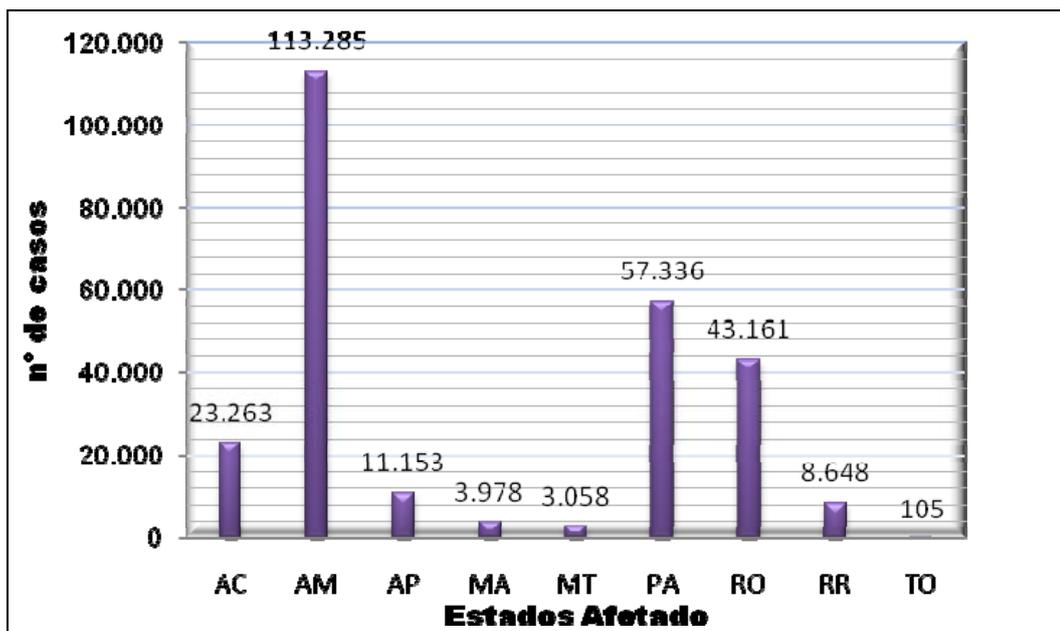


Figura 3 – Número de casos de malária vivax por estado (UF) brasileiro.

Fonte: DATASUS, 2008.

2.1.2. BIOLOGIA DO PARASITA

Causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, um organismo unicelular que apresenta como hospedeiro intermediário o homem e definitivo o mosquito, pertencente à ordem dos dípteros, família Culicidae, gênero Anopheles, sendo a espécie *Anopheles darlingi* a que se destaca na transmissão (VALE et al., 2005; MS, 2005).

Quatro espécies de plasmódios podem infectar o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e o *Plasmodium malarie*. O primeiro é responsável pela febre terçã maligna, o segundo e o terceiro pela terçã benigna e o último pela quartã cosmopolita (CDC, 2008). Destas, somente *P. vivax* e *P. ovale* são capazes de causar múltiplas recaídas da malária após semanas ou meses da primeira infecção, o que se associa a presença da forma latente do protozoário no fígado (DEEN et al., 2008).

O *P. vivax* é a espécie mais freqüente no Brasil, tolera ambiente com baixa temperatura, entretanto abaixo de 15°C, seu ciclo de vida fica comprometido. Por outro lado, locais quentes favorecem seu crescimento, encurtando o ciclo,

aumentando assim a possibilidade de transmissão. O período de incubação desta espécie varia de 12 a 17 dias, entretanto, climas temperados e subtropicais provocam o prolongamento deste período em algumas cepas (ANDRADE, 2005; CDC, 2008).

O ciclo assexuado ocorre no homem (Figura 4), e se inicia durante o repasto sanguíneo, quando o mosquito infectado inocula os esporozoítos no organismo humano, os quais migram para o fígado onde realizam o ciclo exo-eritrocítico em cerca de oito dias. Nas células hepáticas, os protozoários sofrem diferenciação e passam para a forma arredondada de criptozoítos, em seguida se multiplicam e se diferenciam em cerca de 10.000 merozoítos ou hipnozoítos, forma latente do *P. vivax* responsável pela recaída da malária, as quais podem permanecer por longo período no organismo humano (BERNAN, 2004; VALE et al., 2005).

Com a ruptura dos esquizontes hepáticos, os merozoítos migram para a corrente sanguínea, onde iniciam ciclo eritrocitário, degradam a hemoglobina para a obtenção de aminoácido e síntese proteica, através das enzimas produzidas no vacúolo digestivo. A seguir, passam à forma amebóide intracelular de trofozoítos, os quais evoluem até merozoítos, que irão infectar novos eritrócitos. Neste momento, ocorre a diferenciação dos gametócitos que migram para a periferia do organismo humano (SHARMA et al., 2005; VALE et al., 2005).

Ao realizar a picada, o mosquito fêmea, ingere os gametócitos juntamente com o sangue humano, que ao alcançarem o estômago, realizam o ciclo sexuado (esporogônia), no qual o microgameta se une ao macrogameta formando o zigoto, que se torna móvel e alongado (ocineto) e invade o epitélio gástrico, originando o oocisto, que sofre ruptura e libera numerosos esporozoítos, os quais migram para as glândulas salivares do inseto, que durante o repasto serão inoculados no ser humano, dando início a um novo ciclo do plasmódio (BERNAN, 2004; VALE et al., 2005).

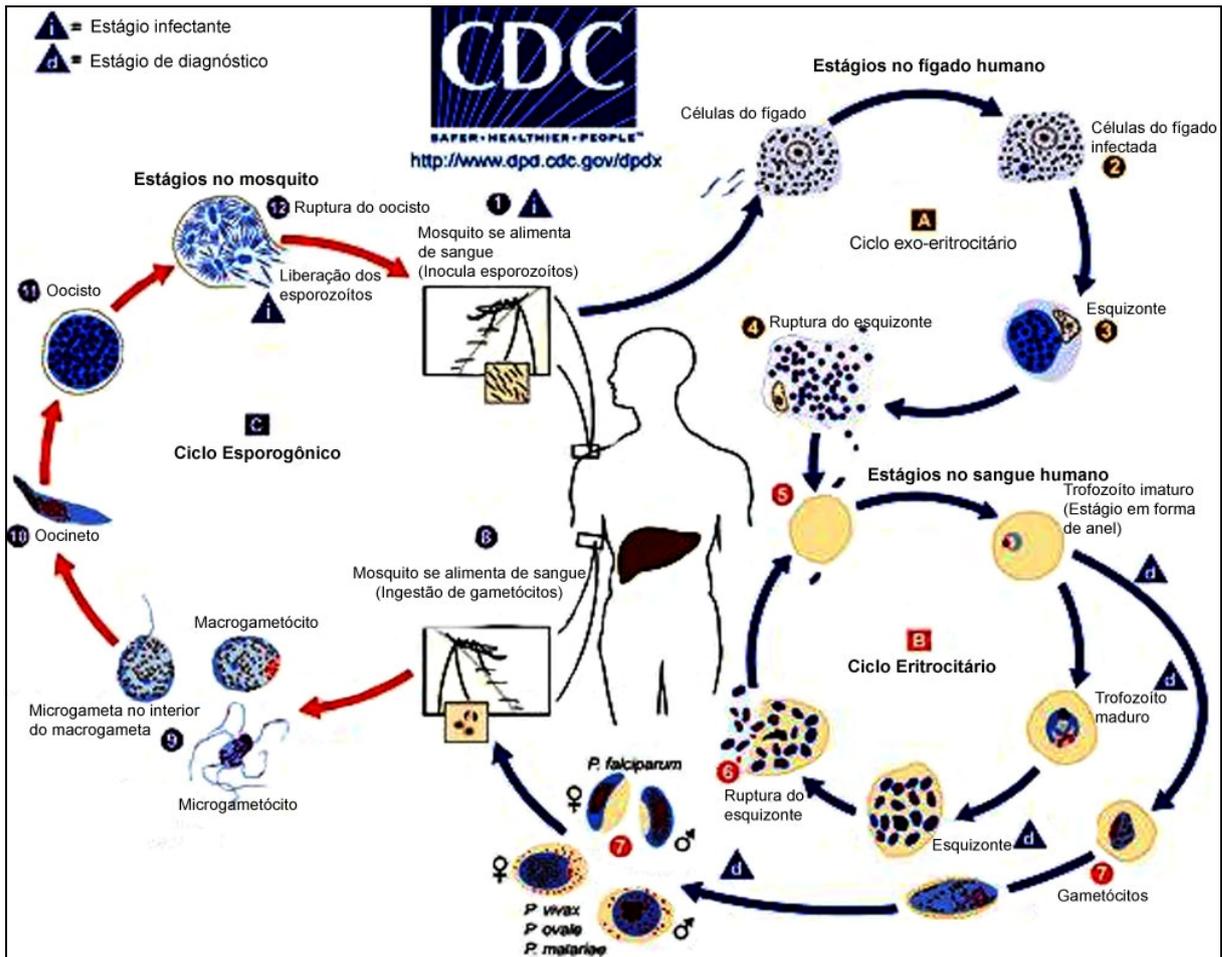


Figura 4 – Ciclo de vida do plasmódio no homem no mosquito.

Fonte: CDC, 2006.

2.1.3. PATOGENIA

A malária pode ocorrer de forma assintomática ou com os sinais e sintomas clássicos, como febre, sudorese, cefaléia e dores musculares. A gravidade depende da espécie de plasmódio presente e do estado imunológico do hospedeiro. Outros sinais e sintomas podem preceder como, mal estar geral, fadiga, mialgia, artralgia, dor abdominal, náuseas, vômito e diarreia. Também podem ocorrer hepatoesplenomegalia, hipoglicemia e anemia (BERNAN, 2004; CDC, 2006).

A fisiopatologia está relacionada ao ciclo do parasito no organismo, precisamente a ruptura dos eritrócitos ao final da esquizogonia, quando ocorre a liberação dos pirógenos na corrente sanguínea, como o pigmento hemozoína que

estimula macrófagos e citocinas, como a interleucina 1 (IL-1), capaz de alterar o equilíbrio do hipotálamo, provocando elevação da temperatura, além de impedir a ação inibitória de certos neurônios do hipotálamo anterior, com conseqüente vasoconstrição periférica, originando a sensação de frio (ANDRADE, 2005). Outra característica da doença é a anemia, devida à hemólise a cada esquizogonia eritrocitária (ANDRADE, 2005; CDC, 2006).

2.1.4. TRATAMENTO DA MALÁRIA

A Organização Mundial da Saúde recomenda iniciar o tratamento tão logo os sinais e sintomas da doença se manifestem. Para que seja realizado de forma adequada são necessárias as seguintes informações: gravidade da doença; espécie do plasmódio; idade do paciente; histórico de infecção malárica anterior e a susceptibilidade do parasito aos antimaláricos convencionais (MS, 2001).

Os quimioterápicos atuam em diferentes estágios do desenvolvimento do plasmódio (Figura 5). CQ, quinina, amodiaquina, mefloquina, halofantrina, artemisinina e derivados, tetraciclina, proguanil, pirimetamina, sulfas e sulfonas são esquizonticidas sanguíneos; enquanto que a PQ e pirimetamina possuem ação esquizonticida tecidual. PQ, cloroquina e quinina também apresentam ação gametocitocida. Alguns fármacos possuem ação esporonticida, como proguanil, PQ e pirimetamina, exercendo ação nos gametócitos bloqueando a esporogônia no vetor (NEVES et al., 2007; MS, 2008).

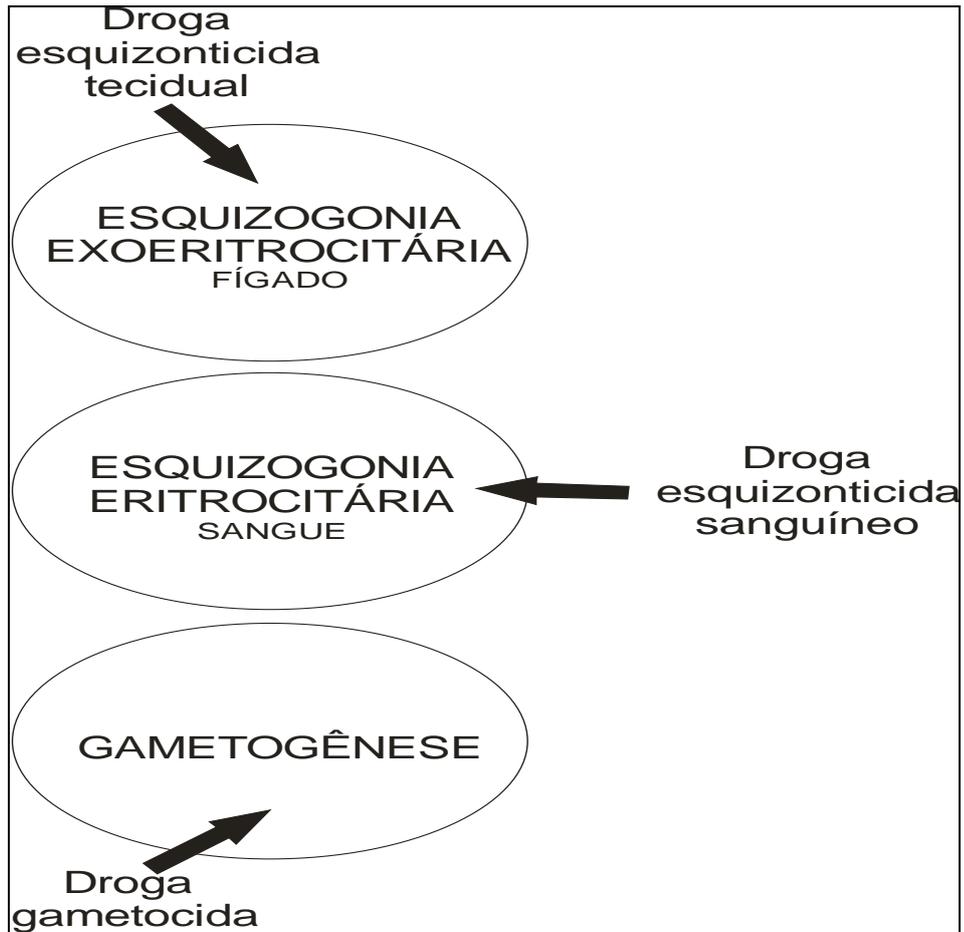


Figura 5 – Local de ação dos quimioterápicos utilizados no tratamento da malária.

Fonte: Adaptado do Ministério da Saúde, 2008.

Para o tratamento da malária por *P. vivax* o Ministério da Saúde recomenda o seguinte esquema terapêutico (Quadro1) (MS, 2001).

Grupos Etários	Drogas e Doses							
	1º dia			2º e 3º dias			4º ao 7º dias	
	Cloroquina comprimido	Primaquina comprimido		Cloroquina comprimido	Primaquina comprimido		Primaquina comprimido	
		Adulto	Infantil		Adulto	Infantil	Adulto	Infantil
Menor de 6 meses	1/4	-	-	1/4	-	-	-	-
6 a 11 meses	1/2	-	1	1/2	-	1	-	1
1 a 2 anos	1	-	1	1/2	-	1	-	1
3 a 6 anos	1	-	2	1	-	2	-	2
7 a 11 anos	2	1	1	1 e 1/2	1	1	1	1
12 a 14 anos	3	1 e 1/2	-	2	1 e 1/2	-	1 e 1/2	-
15 ou mais	4	2	-	3	2	-	2	-

Quadro 1 – Esquema terapêutico para o tratamento da malária causada por *P. vivax*.

Fonte: MS, 2001.

2.2. Características químicas e farmacológicas da primaquina

A PQ (Figura 6) é uma 8-aminoquinolina, denominada 8-(3-amino-1-metilpropilamino)-6-metoxiquinolina, desenvolvida em 1946 a partir da pamaquina. Foi aprovada pelo FDA em 1952, para a cura radical da malária causada pelo *P. vivax* e *P. ovale*, devido a sua ação hipnozoitocida, associada a um fármaco esquizontocida. Apresenta também ação gametocitocida contra o *P. falciparum* (MS, 2001; VALE et al., 2005; DEEN et al., 2008; VALE, 2009b).

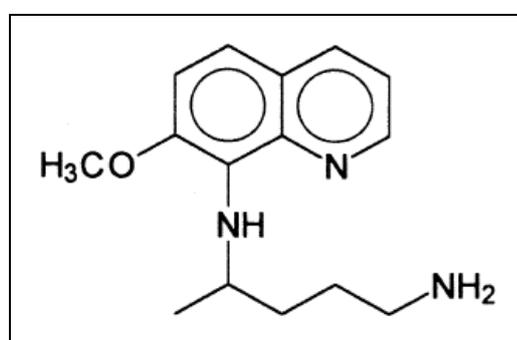


Figura 6 – Estrutura química da primaquina.

Fonte: PALIWAL & GUPTA (1998).

O mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido, mas acredita-se que atue intercalando-se entre os pares de bases do DNA (ácido desoxirribonucleico) do parasita, impedindo que as enzimas DNA e RNA (ácido ribonucleico) polimerase repliquem o material genético. Alguns autores sugeriram que a ação ocorra através dos mecanismos de oxi-redução no parasita, tanto através da produção de espécies reativas de oxigênio, quanto pela interferência no transporte de elétrons da cadeia respiratória, comprometendo as funções da mitocôndria (ANTUÑANO, 1999; MS, 2001; VALE et al., 2009a).

Os comprimidos apresentam 5,0 mg ou 15 mg de base difosfato, correspondendo a 8,8 mg e 26,4 mg do sal de fosfato, respectivamente. É rapidamente absorvida após administração via oral, alcançando níveis plasmáticos máximos após uma a três horas, com concentração média de pico de 153 ± 25 ng/mL (131-180 ng/mL). Distribui-se rapidamente pelos tecidos, e pequena quantidade se liga a alfa-1-glicoproteína. O volume de distribuição varia de 200 a 300 L e a meia vida biológica em torno de cinco horas nas pessoas saudáveis. A biotransformação é rápida e realizada principalmente pelas oxidases de função mista hepáticas, sendo que os principais produtos gerados são: 8-(3-carboxil-1-metilpropilamino), 5-hidroxiprimaquina, 5-hidroxi-6-desmetilprimaquina e a carboxiprimaquina. Ressalta-se que os três apresentam menor atividade antimalárica quando comparados ao composto original (MS, 2001; HILL et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007).

Em outra via ocorre a formação de n-acetilprimaquina, considerada o principal metabólito presente no plasma, e que parece não ter ação contra o plasmódio. A excreção da PQ é renal, com mais de 75% da dose ingerida em 24hs (MS, 2001; HILL et al., 2006).

Quando utilizado para eliminar os hipnozoítos, é administrada pelo período de sete dias em dose de 0,5 mg de base/kg de peso, em conjunto com um esquizotocida sanguíneo ativo como a cloroquina; enquanto que seu uso como gametocitocida, a dose varia de 0,50 a 0,75 mg base/Kg, administrada em dose única (MS, 2001; RODRIGUES et al., 2007; MS, 2008).

Os efeitos adversos nas doses terapêuticas empregadas são náuseas, vômito, dor epigástrica, cólicas abdominais e alteração da acomodação visual, no entanto podem ocorrer reações graves nos indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) ou

metemoglobina redutase, com conseqüente desenvolvimento de metemoglobinemia. Raramente pode ocasionar leucopenia, agranulocitose, leucocitose e arritmia cardíaca (MS, 2001; HILL et al., 2006).

A PQ não deve ser associada à mepacrina, mielossuppressores e agentes hemolíticos, os quais podem potencializar as reações adversas. É contra-indicada nas grávidas, pelo risco de hemólise nos fetos com deficiência de G-6-PD, nos menores de seis anos, pois pode causar hipoplasia e aplasia medular e nos pacientes com granulocitopenia, artrite reumatóide e lúpus eritematoso (MS, 2001; HILL et al., 2006).

2.3. Metemoglobinemia

A hemoglobina é uma metaloproteína presente no eritrócito, constituída por duas cadeias betas e duas alfa, com o grupo heme contendo um íon Fe^{2+} (ferro no estado ferroso) disposto de forma central entre as cadeias. É responsável pelo transporte de oxigênio do pulmão para os tecidos, e do dióxido de carbono dos tecidos periféricos para o pulmão. A oxidação do ferro da hemoglobina (Figura 7) a Fe^{3+} (Férrico), origina a MeHb, que não transporta oxigênio aos tecidos (OGA; 1997; NAOUM et al., 2004; CAMARGO et al., 2007).

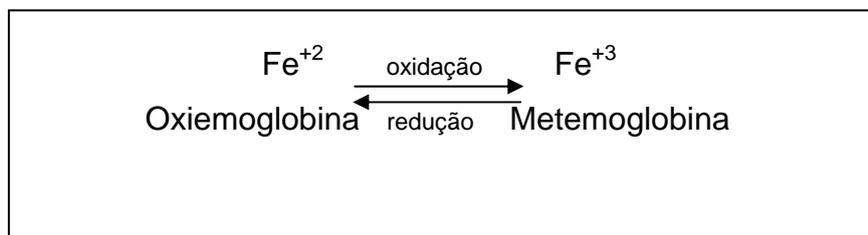


Figura 7 – Oxidação e redução do ferro pertencente à Hemoglobina.

Fonte: SRIVASTAVA et al, 2000

O organismo normalmente apresenta agentes oxidantes que promovem a oxidação da hemoglobina, em média de 2% ao dia. A redução é realizada através de

enzimas como NADH-diaforase, glicose-6-fosfato desidrogenase e metemoglobina redutase, que mantêm a relação entre a oxihemoglobina e a MeHb no sangue (OGA, 1997; NAOUM et al., 2004; CAMARGO et al., 2007).

Quando os níveis de hemoglobina oxidada aumentam além do tolerado (>5%), observa-se a sintomatologia da metemoglobinemia, que pode ser de origem congênita, por deficiência enzimática, ou adquirida através da exposição aos agentes metemoglobinizantes, tais como: PQ, tintas contendo nitrobenzeno, anilina, água e alimentos in natura contendo nitritos, gases de escapamento de veículos, dentre outros. Independente da etiologia, a severidade dos sintomas depende dos níveis de MeHb produzidos (OGA, 1997; WRITGHT et al., 1999; GUALANDRO, 2000; NAOUM et al., 2004).

Os sintomas característicos são cianose, ansiedade, cefaléia, taquicardia, fadiga, tontura, taquipnéia, coma, convulsão, arritmia e óbito, quando em altas concentrações, geralmente superiores a 60% de oxidação da hemoglobina (WRITGHT et al., 1999; NAOUM et al., 2004).

2.4. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase

A deficiência de G-6-PD é uma das enzimopatias mais freqüentes no mundo, afetando cerca de quatrocentos milhões de pessoas, com maior prevalência na África Tropical, Oriente Médio, China, Índia, em algumas áreas do Mediterrâneo e Papua Nova Guiné. A migração e conseqüente miscigenação dos povos têm contribuído para a incidência universal da deficiência desta enzima (COMPRI et al., 2000; TSENG et al., 2005).

É uma enzima citoplasmática codificada pelo gene do cromossomo X. Distribui-se amplamente pelo organismo humano. Nas hemácias é utilizada para obtenção de energia através da via das hexoses, onde em sua ação catalítica provoca a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogluconato (Figura 8), com a redução concomitante do NADP, fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo, produzindo sua forma reduzida (NADPH), cofator das defesas anti-oxidantes do organismo (GUMUSLU et al., 2005; MAURÍCIO et al., 2006; BEUTLER et al., 2007).

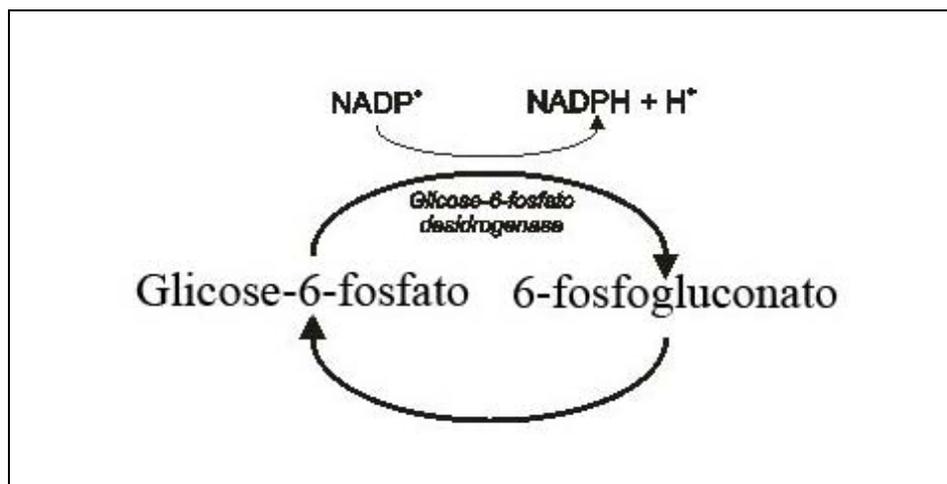


Figura 8 – Ação da glicose-6-fosfato desidrogenase.

Fonte: Adaptado de Beutler et al, 2007

Já foram descritas mais de 400 variantes do polimorfismo no gene da G-6-PD com caráter recessivo do cromossomo X (região Xq28). As mais comumente encontradas são a variante africana (G-6-PD A⁻) nos africanos e afro-descendentes, e a mediterrânea (G-6-PD Mediterrânea) com maior frequência nos italianos, gregos, judeus orientais, árabes e persas. Estas variantes são as mais frequentes no Brasil (COMPRI et al., 2000; MAURÍCIO et al., 2006).

A expressão fenotípica desta enzima é importante na exposição humana aos agentes oxidantes como medicamentos (antimaláricos, antibióticos etc), alimentos conservados com nitrito de sódio e *in natura* contendo nitrato, gases de escapamento de veículos, tintas e corantes (anilinas e nitrobenzenos), os quais podem ser responsabilizados por episódios de hemólise aguda naqueles com a variante mediterrânea, resultante dos danos morfológicos na membrana eritrocitária, com aumento na taxa de metemoglobina e hemólise com formação dos corpúsculos de Heinz (KUS, 1989; COMPRI et al., 2000; MAURÍCIO et al., 2006).

Alguns fatores como a cinética do fármaco original ou de seus metabólitos e do tipo de variante enzimática influenciam na susceptibilidade à hemólise oxidativa, que ocorre, geralmente, dois a três dias após a exposição ao fármaco (MAURÍCIO et al., 2006; SILVIA et al., 2006).

Bangchang et al. (1994), ao avaliarem dois grupos de indivíduos com malária por *P. vivax*, em função da expressão da G-6-PD, fazendo uso de 150 mg de CQ durante 3 dias e 15mg de PQ por 14 dias, não observaram diferença estatística

significativa na concentração plasmática média de primaquina nos grupos analisados, bem como não foi observada correlação entre o grau de hemólise e a cinética da primaquina naqueles com deficiência enzimática

2.5. Primaquina e a metemoglobinemia

Os primeiros relatos da toxicidade da primaquina ao sistema hematopoiético datam de 1952, através de estudo realizado em voluntários caucasianos e negróides (CLAYMAN et al., 1952; HOCKWALD et al., 1952 apud Santana, 2007, p. 534). Corroborando tal achado, diversos autores relataram oxidação da hemoglobina após uso terapêutico de primaquina e cloroquina, que é agravado naqueles com deficiência de G-6-PD (BANGCHANG et al., 1994; BEUTLER & DUPARC, 2007).

A formação de metemoglobina é reduzida e auto-limitada quando estes fármacos são utilizados na dose terapêutica recomendada nos indivíduos com expressão genética normal das enzimas redutoras, nos quais são relatados aumento médio de 5%, entretanto pode alcançar até 15%, naqueles com deficiência em algumas das enzimas envolvidas na redução da hemoglobina oxidada (BAIRD & RIECKMANN, 2003).

Em 1981, Fletcher et al. (1981) determinaram este fármaco em amostras de plasma e urina de caucasianos e tailandeses, fazendo uso diário de 450 mg de cloroquina e 15 mg de primaquina, por três e quatorze dias respectivamente, correlacionando com os níveis de MeHb. O resultado do estudo indicou que os caucasianos desenvolveram significativa metemoglobinemia, sem correlação com as concentrações de primaquina excretadas, além de significativa variação no teor de MeHb, durante os quatorze dias de uso do fármaco, sugerindo que a oxidação seja provocada pela primaquina ou seus metabólitos.

Neste sentido, Bolchoz et al. (2001) utilizando ratos e microssomas de fígado humano, demonstraram que ambos formam 6-metoxi-8-aminoquinolina (6-MAQ), como metabólito da primaquina, o qual através de *N*-hidroxilação origina 6-metoxi-8-hidroxi-aminoquinolina (MAQ-NOH), que apresenta atividade tóxica nos meios biológicos estudados. Bowman et al. (2005) demonstraram que o metabólito 5-hidroxi-primaquina (5-HPQ) apresenta atividade hemolítica em eritrócitos de ratos.

Outro estudo demonstrou que os teores de MeHb variaram de 6 a 9% nos indivíduos que receberam 15 mg/dia de PQ, de 10 a 18% e 11 a 18% naqueles que receberam 22,5 e 30 mg/dia do fármaco, respectivamente (HILL et al., 2006).

Pesquisa conduzida por Santana et al. (2007) em indivíduos com malária *vivax* ou mista (*vivax* + *falciparum*), divididos em dois grupos; com e sem diagnóstico de metemoglobinemia, relataram que o primeiro grupo alcançou média de 11,1% de MeHb, sendo que a cianose estava presente em todos. Os autores identificaram correlação significativa entre o aumento da MeHb e a presença da deficiência de G-6-PD.

2.6. Validação de métodos cromatográficos

Para assegurar a confiabilidade dos resultados analíticos gerados é realizada a validação do procedimento, requisito essencial na utilização e adaptação da metodologia, desenvolvimento de novas técnicas e utilização de diferentes equipamentos. Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, curva de calibração, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e robustez (BRASIL, 2003; BRITO et al, 2003; RIBANI et al 2004;).

2.6.1. SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE

A seletividade é um parâmetro utilizado para verificar se o método aplicado para a determinação de primaquina é capaz de identificá-la dentre outros componentes da matriz, ou seja, é seletivo para a análise da substância em questão. Pode ser avaliada de duas formas: comparando a matriz isenta da substância de interesse com aquela contendo a substância padrão, ou através de detectores de arranjo de diodo ou espectrômetro de massa, onde se compara o espectro do pico obtido na separação com o do padrão (RIBANI et al., 2004; BRITO et al., 2003; BRASIL, 2003).

2.6.2. LINEARIDADE E FAIXA DE CONCENTRAÇÃO

Através deste parâmetro pode ser verificado se as concentrações do fármaco são diretamente proporcionais ao sinal (área ou altura do pico) gerado. A relação é obtida através da curva de calibração, construída a partir de uma reta com no mínimo cinco pontos, sendo excluído o ponto zero, utilizando-se soluções padrões nas concentrações dispostas em um intervalo estabelecido em função da faixa de trabalho, as quais são analisadas em triplicata. A partir das respostas analíticas obtidas nas soluções de concentrações conhecidas realiza-se o cálculo para obtenção dos coeficientes “a e b” através da regressão linear, que fornece a equação $y = ax + b$. Calcula-se também o coeficiente de Pearson (r), para avaliar a dispersão dos pontos na reta e a incerteza dos coeficientes lineares. A ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) recomenda o $r = 0,99$ (BRASIL, 2003; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

2.6.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO

Representa a relação entre a resposta obtida do instrumento e a concentração conhecida do fármaco presente na amostra, após processamento. A curva deve conter amostra branco (matriz biológica isenta do analito e do padrão interno), amostra zero (matriz biológica contendo padrão interno) e no mínimo seis amostras contendo o analito e padrão interno, incluído o limite de quantificação (menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser quantificada com exatidão e precisão). A seguir, realiza-se o cálculo para obtenção dos coeficientes “a e b” através da regressão linear, que fornece a equação $y = ax + b$. Calcula-se também o coeficiente de Pearson (r), para avaliar a dispersão dos pontos na reta e a incerteza dos coeficientes lineares (BRASIL, 2003).

2.6.4. RECUPERAÇÃO

Avalia a eficiência do procedimento de extração do fármaco da matriz. É obtida empregando-se três amostras contendo concentrações baixa, média e alta, em função da linearidade do método. As relações das áreas do analito de interesse e do padrão internos após extração é comparada com as relações de áreas das soluções padrão e do padrão preparada em solventes, que representa 100% de recuperação (BRASIL, 2003).

2.6.5. LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

É a menor concentração detectada da substância em questão, mas não necessariamente quantificada. De acordo com Resolução nº 899 da ANVISA sua determinação deve ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, de 3 curvas de calibração contendo a suposta concentração pertencente ao LD. O valor deste pode ser obtido através da seguinte equação:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (1)$$

Onde: DPa = Desvio padrão do intercepto do eixo Y

IC = inclinação da curva de calibração

2.6.6. Limite de Quantificação (LQ)

É a menor concentração do analito que pode ser quantificada, com exatidão e precisão aceitável, obtida através de, no mínimo, 3 curvas de calibração contendo soluções com concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível detectável. O LQ pode ser obtido pela equação abaixo (BRASIL, 2003):

$$\text{LQ} = \frac{\text{DPa} \times 10}{\text{IC}} \quad (2)$$

2.6.7. PRECISÃO

Parâmetro através do qual se avalia a proximidade dos resultados obtidos de várias medidas da mesma amostra, expressa geralmente através do desvio padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas, onde:

$$\text{CV\%} = \frac{\text{S}}{\text{M}} \times 100 \quad (3)$$

S = desvio-padrão

M = média aritmética

Esta avaliação pode ser apresentada em três níveis: repetitividade ou precisão intra-ensaio, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

2.6.7.1. Repetibilidade

Parâmetro através do qual se verifica a concordância entre as análises sucessivas realizadas na mesma condição de operação (equipamentos, analista, reagente, dia e condição ambiental). De acordo com a ANVISA devem ser realizadas no mínimo nove determinações, das concentrações alta, média e baixa no mesmo dia (BRASIL, 2003; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

2.6.7.2. Precisão intermediária

Indica a dispersão ocorrida no laboratório, como aquela provocada por diferentes analistas e equipamentos em dias alternados, deve ser realizada em no mínimo dois dias (BRITO et al., 2003).

2.6.7.3. Reprodutibilidade

Expressa a dispersão da análise em laboratórios diferentes que utilizam estudos colaborativos para a padronização de métodos. De acordo com a IUPAC, deve ser realizada no mínimo em cinco laboratórios (BRASIL, 2003).

2.6.8. ROBUSTEZ

É a medida da capacidade de um método permanecer inalterado sob pequenas variações dos parâmetros analíticos, como: pH, temperatura, fluxo e composição da fase móvel, diferentes lotes ou procedências de colunas ou da fase móvel (BRASIL, 2003).

JUSTIFICATIVA



3. JUSTIFICATIVA

Considerando-se a elevada incidência de malária vivax na região amazônica, aliado a capacidade da primaquina em oxidar a hemoglobina, principalmente nos indivíduos com deficiência de G-6-PD e a ausência de estudos referentes aos teores de metemoglobina, e sua correlação com as concentrações plasmáticas de primaquina nos pacientes com malária vivax, justifica-se a realização deste estudo empregando-se como ferramentas a monitorização das concentrações sanguíneas de primaquina e sua correlação com os teores de metemoglobina.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Determinar as concentrações plasmáticas de primaquina em pacientes com malária causada por *P. vivax*, correlacionando-as com as taxas de metemoglobina.

4.2. Específicos

- Validar metodologia analítica para a determinação de primaquina por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta;
- Determinar as concentrações plasmáticas de primaquina nos pacientes com malária vivax;
- Avaliar a atividade qualitativa da glicose-6-fosfato desidrogenase e os índices hematimétricos;
- Determinar os teores de metemoglobina do pacientes;
- Comparar os teores de metemoglobina quanto ao sexo e de acordo a expressão qualitativa da glicose-6-fosfato desidrogense dos pacientes;
- Comparar as concentrações plasmáticas de primaquina quanto ao sexo e de acordo a expressão qualitativa da glicose-6-fosfato desidrogense dos pacientes;
- Correlacionar os teores de metemoglobina com as concentrações plasmáticas de primaquina.

MATERIAL E MÉTODO

The section header is centered and surrounded by a decorative graphic consisting of three sets of horizontal lines. The top set is the widest, the middle set is narrower, and the bottom set is the narrowest, creating a stepped effect.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Casuística

Foram coletadas por demanda espontânea, amostras de sangue de 20 pacientes, dentre aqueles atendidos na Unidade Básica de Saúde Brasil-Novo (Anexo A) pertencente ao estado de Macapá-AP. Selecionados pacientes de ambos os sexos, com idade entre 15 a 60 anos, exame de gota espessa positivo para malária por *Plasmodium vivax* e que não realizaram profilaxia ou tratamento com antimaláricos nos últimos dois meses, obedecendo os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

5.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Diagnóstico hemoparasitológico de malária por *P. vivax* ;
- Não ter iniciado tratamento para malária por *P. vivax*: CQ (150 mg, por 3 dias) e PQ (15 mg, por 14 dias);
- Idade igual superior a 15 anos de ambos os sexos.

5.1.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes com malária mista (aqueles com *P. vivax* e outra espécie de malária);
- Aqueles que apresentaram quadro severo de malária;
- Pacientes com doenças associadas;
- Aqueles que recusaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.2. Amostras

Foram coletados de cada paciente cerca de 10 mL de sangue, por punção venosa periférica, empregando-se tubos á vácuo contendo EDTA como anticoagulante, devidamente identificados, antes do início do tratamento (D0), e após três (D3), sete (D7) e 14 (D14) dias de quimioterapia. Ressalta-se que foram coletadas amostras de vale, isto é, antes da administração da próxima dose. A seguir, cerca de 7,5 mL, foram separados por centrifugação para obtenção do plasma, e imediatamente submetidos a refrigeração a - 4^oC. O tempo decorrido entre a coleta das amostras e a determinação de primaquina foi inferior a 60 dias.

Do restante do sangue total 1 mL foi encaminhado ao Laboratório do Hospital Alberto Lima (Anexo B) para determinação dos índices hematimétricos e 1,5 mL utilizado para a determinação do teor de metemoglobina no Laboratório Central do Amapá LACEN-AP (Anexo 3). O tempo decorrido entre a coleta das amostras e o hemograma foi inferior a 24 horas enquanto que para a análise de MeHb foi inferior a 48horas.

Na validação da metodologia analítica para determinação de PQ nas amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência, foi utilizado pool de plasma de voluntários sadios procedentes do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFPA, que nunca tiveram malária ou usaram os fármacos em estudo e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.3. Esquema terapêutico

Os pacientes com malária vivax foram tratados da seguinte forma: 150 mg de cloroquina base via oral, dividido em três dias, no primeiro 10mg/Kg de peso no segundo e terceiro dias 7,5 mg/Kg, obtendo-se uma dose total de 25 mg/Kg, associado ao fosfato de primaquina via oral, contendo 15mg de substância base, na dose de 0,5 mg/kg/dia durante 14 dias.

5.4. Equipamentos e acessórios

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (VARIAN), composto por uma bomba isocrática (PROSTART 300), injetor manual reodyne (Modelo 772i), com loop de 20 μ L, coluna de fase reversa (X-Terra): RP- 8, 15cm, 5 μ m e 4.6 mm de diâmetro interno (Waters, Saint Quentin-en-Yvelines, France).; pré-coluna: 2.1x 10mm; detector duplo canal ultravioleta (Modelo 320) e visível (PROSTAR 220).
- Espectrofotômetro UV-visível, DR5000-HACH, *HEXIS*[®];
- Contador Automático de Células KX-21, *Systemex*[®];
- Agitador de tubos vortex, Q-22ob1, *Quimis*[®];
- Ultra-som, Q-335D, *Quimis*[®];
- Centrífuga, 2K15, *Sigma Laborzentrifugen*[®];
- pHmetro digital, PHS-3B, *Phtek*[®];
- Balança, VL-1mg, *Acculab*[®];
- Homogeneizador, BHS-300, *Benfer*[®];
- Bomba de vácuo, *Fabbe*[®];
- Deionizador de água *Aquapur AQ 0010*[®];
- Microseringa de 50 μ L, *Hamilton*[®];
- Micropipetas automáticas com volume regulável Finnpiquette (10 μ L a 100 μ L, 20 μ L a 200 μ L e 200 μ L a 1000 μ L), *Labsystems*[®].

5.5. Reagentes e solventes

Acetonitrila (J.K. Baker) grau HPLC; Metanol (Vetec); Trietilamina (Merck); Hidróxido de sódio (Merck); Ácido clorídrico (Labsynth); Ferricianeto de Potássio (Vetec); Cianeto de Sódio (Vetec); Ácido acético (Merck); Diclorometano (Merck), Éter metil terc butílico (Vetec); Triton-100 (Sigma); Primaquina (Sigma[®]); Quinidina (Sigma[®]); A água foi purificada com o sistema *Aquapur AQ 0010*[®] para a preparação dos diversos reagentes para o estudo.

5.6. Condições cromatográficas para análise de primaquina

Foram seguidas as condições propostas por Dua et. al (1996) com modificações. A fase móvel composta de acetonitrila, metanol e água (30:26:95, v/v), submetida à filtração e degaseificação no ultra-som por quinze minutos antes do uso. O fluxo foi de 1 mL/min e o comprimento de onda de 254 nm.

5.7. Soluções-padrão, controle e calibradores

5.7.1. SOLUÇÕES ESTOQUE DE PRIMAQUINA

A solução estoque de PQ (100 µg/mL) foi preparada em metanol e armazenada a -20°C.

5.7.2. PADRÃO INTERNO

O padrão interno utilizado foi a quinidina (QND) na concentração de 10,5 µg/mL, preparado em metanol e armazenado a -20°C.

5.7.3. CALIBRADORES

Foram preparados a partir de *pool* de plasma oriundo de pessoas que nunca fizeram uso de CQ e PQ, bem como não relataram episódios de malária. Foram preparados nas concentrações de 50 ng/mL a 900ng/mL.

5.8. Procedimento de extração da primaquina

Foi seguido o procedimento proposto por Dua et al. (1996) com modificações na quantidade de plasma, composição do líquido extrator, padrão interno e na solução basificante. Adicionou-se em um microtubo alíquota de 100 µL da amostra

de plasma, 100 µL de QND, na concentração de 10,5 µg/mL, e 100 µL de NaOH 2M. Agitou-se em vortex por 30 segundos. A seguir, foi adicionado 1mL de Diclorometano:Éter-metil-terc-butílico (3,5:1,v/v), como extratores. Homogenizou-se em agitador mecânico por 20 min e centrifugação a 2000 rpm por 10 min. A fase orgânica foi separada e transferida para outro microtubo de polietileno, e posteriormente evaporada à temperatura de 62°C por 20 min. O resíduo foi recomposto com 100 µL da fase móvel, agitado por 30 segundos no vórtex e aplicado, em volume de 50 µL, no cromatógrafo líquido.

5.9. Validação do método para determinação de primaquina

Realizada seguindo os procedimentos propostos na RE nº 899 da ANVISA de 29/5/2003 e pelo FDA (2007) anteriormente descritos. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, seletividade, precisão intra e inter ensaio, recuperação, limites de detecção e quantificação e robustez.

5.10. Determinação do teor de metemoglobina

5.10.1. SOLUÇÕES

Solução tampão fosfato pH = 7,2 (7 mL de fosfato de potássio 0,5 M e 10 mL de hidróxido de sódio 0,5 M); solução de ferrocianeto de potássio 5% (0,2 mL de ferricianeto de potássio 5% adicionado de 2,5 mL de solução tampão fosfato, completar o volume para 10 mL com água destilada), solução de cianeto neutralizado (1 mL de cianeto de sódio 10%, adicionado de 0,9 mL de ácido acético 12%).

5.10.2. PROCEDIMENTO

A MeHb foi determinada de acordo com o método de Hegesh (1970 apud CAMARGO, 2007, p.96) que consiste em: Transferir para um tubo de ensaio de 15 mL, 0,5 mL de sangue e 2,5 mL de água destilada, agitando-se por inversão três vezes, em seguida deixar em repouso por três minutos. Acrescentar 1 mL de tampão fosfato pH=7,2, 100 µL de Triton X 100, misturar em homogeneizador por 30 segundos e centrifugar por 15min a 1000rpm. Recolher o sobrenadante, com auxílio de pipeta Pasteur, para um tubo pequeno de ensaio, de volume de 3mL. Transferir 2,4mL para a cubeta 1 e 0,2 mL da amostra para cubeta 2, adicionando a última, 2,2 mL de ferricianeto de potássio. Efetuar a leitura das absorvâncias (A_1 e A_2) em 632 nm. Adicionar 100 µL de solução de cianeto neutralizante as duas cubetas, agitar por inversão, e após 1minuto efetuar a leitura das absorvâncias (A_3 e A_4). Calcular a metemoglobina, em porcentagem, através da seguinte equação (4):

$$\% \text{ MeHb} = \frac{A_1 - A_3}{12 (A_2 - A_4)} \times 100 \quad (4)$$

Onde: 12 = Fator de Diluição;

$A_1 - A_3$ = Porcentagem de metemoglobina na amostra;

$A_2 - A_4$ = 100% de metemoglobina.

5.11. Avaliação da redução da metemoglobina

5.11.1. SOLUÇÕES

Solução de nitrato de sódio (Glicose 5g adicionado a nitrato de sódio 1,25g e 100mL de água destilada) e azul de metileno (0,16g adicionado a 1000mL de água destilada)

5.11.2. PROCEDIMENTO

Realizada de acordo com o método proposto por Brewer et al (1962), que consiste em: identificar três tubos de ensaio, onde T é o tubo teste, CN é o controle negativo, que terá a coloração vermelho “vivo” e CP, controle positivo, em castanho escuro, a seguir adicionar 200 μL de sangue total em cada um, 20 μL de nitrito de sódio nos tubos T e CP, 20 μL de azul de metileno nos tubos T e CN. Homogeneizar e incubar os tubos no banho de água a 37°C por três horas. Após o período de incubação transferir 100 μL de cada amostra para tubos contendo 10 mL de água, devidamente identificados. Observar a coloração final dos tubos controle e comparar com tubo teste. O resultado será positivo se a coloração do tubo T for semelhante à do tubo CP.

5.12. Índices hematimétricos

Os índices hematimétricos dos pacientes foram determinados empregando-se contador automático de células, devidamente calibrado e de acordo com as boas práticas de laboratório clínico de Hematologia do Hospital Alberto Lima. Os valores de referência do eritrograma foram aqueles adotados pela Instituição na qual as análises foram realizadas.

5.13. Análise estatística

Os resultados obtidos foram tabulados em planilhas elaboradas para este estudo no programa Microsoft Office Excel 2007. Para comparação das médias e medianas foram utilizados os testes ANOVA (análise de variância), Mann-Whitney (*Teste U*) e *t* de Student. Já o coeficiente de “Pearson” (*r*) e a regressão linear foram empregados na estimativa das correlações entre os diversos resultados obtidos no estudo. Os testes estatísticos foram realizados com auxílio dos programas BioEstat

(Graphpad Software versão 5.0), *EXCEL® E INSTAT®* (Graphpad Software versão 3.05). O nível de significância aceito foi de 5%.

5.14. Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas de Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal obtendo-se a partir deste o seguinte número de protocolo 093/09 (Anexo D). Os pacientes participantes do estudo foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo E).

RESULTADOS



6. RESULTADOS

6.1. Características gerais dos pacientes

Participaram do estudo 15 pacientes do sexo masculino e 5 feminino com malária vivax, diagnosticados através do exame da gota espessa. A amplitude de idade foi de 15 a 59 anos (Tabela 1), residentes nas localidades situadas às margens da BR-156, Km-9 e Km-11, Curralinho, e nos Bairros Brasil Novo, Loteamento Açai, Ilha do Canaã e Parque do Burití (Tabela 2), todos atendidos na Unidade Básica de Saúde Brasil-Novo.

Tabela 1 – Características dos pacientes participantes do estudo, segundo o sexo.

SEXO	n	IDADE MÉDIA (Anos) ($x \pm d.p.$)	AMPLITUDE DA IDADE (Anos)	PARESITEMIA INICIAL Parasitas/mm ³ de sangue ($Xg \pm d.p.g$)
Masculino	15	34,6 \pm 15,26	15 – 59	1501,05 \pm 2,9173
Feminino	5	35,3 \pm 6,1	34 – 42	1782,60 \pm 9,1517

n = número de indivíduos; x = média; Xg = média geométrica; d.p. = desvio padrão; d.p.g = desvio padrão geométrico

O emprego de teste estatístico paramétrico para comparar as parasitemias médias dos pacientes em função do sexo, não demonstrou diferença significativa (P=0.6203).

Tabela 2 – Número de casos de malária vivax por local de infecção dos pacientes participantes do estudo.

NÚMERO DE CASOS	LOCAL DE INFECÇÃO
5	BR-156 Km-9
7	BR-156 Km-11
2	Curralinho
3	Brasil Novo
1	Loteamento Açaí
1	Ilha do Canaã
1	Parque do Burití

6.2. Validação da metodologia analítica para determinação de primaquina por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta

6.2.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas utilizadas para determinação de PQ estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 – Condições cromatográficas para determinação de primaquina.

Detector	UV(254nm)
Fluxo	1mL/min
Coluna	RP-8,15cm, 5 μ m e 4,6 mm de diâmetro interno (Waters, Saint Quentin-en-Yvelines, France)
Fase Móvel	Acetonitrila:Metanol:Água(30:26:95, v/v), pH=5
Volume de Injeção	50 μ L

6.2.2. TEMPOS DE RETENÇÃO

Os tempos de retenção da PQ e da QND (padrão interno), nas condições cromatográficas descritas no item 6.3.1, estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Tempo de retenção da primaquina e da quinidina.

ANALITOS	N	TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)
Quinidina	5	7,0
Primaquina	5	8.8

n= número de determinações

6.2.3. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

6.2.3.1. Seletividade

O método mostrou-se seletivo, conforme demonstrado no cromatograma da figura 9, obtido a partir da aplicação no cromatógrafo de amostra de plasma contendo PQ, de acordo com as condições descritas em 2.6.1 e extração apresentada em 5.8.

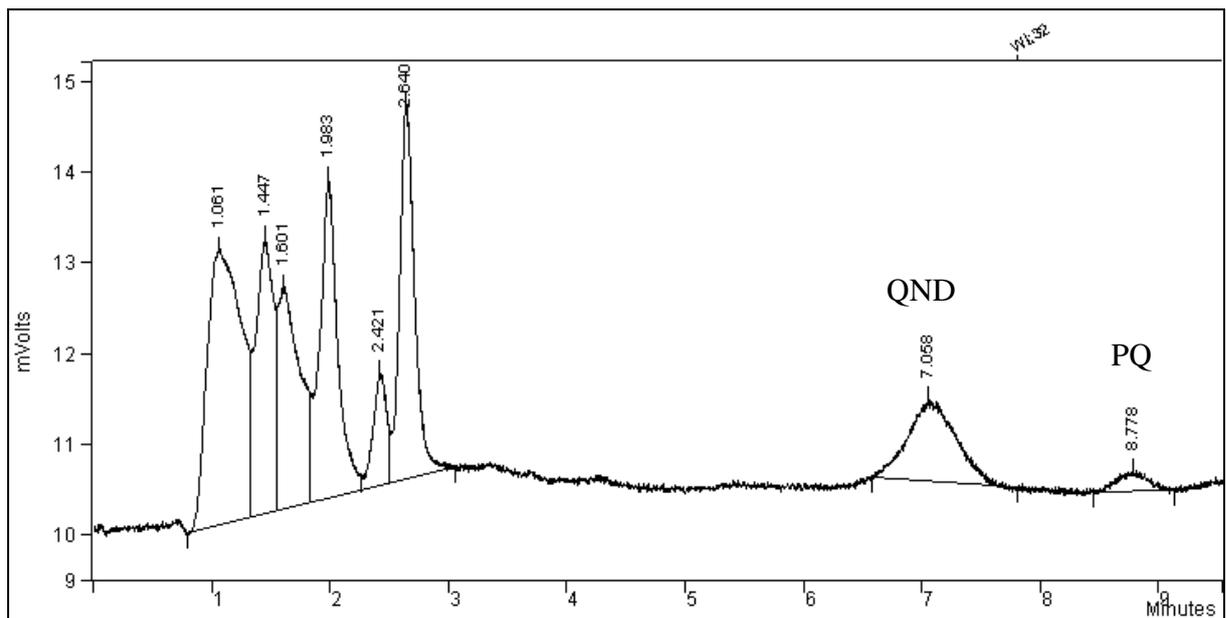


Figura 9 – Cromatograma contendo os picos de Quinidina ($5\mu\text{g/mL}$)= 7.058min e Primaquina (50ng/mL)= 8.778min .

6.2.3.2. Linearidade

Os dados que representam a capacidade do método em gerar resultados proporcionais à concentração do analito em questão estão demonstrados graficamente na figura 10, juntamente com o coeficiente de Pearson e a equação da reta.

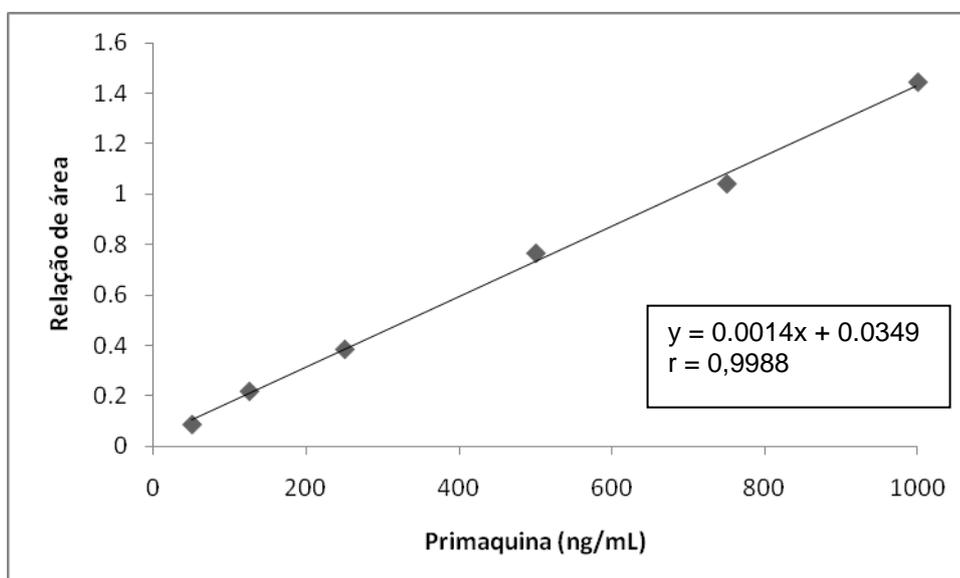


Figura 10 – Representação gráfica da linearidade da primaquina

6.2.3.3. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção foi de 35ng/mL, e o de quantificação de 50ng/mL.

6.2.3.4. Curva de Calibração

A curva de calibração obtida a partir da extração dos calibradores contendo diversas concentrações de PQ, juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação de Pearson, estão apresentados na Figura 11.

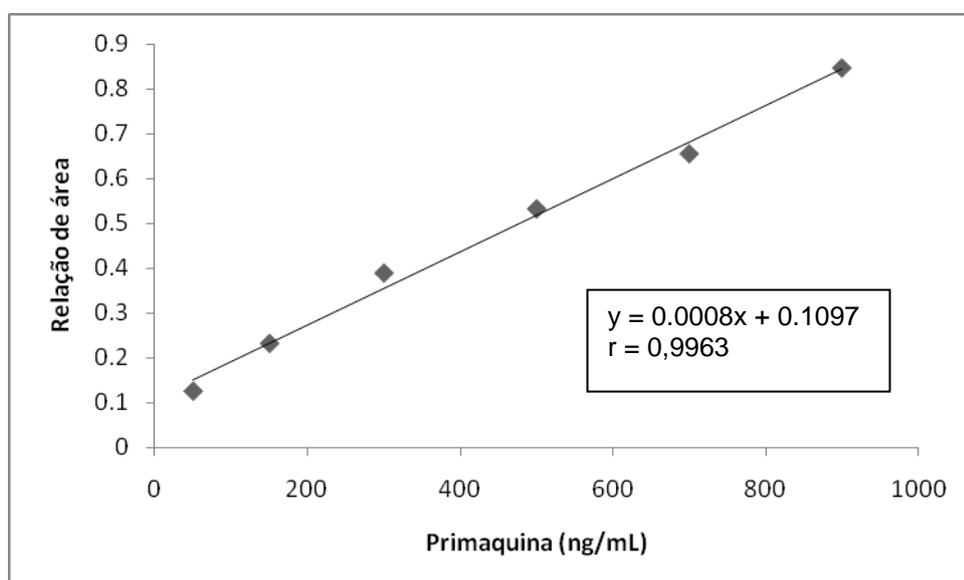


Figura 11 – Representação gráfica da curva de calibração da primaquina

6.2.3.5. Precisão do método

A precisão do método realizada através de nove determinações (repetibilidade) e 5 determinações por três dias consecutivos (precisão intermediária), em diversas concentrações de PQ, expressas como coeficiente de variação estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 – Repetibilidade e precisão intermediária expressas como coeficiente de variação (CV), em porcentagem.

PRIMAQUINA (ng/mL)	n	REPETIBILIDADE CV (%)	N	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA CV(%)
50	9	10,96	15	4,58
300	9	11	15	11
900	9	5,49	15	9,31

n = número de determinações

6.2.3.6. Recuperação

A recuperação dos calibradores, expressa em porcentagem, contendo PQ em concentrações de 50, 300 e 900ng/mL está apresentada na tabela 6.

Tabela 6 – Recuperação, expressa em porcentagem, obtida a partir das concentrações de 50, 300 e 900ng/mL.

PRIMAQUINA (ng/mL)	N	RECUPERAÇÃO (%)
50	15	109,75
300	15	89,59
900	15	86,65

n= número de determinações

6.2.3.7. Robustez

As mudanças nos tempos de retenção da PQ e do padrão interno, resultantes das modificações deliberadas do pH e do fluxo da fase móvel estão apresentadas nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 – Tempos de retenção (TR) da quinidina e primaquina de acordo com a variação do pH.

VARIAÇÃO DE Ph	n	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	
		QUINIDINA	PRIMAQUINA
5	5	7,1	8,9
4	5	4,6	7,9
3,5	5	4,4	7,6

n = número de determinações.

Tabela 8 – Tempos de retenção da quinidina e primaquina de acordo com o fluxo da fase móvel.

VARIAÇÃO DO FLUXO (mL/min)	n	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	
		QUINIDINA	PRIMAQUINA
1,5	5	3,8	5,4
1,0	5	7,5	8,7
0,5	5	10,3	15

n = número de determinações.

6.3. Concentrações plasmáticas de primaquina em pacientes com malária vivax

As concentrações de PQ, expressas como média e desvio-padrão, determinadas no plasma dos pacientes com malária vivax nos diversos dias de estudo, juntamente com a amplitude, estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9 – Concentrações plasmáticas de primaquina, expressas como média e desvio-padrão, juntamente com a amplitude, de todos os pacientes do estudo durante os dias de monitorização.

DIAS	n	AMPLITUDE (ng/mL)	PRIMAQUINA (ng/mL)
D0	20	Nd	Nd
D3	20	24,87 - 365,90	227,47 ±106,88
D7	20	24,86 - 367,01	191,51 ±97,96
D14	20	11,20 - 467,88	160,04 ±128,29

n = número de determinações; Nd = não detectado; $x \pm d.p.$ = média e desvio padrão.

A análise de variância (ANOVA) dos teores plasmáticos de PQ de todos os pacientes, a partir do terceiro dia da administração, não demonstrou diferença significativa ($P=0.2422$).

A seguir, os teores plasmáticos de PQ foram alocados segundo o sexo dos participantes do estudo. O emprego do teste estatístico paramétrico (t de student) não demonstrou diferença significativa nas concentrações plasmáticas de PQ entre os sexos, no período avaliado. Resultados semelhantes foram obtidos na análise de variância (ANOVA) em cada sexo nos diversos dias de estudo. As concentrações plasmáticas de PQ, expressa como média e desvio-padrões, juntamente com os valores de significância estatística, segundo o sexo, estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Concentração plasmática de primquina em ng/mL, expressa como média e desvio-padrão, de acordo com o sexo do paciente.

SEXO	PRIMAQUINA (ng/mL)					P valor**
	N	D0	D3	D7	D14	
Masculino	15	Nd	235,41 ± 100,73	209,10 ± 103,53	180,47 ± 130,39	0.3346
Feminino	5	Nd	199,67 ± 139,44	147,80 ± 76,87	72,10 ± 78,89	0.5270
p valor*		Nd	0.2856	0.1545	0.0992	p valor*

Nd = não determinada; *teste t de student; **análise de variância; $x \pm d.p.$ = média e desvio padrão.

Na avaliação qualitativa da atividade da enzima G-6-PD dos 20 pacientes com malária vivax participantes do estudo, seis apresentaram redução da atividade desta enzima, todos do sexo masculino. As concentrações plasmáticas de PQ, expressa como média e desvio-padrão, juntamente com os valores de significância estatística, segundo a expressão quantitativa da G-6-PD, estão apresentadas na tabela 11. O emprego de teste estatístico paramétrico (t de student) não demonstrou diferença significativa nas concentrações plasmáticas de PQ entre os grupos, no período avaliado, resultados semelhantes foram obtidos na análise de variância (ANOVA) realizada em cada grupo nos diversos dias de estudo, como podemos observar através dos P valores demonstrados na tabela da página seguinte.

Tabela 11 – Concentrações médias de Primaquina (ng/mL), expressa como média e desvio-padrão, em pacientes do sexo masculino, em função da expressão da glicose-6-fosfato desidrogenase.

Expressão da G-6-PD	N	PRIMAQUINA (ng/mL)				P valor**
		D0	D3	D7	D14	
Normal	9	Nd	210,83 ± 111,44	218,97 ± 118,92	198,54 ± 153,88	0.9566
Enzimopênico	6	nd	279,65 ± 65,80	194,29 ± 90,01	144,34 ± 66,88	0.0566
P valor*		n.d.	0.1173	0.3674	0.2617	

nd=não determinado; *teste T de student; **análise de variância, $x \pm d.p.$ = média e desvio padrão.

6.4. Índices hematimétricos, atividade da G-6-PD e teores de metemoglobina dos participantes do estudo

Os índices hematimétricos dos participantes do estudo se encontram descritos na tabela 12, juntamente com os valores de referência para homens e mulheres.

Tabela 12 – Índices hematimétricos dos participantes do estudo, segundo o sexo, juntamente com os valores de normalidade.

ERITROGRAMA	n = 5	Mulher	VR	n=15	Homem	VR
		X			X	
Eritrócito(milhões/mm ³)		4,85	4,0 a 5,6		4,46	4,5 a 6,5
Hemoglobina(g/%)		12,68	12 a 16,5		13,49	13,18 a 18
Hematócrito(%)		39,16	35 a 47		39,84	40 a 54
VCM(fl)		84,5	81 a 101		89,2	82 a 101
HCM(pg)		26,94	27 a 34		30,24	27 a 34
CHCM(%)		32,54	31,5 a 36		34	31,5 a 36

n = Número de indivíduos; VR = valor de referência; X= média aritmética.

Os teores médios de MeHb de todos os pacientes, nos diferentes dias de análise, expressos em média e desvio-padrão e a amplitude estão dispostos na tabela 13.

Tabela 13 – Teores médios de metemoglobina, em porcentagem, de todos os participantes do estudo, expresso como média e desvio-padrão, juntamente com a amplitude nos diversos dias de análise.

DIAS	N	AMPLITUDE	METEMOGLOBINA
		(%)	(%)
D0	20	0,02-3,90	1,154±0,904
D3	20	1,80-8,63	4,168±2,010
D7	20	2,80-12,44	5,791±2,848
D14	20	1,30- 7,60	3,086±1,495

n = número de indivíduos; $x \pm d.p.$ = média e desvio padrão; $x \pm d.p.$ = média e desvio padrão.

Após o uso de PQ ocorreu elevação nos teores de metemoglobina acima daqueles considerados normais para população não exposta aos agentes metemoglobinizantes, com valor máximo alcançado em D7, com posterior decaimento.

Durante a monitorização os pacientes relataram apresentar após a administração do medicamento (D3), tontura (40%), cefaléia (90%) e alteração na coloração da urina (60%), dentre esses dois apresentavam histórico de problemas renais, no D7 apenas 2 relataram dor de cabeça e no D14 não houve relatos. Dos 20 pacientes, 6 apresentam positividade para a prova de redução enzimática.

A análise de variância dos teores em relação aos valores prévios ao uso de PQ apresentou diferença estatística significativa (Figura 12). Por outro lado, após o início da administração do fármaco não foi observada diferença significativa entre D3 e D14 (0.0579)

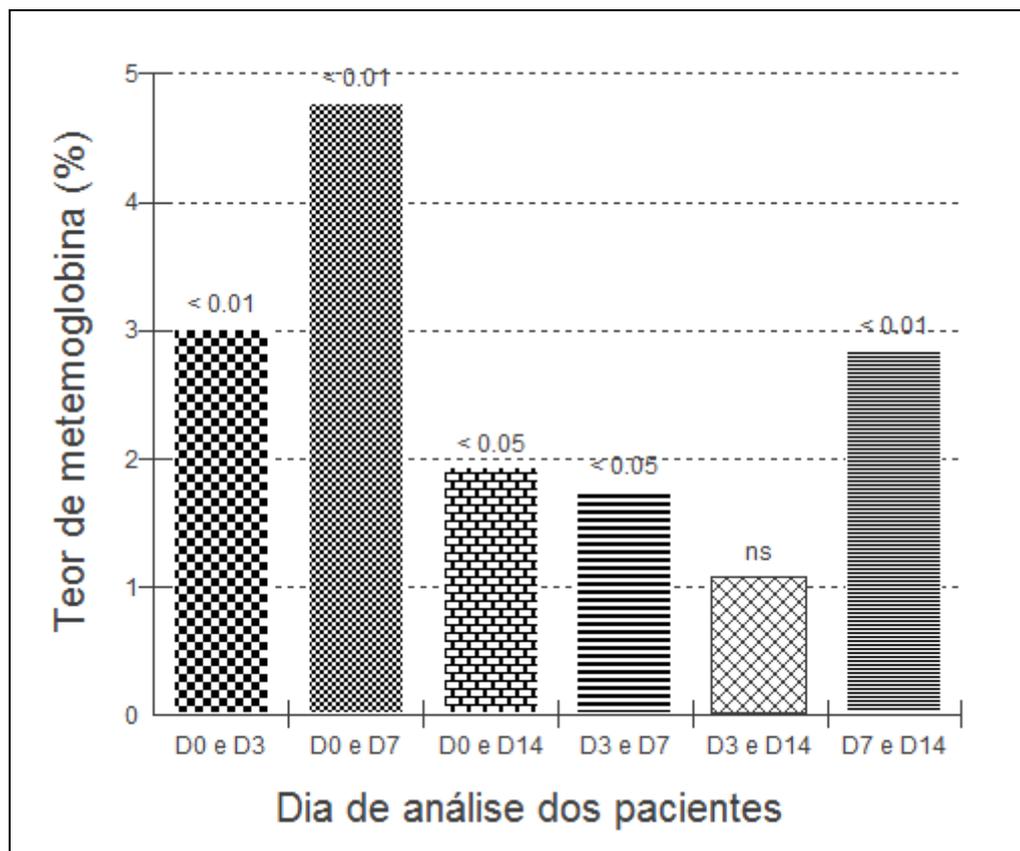


Figura 12 – Significância estatística dos teores de metemoglobina, expressos em porcentagem, de todos os pacientes do estudo, nos diversos dias de análise. ns = não significante.

A frequência da distribuição dos teores de MeHb dos vinte pacientes nos diversos dias do estudo está apresentada na figura 13.

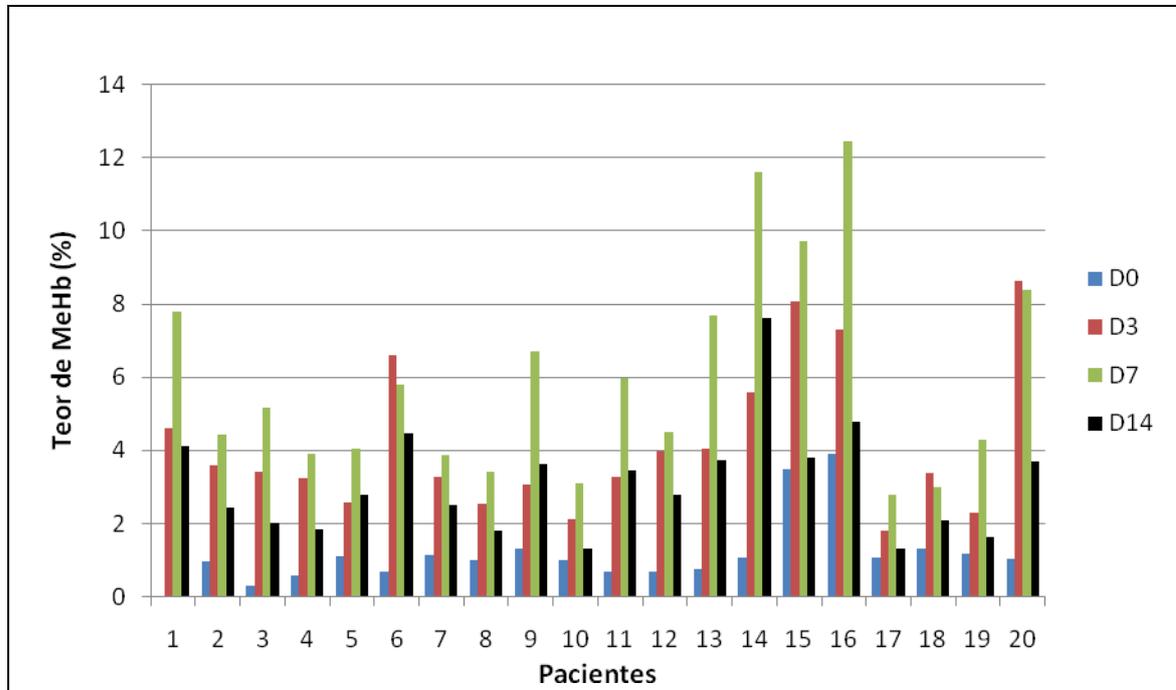


Figura 13 – Frequência da distribuição de metemoglobina de todos os participantes do estudo, antes (D0) e durante o uso de primaquina (D3, D7 e D14).

Na tabela 14 estão apresentados os teores de MeHb, expressos como média e desvio-padrão, de acordo com o sexo dos participantes, nos diversos dias de estudo. O emprego do teste estatístico paramétrico (t de student) não demonstrou diferença significativa nos teores de MeHb entre os sexos, no período avaliado, como podemos observar através dos P valores contidos na referida tabela. Por outro lado, a análise de variância dos teores de metemoglobina nos diversos dias de monitorização demonstrou diferença significativa para ambos os sexos. O emprego do teste *a posteriori* (Tukey) indicou diferença entre D0 e os dias D3 e D7 para ambos os sexos e observou-se diferença significante entre D7 e D14 apenas para o sexo masculino (Figura 14 e 15).

Tabela 14 – Porcentagem de metemoglobina, expressos como média e desvio-padrão, nos diferentes dias de estudos conforme o sexo do paciente.

SEXO	n	PRIMAQUINA (ng/mL)				P valor**
		D0	D3	D7	D14	
Masculino	15	1,28 ± 0,99	3,89 ± 1,93	5,45 ± 2,73	2,85 ± 1,13	<0.001
Feminino	5	0,75 ± 0,32	4,98 ± 2,24	7,34 ± 2,99	3,77 ± 2,31	<0.01
P valor*		0.0955	0.1513	0.0900	0.1071	---

n = número de indivíduos; *teste T de student; **análise de variância; $x \pm d.p.$ = média e desvio padrão.

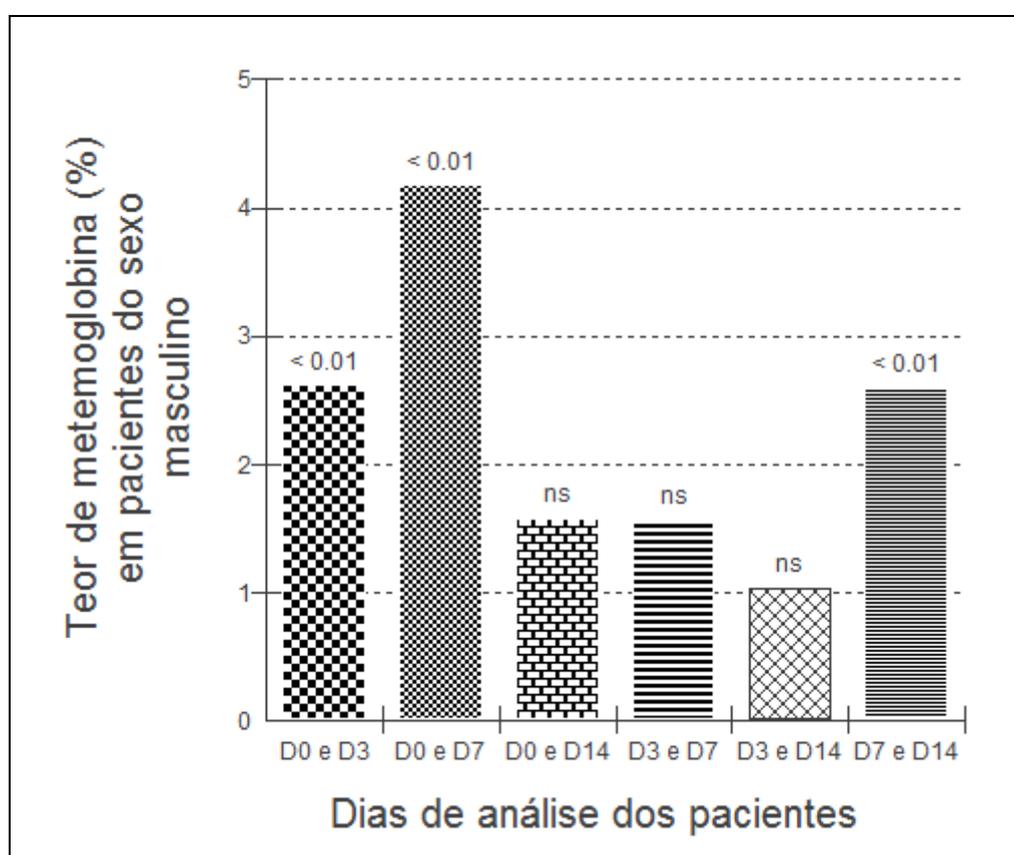


Figura 14 – Significância estatística dos teores de metemoglobina, expressos em porcentagem, dos pacientes do sexo masculino, nos diversos dias de análise. ns = não significante.

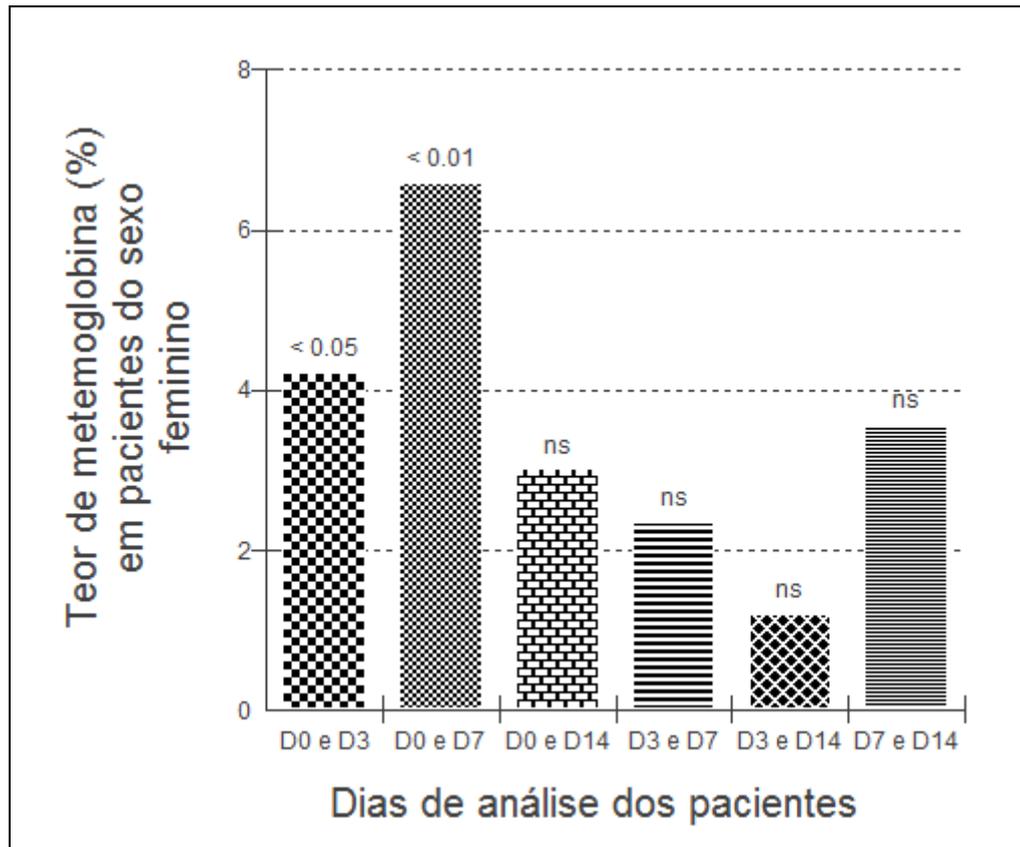


Figura 15 – Significância estatística dos teores de metemoglobina, expressos em porcentagem, dos pacientes do sexo feminino, nos diversos dias de análise. ns = não significativa.

Na tabela 15 estão os teores médios de metemoglobina dos pacientes do sexo masculino, considerando-se a atividade da enzima G-6-PD.

Tabela 15 – Teores médios da porcentagem de metemoglobina, expresso como média e desvio padrão dos pacientes do sexo masculino, considerando a presença ou ausência da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase.

Expressão da G-6-PD	n	PRIMAQUINA (ng/mL)				P valor**
		D0	D3	D7	D14	
Normal	9	1,16 ± 3,87	3,98 ± 1,63	5,25 ± 1,52	1,12 ± 1,13	<0.05
Enzimopênico	6	1,47 ± 1,82	3,76 ± 1,54	5,76 ± 1,67	2,90 ± 1,53	<0.001
P valor*		0.2813	0.4196	0.3679	0.4234	

n = número de indivíduos; *teste t de student; **análise de variância; x±d.p.= média e desvio padrão

Não foi observada diferença significativa nos teores de metemoglobina entre os pacientes com expressão normal da G-6-PD e os enzimopênicos nos diversos dias de estudo (Tabela 15). Entretanto, a análise de variância (ANOVA) demonstrou diferença significativa em ambos os grupos nos diferentes dias de estudo. O emprego de teste *a posteriori* (Tukey) indicou diferença nos teores de metemoglobina dos pacientes do sexo masculino normal para referida enzima entre D0 e os dias D3 e D7 e entre D7 e D14 (Figura 16), enquanto nos enzimopênicos encontrou-se diferença entre os dias D0 e D7 (Figura 17).

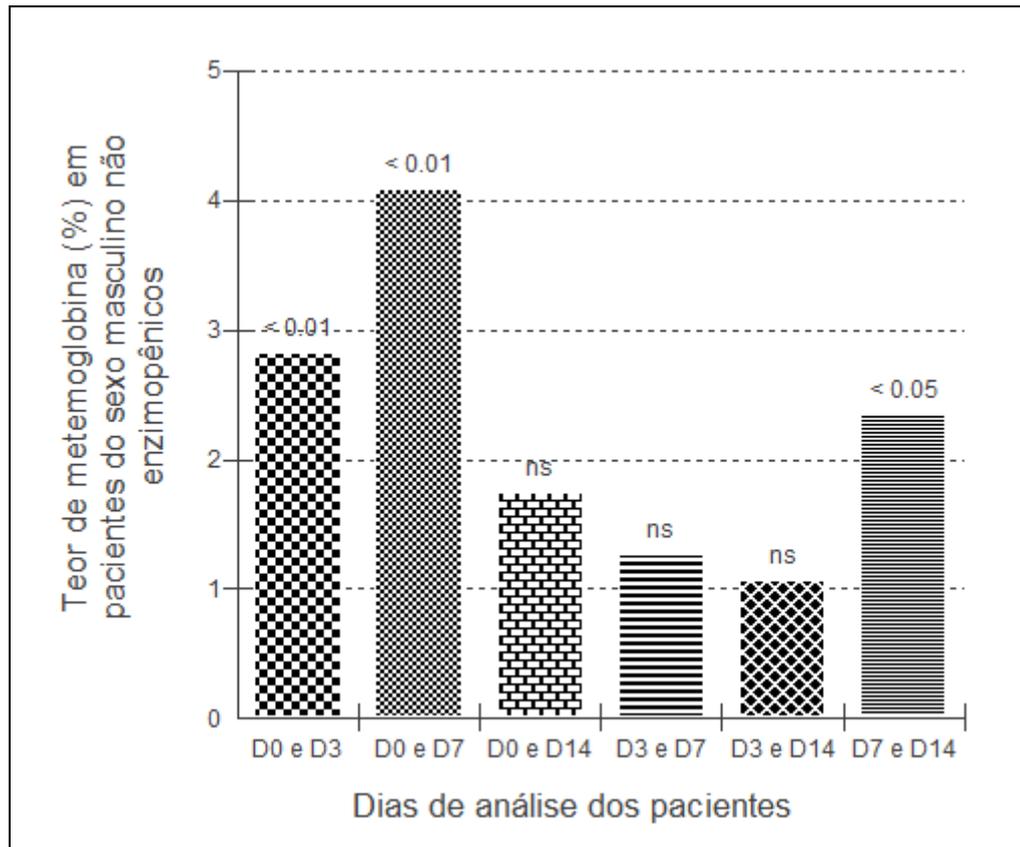


Figura 16 – Significância estatística dos teores de metemoglobina, expressos em porcentagem, dos pacientes com expressão normal da glicose-6-fosfato desidrogenase nos diversos dias de estudo. ns = não significante.

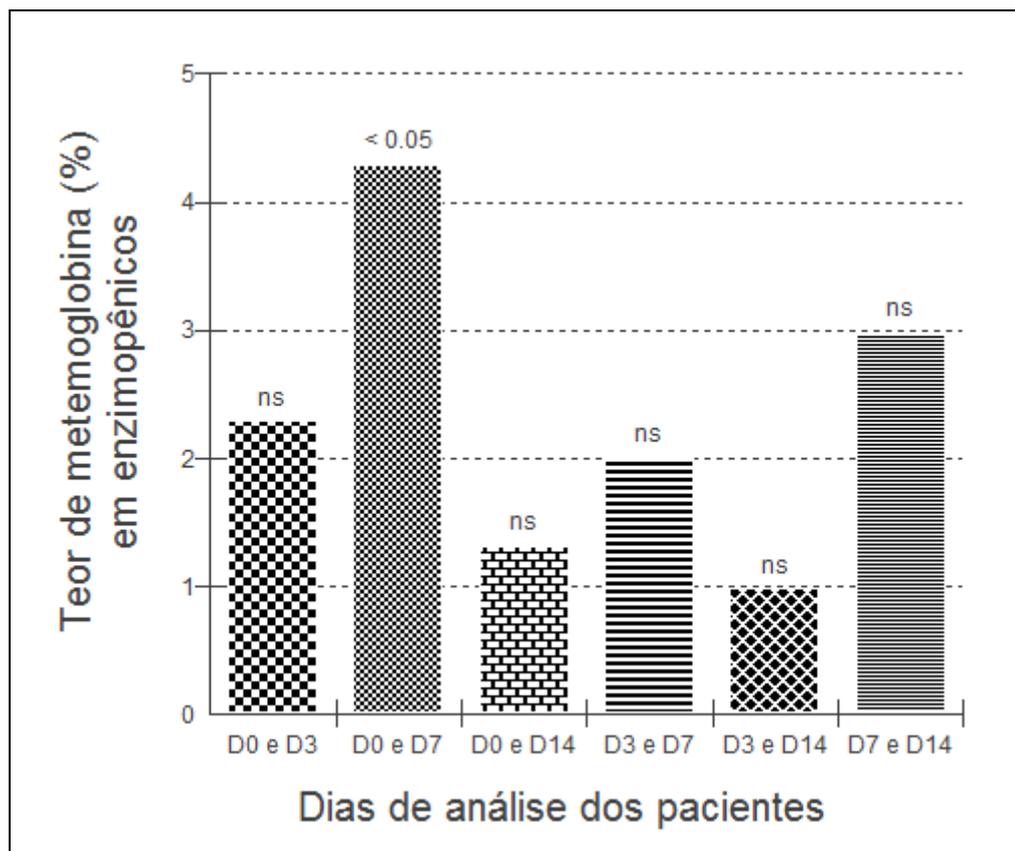


Figura 17 – Significância estatística dos teores de metemoglobina, expressos em porcentagem, dos pacientes com deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase nos diversos dias de estudo. ns = não significante.

6.5. Correlação entre as concentrações plasmáticas de primaquina com a porcentagem de metemoglobina

A regressão linear entre os teores de MeHb e as concentrações de PQ do fármaco apresentou equação de $y = 1.066 + 0.0155x$, com coeficiente de determinação (R^2) de 73.47% ($p = 0.1428$). Já o coeficiente de correlação de Pearson foi (r)=0.8571.

Ao se considerar os sexos dos participantes do estudo, a regressão linear entre os teores de MeHb e as concentrações de PQ dos participantes do sexo masculino apresentou equação da reta de $y=1.235+0.0137x$, o coeficiente de determinação (R^2)=68.82%, $p=0.1703$ e o coeficiente de correlação de (r)= 0.8296. Já nos pacientes do sexo feminino, a equação da reta foi $y=1.5345+0.0255x$, o

coeficiente de determinação de $(R^2)=66.21\%$, $p=0.1863$ e o coeficiente de correlação de $(r)=0.8137$.

DISCUSSÃO



7. DISCUSSÃO

Dentre os estados brasileiros, o Amapá ocupou o quinto lugar em número de casos de malária vivax no ano de 2008, com 11990 notificações. Neste estudo foram avaliados 20 pacientes durante 34 dias, que procuraram por demanda espontânea uma unidade de saúde do Estado, visando o diagnóstico e tratamento da malária. Contudo, dados do DATASUS de 2009, registraram apenas três casos de malária nesta unidade, comprometendo assim a estimativa do número de pacientes a ser admitido neste estudo. Percebe-se que o sistema de dados do Ministério da Saúde não está sendo alimentado adequadamente, o que pode trazer conseqüências graves, como a diminuição dos recursos para o combate à doença e o aumento no número de casos (DATASUS, 2008).

Para a aplicação do método proposto por Dua et al. (1996) na análise cromatográfica da PQ, foi necessária sua validação nas condições presentes no laboratório de Toxicologia da UFPA (BRASIL, 2003). Foram feitas modificações na metodologia original, como fase móvel, pH e fluxo, objetivando otimizar as condições de separação cromatográfica da PQ e da QND empregada como padrão interno (RIBANI et al., 2004).

Observou-se que o aumento da vazão diminuiu o tempo de retenção (Tabela 8), enquanto que o aumento do pH elevou este parâmetro (Tabela 7), porém sem alteração significativa na resolução dos analitos de interesse, sugerindo adequada robustez do método. Neste sentido, optou-se pelo pH = 5 e fluxo de 1 mL/min da fase móvel, composta por acetonitrila, metanol e água (30:26:95, v/v). A coluna de fase reversa C8 apresentou boa resolução dos compostos de interesse. Percebe-se na figura 10 a ausência de interferentes nestas condições padronizadas indicando, portanto, a boa seletividade do procedimento.

A linearidade e a curva de calibração da PQ (Figura 11 e 12), nas diversas concentrações demonstraram coeficiente de correlação de Pearson (r) superior a 0.99. Perfeitamente adequado as recomendações vigentes (RIBANI et al, 2004).

A repetibilidade (precisão-intraensaio) e a precisão interensaio, foram avaliadas através do coeficiente de variação em concentrações, baixa, média e alta da curva de calibração da PQ. Os resultados obtidos (Tabela 5) estão de acordo com o valor recomendado pela ANVISA, isto é, inferiores a 15% (BRASIL, 2003).

Foram feitas adaptações no procedimento de extração nos seguintes parâmetros: volume de plasma (100 µL) e composição do líquido extrator (Diclorometano : Éter metil terc butílico, 3,5:1, v/v), as quais a partir dos resultados da validação demonstraram-se adequadas. De acordo com recomendações vigentes a recuperação deve ser próxima de 100%, porém Ribani et al. (2004) recomendam valores entre 85 a 115%, quando se utiliza matriz complexa, análise de pequenas concentrações e métodos com várias etapas. Os dados apresentados na tabela 6 demonstraram resultados satisfatórios, pois foram acima de 85%.

A partir do método validado realizou-se a análise de amostras de 20 pacientes atendidos na Unidade Básica de Saúde Brasil Novo, com seguimento clínico laboratorial nos dias D0, D3, D7 e D14. As concentrações médias de primaquina nos diversos dias de estudo não apresentaram diferença significativa ($p > 0.05$). O mesmo resultado foi obtido na comparação dos teores do fármaco entre os sexos (Tabelas 10)

Estes resultados caracterizam a ausência de acúmulo do fármaco no organismo humano, o que é refletido na meia vida biológica reduzida, corroborando os estudos de Flether et al. (1981) e Bangchang et al. (1994) sobre a cinética do fármaco, que relataram que a primaquina é completamente eliminada durante 24h.

As concentrações plasmáticas de PQ obtidas neste estudo (Tabela 9) corroboram o estudo de Flether et al. (1981), cujos teores médios do fármaco em pacientes tailandeses foram 233ng/mL, nos caucasianos de 162ng/mL e nos enzimpênicos de 199ng/mL, todos do sexo masculino, após 2,5h da administração de 45mg de primaquina durante 5 dias. Resultado semelhante foi obtido por Greaves et al. (1980), os quais obtiveram teor médio de PQ de 190ng/ mL, utilizando cromatografia gasosa, em urina de pacientes caucasianos de ambos os sexos, com malária vivax fazendo uso de PQ 15mg durante 14 dias.

Por outro lado, Dua et al. (1996) relataram que a concentração média do fármaco no plasma de pacientes com malária vivax utilizando o mesmo esquema terapêutico deste estudo, foi 61,8 ng/mL. Pesquisa realizada por Bangchang et al. (1994) em pacientes tailandeses do sexo masculino, com malária, determinaram a concentração máxima de 57,7ng/mL e 54,8ng/mL em enzimpênicos, fazendo uso de 15mg de primaquina durante 14 dias. Tais discrepâncias podem ser creditadas aos horários de coleta do material biológico.

A comparação entre a concentração plasmática de PQ nos pacientes normais e enzimopênicos (Tabela 11), não demonstrou significância, ratificando o estudo realizado por Bangchang et al (1994).

A partir dos dados obtidos observamos que ocorreu aumento significativo no terceiro, sétimo e décimo quarto dia após a administração do fármaco (Figura 13), com destaque para o sétimo em que teve o maior teor (média=5.791%). Enquanto que estudos realizados por Flether et al (1981) em trinta caucasianos saudáveis utilizando o mesmo esquema terapêutico dessa pesquisa, determinou os maiores nível de MeHb no décimo quinto dia, utilizando a técnica de Evelyn e Malloy.

Srivastava et al. (2000) avaliaram as taxas de MeHb em eritrócitos de *Mastomys coucha* expostos as 8-aminoquinolina e compostos estruturalmente relacionados, e observaram também que a primaquina eleva significativamente o teor de MeHb, além de provocar a inibição completa da metemoglobina redutase, enzima com ação anti-oxidante.

Ressalta-se que os teores de metemoglobina deste estudo (Tabela 13) foram inferiores aqueles obtidos por Santana et al. (2007), de 11,1%, nos indivíduos com achados clínicos de metemoglobinemia, utilizando a mesma técnica que Flether et al. (1981). Contudo, os valores encontrados estão acima do normal, porém, próximo do tolerável, independente do sexo.

As características clínicas da metemoglobinemia são: cianose, cefaléia, dispnéia, torpor, depressão respiratória e sangue cor de chocolate. O sintoma característico observado nos pacientes utilizando primaquina e com metemoglobinemia superior a 10% é a cianose (VALE et al., 2009a; SANTANA et al., 2007). Durante a coleta do material biológico deste estudo foram identificadas apenas duas manifestações clínicas isto é tontura e cefaléia, as quais, de acordo com Krudsood et al. (2008), são potenciais efeitos adversos do uso de altas doses de PQ. Entretanto duas questões emergem deste achado, quer sejam: a frequência não acompanham o aumento nos teores de MeHb, já que no sétimo dia, nos quais as taxas de MeHb estavam maiores, apenas dois pacientes relataram cefaléia e tontura; por outro lado, tais manifestações são indistinguíveis daquelas do acesso malárico.

Diversos estudos relataram que a primaquina ocasiona metemoglobinemia, principalmente nos pacientes com deficiência de G-6-PD (SRIVASTAVA et al., 2000; SANTANA et al., 2007; BEUTLER et al., 2007; HILL et al., 2006; BROSSI et al.,

1987). Esta enzima apresenta variáveis genéticas que são classificadas de acordo com sua atividade, por exemplo, a variante africana é classificada com atividade média a moderadas (10-15% de atividade em homens homozigotos), enquanto que a variante Mediterrânea é mais severa com menos de 1% de atividade. Acredita-se que os pacientes deste estudo que apresentaram resultados qualitativos positivos para prova de redução da MeHb, apresentem uma variante genética que não é agravada pela presença da 8-aminoquinolina, já que não houve diferença no teor de MeHb dos enzimpênicos (Tabela 15) com relação aos demais pacientes (BEUTLER et al., 2007). Fato creditado a miscigenação racial do povo brasileiro, especialmente daqueles residentes no estado do Amapá.

Foi demonstrada diferença significativa na análise de variância dos teores de MeHb realizada entre os diversos dias de monitorização, tanto nos indivíduos do sexo masculino, feminino e enzimpênicos (Figura 15, 16, 17 e 18), diversos fatores ligados ao grupo de indivíduos podem ter alterado a cinética da MeHb, como ação de enzimas antioxidantes e cinética do metabólito oxidante (GREAVES et al., 1980).

A correlação entre as concentrações plasmáticas de PQ e os teores de metemoglobina não apresentaram significância estatística neste estudo, embora os coeficientes de correlação em ambos os sexos, tenha se demonstrado acima de 0,80. Corroborando com estudos que sugeriram a possibilidades dos metabólitos da PQ provocarem a elevação de MeHb. Soma-se o fato da reduzida meia vida biológica do fármaco que impede o aumento linear da oxidação da hemoglobina (GREAVES et al., 1980; BANGCHANG et al., 1994; SRIVASTAVA et al., 2000; BOLCHOZ et al. 2001).

Sabe-se que a PQ é um reconhecido agente oxidante da hemoglobina, atuando de maneira dose dependente. De acordo com Ganesan et al. (2009) a intensidade e a duração da ação do fármaco são controladas por enzimas microsossomais CYPs, as quais estão envolvidas na detoxicação ou ativação de espécies intermediárias do fármaco. Estes pesquisadores analisaram o efeito tóxico da PQ nos eritrócitos humanos, *in vitro*, e concluíram que a PQ não provoca significativo aumento das taxas de MeHb, corroborando com o resultado deste estudo. Porém, quando o fármaco foi incubado na presença de microsossomas hepáticos, ocorreu notado aumento no teor de MeHb, sugerindo-se portanto que esta elevação seja provocada por produtos de biotransformação.

Estudo realizado por Bolchoz et al. (2001) em ratos Sprague Dawley sugeriu que o metabólito 6-metoxi-8-hidroxi-aminoquinolina, formado pelos microsomas hepáticos através de N-hidroxilação, seja responsável pela formação de MeHb, de maneira dose dependente.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

O procedimento analítico apresentou parâmetros de validação que demonstram sua aplicabilidade na determinação das concentrações plasmáticas de primaquina em pacientes com malária vivax.

Os teores médios de primaquina em D3, D7 e D14 foram de 227 ± 106 ng/mL, 191 ± 97 ng/mL e 160 ± 128 ng/mL, respectivamente.

Os teores médios de metemoglobina em D0, D3, D7 e D14 foram de $1,15 \pm 0,9\%$, $4,1 \pm 2\%$, $5,7 \pm 2\%$ e $3 \pm 1,4\%$, respectivamente.

Não foi observada diferença significativa entre os teores de metemoglobina dos pacientes do sexo masculino, enzimopênicos e normais para deficiência de G-6-PD.

Os coeficientes de correlação de Pearson para os sexos masculino e feminino foram 0.8296 e 0.8137, respectivamente.

Foi observada deficiência da expressão da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase em seis pacientes do sexo masculino. Entretanto não foram caracterizadas diferenças significativas entre os teores médios de primaquina e as taxas de metemoglobina quando comparados com os pacientes com expressão normal desta enzima.

Sugere-se estudos posteriores para caracterização das variantes da enzima glicose-6- fosfato desidrogenase que circula no estado do Amapá.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

AGYEPONG, I. A.; ANSAH, E.; GYAPONG, M.; ADJEI, S.; BARNISH, G.; EVANS, D. Strategies to Improve Adherence to Recommended Chloroquine Treated Regimes: A Quasi-Experiment in the Context of Integrated Primary Health Care Delivery in Ghana. **Revista Social Science & Medicine**, v. 55, n. p. 2215- 2226, 2002.

ANDRADE, S. L. **Aspectos Epidemiológicos da Malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil**. 2005. 13f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

ANTUÑANO, F. J. L. Is primaquine useful and safe as true exo-erythrocytic merontocidal, hypnozoitocidal and gametocidal antimalarial drug? **Diario de Salud Pública de México**, v.41, n.5, p.410-419, México, 1999.

BAIRD, J. K.; RIECKMANN, K. H. Can Primaquine Therapy for vivax malaria be improved? **Journal of Parasitology**, v. 19, n. 3, USA and Australia, 2003.

BAIRD, J. K. Chloroquine Resistance in *Plasmodium vivax*. **Revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n.1, 2004.

BANGCHAND, K. N.; SONGSAENG, W.; THANAVIBUL, A.; CHOROENLARP, P.; KARBWANG, J. Pharmacokinetics of Primaquine in G6PD deficient and G6PD normal patients with vivax malaria. **Journal the Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.88, p. 220-222, Thailand, 1994.

BERNAN, J. Toxicity of commonly-used antimalarial. **Revista Travel Medicine and Infectious Disease**, v.2, p. 171-184, 2004

BEUTLER, E.; DUPARC, S. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Drug Development. **Journal American of Tropical Medicine and Hygiene**. v.4, n.77, p. 779-789, California and United Kingdom, 2007.

BOLCHOZ, L. J. C.; BUDINSKY, R. A.; MCMILLAN, D. C.; JOLLOW, D. J. Primaquine-Induced Hemolytic Anemia: Formation and Hemotoxicity of the Arylhydroxylamine Metabolite 6-Methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v.297, n.2, p.509-515, South Carolina, 2001.

BOWMAN, Z. S.; JOLLOW, D. J.; MCMILLAN, D. C. Primaquine-Induced Hemolytic Anemia: Role of Splenic Macrophages in the Fate of 5-Hydroxyprimaquine- Treated Rat Erythrocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n.3, South Carolina, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Validação de Métodos Analíticos**. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.

BREWER, G. J.; TARLOV, A. R.; ALVING, A. S. The methemoglobin Reduction test for primaquina-type sensitive of erythrocytes. **Journal of the American Medical Association**, n.180, p386-388, 1962.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p.130-146, São Paulo, dezembro 2003.

BROSSI, A.; GESSNER, W.; HUFFORD, C. D.; BAKER, J. K.; HOMO, F.; MILLET, P.; LANDAU, I. Photooxidation Products of Primaquine. **Journal Federation of European Biochemical Societies**. v. 223, n. 1, p.77-81, USA and France, 1987.

CAMARGO, T. M.; ALVEZ, M. I. F.; OLIVEIRA, S. J.; SHITARA, E. S.; OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo Comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MeHb). **Rev. Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 2, p.95-98, Sorocaba, 2007.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Disease**, 2006. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/disease.htm>>. Acesso em: 07 de agosto de 2009.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Frequently Asked Questions**, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/faq.htm>>. Acesso em: 01 de agosto de 2009.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Life Cycle**, 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm>. Acesso em: 01 de agosto de 2009.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Malária Facts**, 2007. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/biology/facts.htm>>. Acesso em: 02 de agosto de 2009.

COMPRI M. B., SAAD S. T., RAMALHO A. S. Investigação genético-epidemiológica e molecular da deficiência de G-6-PD. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.16, n.2, p.335-342, 2000.

DEEN, J. L.; SEIDLEIN, L.; DONDORP, A. Therapy of uncomplicated malaria in children: a review of treatment principles, essential drugs and current recommendations. **Journal Tropical Medicine and International Health**, v.13, n.9, p.1111-1130, Tanzania, Korea, London and Thailand, 2008.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS. **Resumo Epidemiológico**, 2008. Disponível em: <http://dwsaude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria/TAB9944?ano_ini_pos_n=2008&ano_fim_pos_n=2003>. Acesso em: 04 de agosto de 2009.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS. **Resumo Epidemiológico**, 2009. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/malaria/bases/malabrnet.def>>. Acesso em: 04 de janeiro de 2010.

DUA, V. K.; KAR, E. K.; SARINA, R.; SHARMA, V. P. High-performance Liquid Chromatographic Determination of Primaquine and Carboxyprimaquine Concentrations in Plasma and Blood Cells in *plasmodium vivax* Malaria Cases Following Chronic Dosage with Primaquine. **Journal of chromatography**, v.657, p.93-98, India, 1996.

FERREIRA, A. C. S. A. **Atenção Básica em Saúde em Áreas Endêmicas para Malária na Região da Amazônia Legal- Brasil**. 2008, 25f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

FLETCHER, K. A.; EVANS, D. A. P.; GILLES, H. M.; GREAVES, J.; BUNNAG, D.; HARINASUTA, T. Studies on the Pharmacokinetics of Primaquine. **Journal of Public Health: Bulletin of the World Health Organization**, v. 3, n. 59, p. 407-412, England and Thailand, 1981.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Reviewer guidance Validation of chromatographic methods**, 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance>>. Acesso em: março de 2009.

GANESAN, S. B.; TEKWANI, B. L.; LALIT, R. S.; WALKER, T. L. A. Cytochrome P450-dependent toxic effects of primaquine on human erythrocytes. **Journal Toxicology and Applied Pharmacology**. n. 241, p. 14-22, USA, 2009.

GREAVES, J.; EVANS, D. A. P.; FLETCHER, K. A. Urinary Primaquine Excretion and Red Cell Methaemoglobin Levels in Man Following a Primaquine: Chloroquine Regimen. **British Journal of Clinical Pharmacology**. n. 10, p. 293-295, Liverpool, 1980.

GUALANDRO, S. F. M. Diagnóstico Diferencial das Anemias. **Journal Brasileiro de Nefrologia**. v.22, n.5, p. 7-10, São Paulo, 2000.

GUMUSLU, S.; YUCEL, G.; SARIKCIOGLU, S. B.; SERTESER, M. Application of a New Chemiluminescence Method for the Determination of Glucose-6-Phosphat

Activity in Healthy and Enzyme-Deficient Individuals. **Journal of Pharmacological and Toxicological Method.** n.51, p.169-174, Turkey, 2005.

HILL, D. R.; BAIRD, J. K.; PARISE, M. E.; LEWIS, L. S.; RYAN, E.T.; MAGILL, A. J. Primaquine: Report From CDC Expert Meeting on Malaria Chemoprophylaxis I. **American Journal of Tropical and Hygiene.**, v. 65, n. 3, p. 402-415, England, Indonesia, Georgia, Massachusetts, Maryland, 2006.

KRUDSOOD, S.; TANGPUKDEE, N.; WILAIRATANA, P.; PHOPHAK, N.; BAIRD, K.; BRITTENHAM, M. G.; LOOAREESUWAN, S. High-dose Primaquine Regimens Against Relapse of *Plasmodium vivax* Malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v.78, n. 5, p. 736-740, Thailand, Indonesia, New York, 2008.

KUS, M. S. G-6-Pd çorum: A new variant of glucose -6- phosphate dehydrogenase. **Journal of Islamic Academy of Sciences.** v.2, n.1, p.31-33, Turkey, 1989.

MAURÍCIO, C. R. F.; MAIA, R. D.; QUEIROZ, S. M. V.; ARAÚJO, M. G. M.; MIRANDA, R. G. C.; MEDEIROS, T. M. D. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase: dados de prevalência de pacientes atendidos em hospital universitário Onofre Lopes Natal –RN. **Revista Brasileira de Análises Clínicas,** v. 38, n., p. 57-59, Rio Grande do Norte, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Terapêutica da Malária.** 6 ed. Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde, 2001, p.23-61.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose.** 2 ed., Brasília, 2008, p.101-116.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica em Gestão. **Ações de Controle da Malária: Manual para Profissionais de Saúde na Atenção Básica**. Versão preliminar, Brasília, 2005, p.21-25.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Aspectos epidemiológicos**, 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31086&janela=2. Acesso em: 03 de fevereiro de 2009.

MUÑOZ, J.; VELASCO, M.; ALONSO, D.; VALL, M. E.; CORACHÁN, M.; GASCON, J. ¿Cuánta primaquina es necesaria para erradicar los hipnozoitos de *Plasmodium vivax*? **Revista de Enfermedad Infecciosas Microbiologica y Clinica**. v. 24, n.1, p.29-30, España, 2006.

NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. S; Dosagem espectrofotométrica de metemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**. v.26 n.1 p. 19-22 200, São Paulo, maio 2004.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. São Paulo. Ed.11, Atheneu, 2007, p. 143-161.

OGA S. **Fundamentos da Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996, p.173-177.

PALIWAL, K. P.; GUPTA, R. C. A rapid and sensitive high performance liquid chromatographic assay of the new antimalarial compound 80:53 in serum with a novel sample clean-up method and its pharmacokinetics in rabbits. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p 777-783, India, 1998.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; METO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Revista Química Nova**. v. 27,n.5, p. 771-780, Paraná, São Paulo, julho 2004.

RODRIGUES, L.N.C.; WATANABE, S.P.; FERRAZ, H. G. Perfil de dissolução *in vitro* de comprimidos de primaquina disponíveis para tratamento de malária no

Brasil. **Revista Brasileira de Doenças Tropicais**. v.41, n.1, p.41-45, São Paulo, nov.2007.

SANTANA, M. S.; ROCHA, M. A. F.; ARCANJO, A. R. L.; SARDINHA J. F. J.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM M. G. C. Associação de metemoglobinemia e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária tratados com primaquina. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, n.5, p.533-536, Amazonas, agosto 2007.

SHARMA, A.; EAPEN, A.; SUBBARAO, S. K. Purification and Characterization of a Hemoglobin Degrading Aspartic Protease from the Parasite *Plasmodium vivax* **Journal Biochemical**. v.138, n.1, p. 71-78, India, abril 2005.

SILVA, M. C. M.; SANTOS, E. B.; COSTA, E. G.; SANTOS, FILHO M. G.; GUERREIRO, J. F. E; PÓVOA, M. M. Alterações clínicolaboratoriais em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase tratados com 0,50mg/kg/dia de primaquina. **Revista Brasileira de Doenças Tropicais**. v. 37, n.3, p.215-217,Pará, abril 2004.

SILVIA, R. T.; IGLESIAS, A. C.; MEDEIROS, I. D.; BEZERRA, I. M.; MEDEIROS, T. M. D. Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em Adultos. **News Lab**. p.96-102, Rio Grande do Norte, 2006.

SRIVASTAVA, P.; SINGH, S.; JAIN, G. K.; PURI, S. K.; PANDEY, V. C. A Simple and Rapid Evaluation of Methemoglobin Toxicity of 8-Aminoquinolines and Related Compounds. **Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 45, p. 236-239, India, 2000.

TSENG, C. P.; HUAN, C. L.; CHONG, K. Y.; HUNG, I. J.; CHIU, D. T. Y. Rapid Detection of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase gene mutations by denaturing high-peformance liquid chromatography. **Journal Clinical Biochemistry**. n.38, p.973-980, Taiwan, 2005.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Primaquine revised six decades after its discovery. **European Journal of Medical Chemistry**. v. 44, p.937-953, Portugal, 2009a.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da Malária um Século de Desenvolvimento de antimaláricos. **Rev. Química**, v.99, p.57-69, Lisboa, 2005.

VALE, N.; NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V. E.; GOMES, P.; MOREIRA, R. Primaquine dipeptide derivatives bearing na imidazolidin-4-one moiety at the N-terminus as potential anyimalarial prodrugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.44, p. 2506-2516,Portugal, 2009b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Observatory Gallery** 2008. Disponível em: < http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_ITHRiskMap.JPG > Acesso em: 10 de fevereiro de 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diagnosis and Treatment**, 2007. Disponível em: < <http://apps.who.int/malaria/diagnosisandtreatment.htm> > Acesso em: 04 de agosto de 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Malaria Case Management: Operations manual**. Geneva, 2009a, p.1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2009**. SUÍÇA: WHO, 2009b. p.26 – 40.(Relatório anual, 2009).

WRIGHT, O. R.; LEWANDER, W. J.; WOOLF, A. D. **Methemoglobinemia**: Etiology, Pharmacology y Clinical Management. In: Annals of emergency medicine. v. 34, n.5, p.646-656, novembro 1999.

YESHIWONDIM, A. K.; TEKLE, A. H.; DENGELA, O. D.; YOHANNES, A. M.; TEKLEHAIMANOT, A. Therapeutic efficacy of chloroquine and chloroquine plus

primaquine for the treatment of Plasmodium vivax in Ethiopia. **Journal Acta Tropica**. p. 1-9, United States and Ethiopia, 2009.

ANEXO A- Autorização da Vigilância em Saúde do Município de Macapá para realização da coleta de sangue dos pacientes atendidos na Unidade Básica de Saúde Brasil Novo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA

CARTA DE SOLICITAÇÃO

*Autoriza
Macapá este/los
Ampar*

A Sua Senhoria a Senhora

Nayma da Silva Picanço.

Diretora da Vigilância em Saúde do Município de Macapá/SEMSA/PMM

Prezada Senhora,

A malária é uma doença que destaca-se pelo seu elevado índice de morbidade e mortalidade, uma das formas de seu controle é a utilização de quimioterápicos, os quais apresentam um papel fundamental no tratamento dos pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de malária.

Nesse sentido foi criada a Rede Amazônia de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas (RAVREDA) coordenado no Brasil pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, com o objetivo de monitorar a resistência aos antimaláricos de toda região amazônica.

Dentro deste contexto foi contemplado o projeto intitulado "Determinação das concentrações plasmática de cloroquina e primaquina em pacientes com malária causada por *Plasmodium vivax*", com objetivo determinar as concentrações plasmáticas de Cloroquina e primaquina em pacientes com malária causada por *P. vivax*, correlacionando-as com os índices hematimétricos e o teor de metemoglobina. Os dados obtidos no final do projeto visam avaliar os riscos de metemoglobinemia com o uso destes quimioterápicos em pacientes com *P. vivax*. Os voluntários que participarem do estudo serão esclarecidos quantos aos objetivos e a finalidade dos resultados, de forma que sempre obedecerá os Aspectos Éticos e Legais da Resolução 196/96.

É com esta finalidade que venho por meio desta, solicitar à diretora da Vigilância em Saúde do Município de Macapá, a autorização referente à coleta de vinte amostras de sangue na Unidade Básica de Saúde - Brasil Novo, sob direção de Elioneide de Almeida Monteiro.

Atenciosamente,

Macapá, 27 de agosto de 2009

Michelli Erica Souza Ferreira

Mtd. Michelli Erica Souza Ferreira

*Recebido em 01/09/09
Elioneide de Almeida Monteiro
Diretora da UBS Brasil Novo
Dec. 1238/2009/PMM*

ANEXO B – Autorização do Hospital Alberto Lima para realização do Hemograma.



**GOVERNO DO ESTADO DO AMAPÁ
LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA
GABINETE DA PRESIDÊNCIA**

Rua Tancredo Neves n.º 1118 - São Lázaro - Macapá CEP.: 68908-530
Fone-Fax (0xx) (96)3212-6115/Tel.:3212-6175/3212-6165
E-mail: diretori@lacen.ap.gov.br

Ofício n.º. 601/2009-DIRE/LACEN

Macapá, 25 de agosto de 2009.

A Sua Senhoria o Senhor
Eduardo Franco
Laboratório do Hospital Alberto Lima

Prezado Senhor,

Cumprimentando-o cordialmente, solicitamos a Vossa Senhoria, a realização de Hemograma (VCM, HCM, CHCM, Hemácias, Hematócritos e Reticulócitos) em vinte amostras sanguíneas dos pacientes que serão incluídos no projeto de malária.

Informamos ainda que serão encaminhadas diariamente em torno de 03 (três) amostras, no período da tarde acompanhadas da ficha de notificação do paciente até que sejam completadas as 20 (vinte) amostras.

Atenciosamente,


Juvenete Amoras Távora
Diretora Presidente

RECEBI O ORIGINAL

Em 25/08/09 às 14:25 hs.

Dr. Eduardo Franco
Farmacêutico Titular
CRF 136
Chefe do LACAL

ANEXO C – Autorização do Laboratório central de Saúde Pública do Amapá para análise de metemoglobina e prova de redução enzimática.



GOVERNO DO ESTADO DO AMAPÁ
LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA
PROFESSOR REINALDO DAMASCENO

CARTA DE ANUÊNCIA PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Macapá, 21 de Agosto de 2009.

O Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá – LACEN-AP, neste ato representado pelo Diretora-Presidente do LACEN/LAFRON, portadora da carteira de identidade Nº 274538, expedida pelo SEGUP-PA em 29/12/1994, e inscrita no CPF sob Nº 306.268.622.72, considerando a necessidade de ser implementada uma ação conjunta e integrada, para o desenvolvimento da pesquisa científica, concorda com a participação desta Instituição no projeto de pesquisa intitulado "DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PRIMAQUINA E CLOROQUINA EM PACIENTES COM MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax*",

Atenciosamente,



Juvanete Amora Távora
Diretora - Presidente

ANEXO D – Carta de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**



Carta Provisória: 105/09 CEP-ICS/UFPA

Belém, 19 de outubro de 2009.

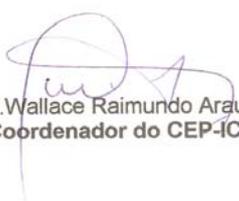
À:
Prof^a. Michele Erica Souza Ferreira

Senhora Pesquisadora,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa **“Determinação das concentrações séricas de cloroquina e primaquina em pacientes com malária causada por *plasmodium vivax*”** de CAAE 0013.0.073.000-09 e parecer nº 093/09 CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, na reunião do dia 07 de outubro de 2009.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar o relatório parcial do mesmo até o dia 15 fevereiro de 2010, no CEP-ICS/UFPA, situado na Cidade Universitária Professor José da Silveira Netto - Guamá, Campus profissional, no Complexo de sala de aula do ICS – sala 13 (Altos).

Atenciosamente,


Prof. Dr. Wallace Raimundo Arujo dos Santos.
Coordenador do CEP-ICS/UFPA

ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você foi convidada a participar do projeto intitulado “Determinação das concentrações plasmática de cloroquina e primaquina em pacientes com malária causada por *Plasmodium vivax*”, parasita que é um ser vivo tão pequeno que só conseguimos vê-lo com a ajuda de lentes de aumento. Essa doença é transmitida através da picada de um mosquito.

A malária pode ocorrer de forma assintomática ou apresentar os sinais e sintomas clássicos, como febre, sudorese, cefaléia e dores musculares.

Você adquiriu a malária causada pelo *Plasmodium vivax*, e por isso precisou tomar os medicamentos chamados Cloroquina e a Primaquina.

Essa pesquisa é para sabermos as quantidades de Cloroquina e Primaquina que permanece no seu plasma, depois de ter tomado os remédios. Para isso, haverá a necessidade de coleta de sangue, através de punção venosa periférica. Após coleta, realizada no Centro de Referência de Doenças Tropicais de Macapá, as amostras serão transportadas para análise no Laboratório de Toxicologia, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

Os participantes podem ficar tranquilos, pois as suas identidades não serão reveladas, garantindo-se o mais absoluto sigilo de sua participação na pesquisa, sendo apenas utilizados os resultados dos exames. Estes serão apenas do conhecimento do pesquisador. Cópia dos resultados será entregue aos respectivos participantes.

A presente pesquisa não acarreta riscos à vida dos pacientes, bem como assegura total e gratuita assistência, e será realizada em ambiente seguro, com materiais assépticos, descartáveis, oferecidos gratuitamente.

OBSERVAÇÃO: Após os esclarecimentos sobre todo o programa, o responsável é livre para participar ou retirar-se do projeto a qualquer momento.

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, e me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material.

Belém, _____/_____/_____

Assinatura do paciente

• RESPONSÁVEIS PELA PESQUISA:

Mtd. Michelli Erica Souza Ferreira
Fone: (91)8113-8129

Dr. José Luiz Fernandes Vieira
Fone: (91)8417-2533