

**ÉRIKA RODRIGUES GUIMARÃES**

**CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICA E ERITROCITÁRIA DE  
QUININA NO ESTADO DE EQUILÍBRIO EM PACIENTES COM MALÁRIA POR  
*PLASMODIUM FALCIPARUM* NÃO COMPLICADA**

**BELÉM-PARÁ**

**2007**

**ÉRIKA RODRIGUES GUIMARAES**

**CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICA E ERITROCITÁRIA DE  
QUININA NO ESTADO DE EQUILÍBRIO EM PACIENTES COM MALÁRIA POR  
*PLASMODIUM FALCIPARUM* NÃO COMPLICADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia das Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira.

**BELÉM-PARÁ**

**2007**

**ÉRIKA RODRIGUES GUIMARAES**

**CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICA E ERITROCITÁRIA DE  
QUININA NO ESTADO DE EQUILÍBRIO EM PACIENTES COM MALÁRIA POR  
*PLASMODIUM FALCIPARUM* NÃO COMPLICADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia das Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva

Departamento de Farmácia – Universidade Federal do Pará, UFPA.

Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa

Departamento de Farmácia – Universidade federal do Pará, UFPA.

Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa

Departamento de Farmácia – Universidade Federal do Pará, UFPA.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Aoba Ishikawa (Suplente)

Núcleo de Medicina Tropical – Universidade Federal do Pará, UFPA.

BELÉM-PARÁ

2007

*“Nessa escola o melhor aluno não é aquele que tem consciência do quanto sabe, mas do quanto não sabe. Não é aquele que reconhece sua perfeição, mas o que reconhece suas limitações. Não é aquele que proclama a sua força, mas o que educa a sua sensibilidade.”*

*Augusto Cury*

*DEDICATÓRIA*

*Ao meu esposo Pablo Costa, pelo companheiro e amigo que é. Pelo estímulo que representa em minha vida, pela compreensão, incentivo e paciência que teve diante de minhas ausências e, principalmente, pelo amor e dedicação, o que prova a importância de uma vida a dois.*

*A meus pais, Agnelo e Mariana, que estiveram sempre presentes, em todas as horas, apoiando e não medindo esforços para que meus sonhos se realizassem.*

*Deus os abençoe sempre!*

## AGRADECIMENTOS

*A DEUS, porque, Dele por Ele, para Ele são todas as coisas, inclusive minha vida, me deu a oportunidade de iniciar este trabalho e forças para concluí-lo.*

*O meu mais profundo agradecimento é dirigido ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira, não só pela orientação deste trabalho, como pela confiança em mim depositada para a sua concretização e pelo entusiasmo, disponibilidade e amizade que sempre me dispensou. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei. Pela alegria de trabalharmos juntos.*

*A Universidade Federal do Pará – UFPA, especialmente ao Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, sob a coordenação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Edna Aoba Ishikawa, pelo comprometimento e empenho em oportunizar esse curso.*

*Ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Pará por disponibilizar o Laboratório de Toxicologia para a realização das análises das amostras desse trabalho.*

*Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais que me ensinaram com prazer e dedicação parte do que sei, e o que é mais importante, me ensinaram a aprender sozinha.*

*A equipe da 4<sup>a</sup> Regional de Proteção Social, em especial ao Dr. José Medeiros Filho – Diretor de Endemias, pela dedicação e colaboração nas coletas das amostras dos pacientes.*

*A minha Família: meus pais, irmão, tios, sogra, primos e cunhados que me apoiaram de diversas formas durante todo o trajeto dessa pesquisa e da minha vida como um todo.*

*Aos colegas do Mestrado em Doenças Tropicais – NMT/UFPA – Turma 2004, pela amizade, conhecimentos repassados e trocados durante todo o curso.*

*A Larissa Borges, pessoa iluminada, muito obrigada pela dedicação e colaboração dispensada na realização deste trabalho.*

*A todos os estagiários do Laboratório de Toxicologia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Pará, pela amizade, apoio e colaboração.*

*Aos meus amigos se longa data, sem nenhuma ordem em partícula, que foram perguntando pelo trabalho e suportaram as minhas ausências, bem como as minhas presenças (!).*

*Aos pacientes que participaram da realização deste trabalho.*

*A todos, os meus sinceros agradecimentos.*

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	2
1.3 CICLO BIOLÓGICO DO PLASMODIUM .....	8
1.4 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA FALCIPARUM .....	11
1.5 TRATAMENTO .....	13
1.6 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA QUININA .....	15
<b>1.6.1 Farmacocinética .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6.2 Mecanismo de Ação .....</b>	<b>19</b>
<b>1.6.3 Efeitos Adversos .....</b>	<b>21</b>
1.7 JUSTIFICATIVA .....	23
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
3.1 ÁREA DE ESTUDO .....	24
3.2 CASUÍSTICA .....	25
3.3 FATORES DE EXCLUSÃO .....	25



3.4 ESQUEMA TERAPÊUTICO .....	25
3.5 AMOSTRAS .....	26
3.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS .....	27
<b>3.6.1 Aparelhos e Equipamentos .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6.2 Condições Cromatográficas .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6.3 Extração de Quinina do Soro .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6.4 Curva de Calibração da Quinina .....</b>	<b>29</b>
<b>3.6.5 Extração de Quinina do Concentrado de Eritrócitos .....</b>	<b>29</b>
<b>3.6.6 Determinação da Concentração de Quinina .....</b>	<b>30</b>
3.7 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS .....	30
<b>4 PARECER DE ÉTICA .....</b>	<b>30</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
5.1 RESULTADO DA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA ..	32
<b>5.1.1 Curva de Calibração da Quinina .....</b>	<b>32</b>
5.2 RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE QUININA NAS DIVERSAS AMOSTRAS ANALISADAS .....	34
<b>5.2.1 Nas Amostras das Crianças .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2.2 Nas Amostras dos Indivíduos Adultos .....</b>	<b>36</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS</b>	

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Áreas endêmicas de Malária ao redor do Mundo.....	4
<b>Figura 2:</b>	Mapa de risco de transmissão de Malária. Amazônia Legal, 2005 .....	5
<b>Figura 3:</b>	Notificação dos casos de Malária na 4ª RPS em 2004/ 2005/ 2006 .....	6
<b>Figura 4:</b>	Notificação dos casos de Malária no Município de Cachoeira do Piriá/Pará/Brasil em 2004/2005/2006 .....	7
<b>Figura 5:</b>	Notificação dos casos de Malária por <i>P. falciparum</i> em Cachoeira do Piriá/Pará/Brasil em 2004/2005/2006 .....	7
<b>Figura 6:</b>	Ciclo Evolutivo do Plasmodium .....	10
<b>Figura 7:</b>	Estrutura química da Quinina .....	17
<b>Figura 8:</b>	Esquema de Procedimentos da Extração de Quinina das Amostras .....	31
<b>Figura 9:</b>	Representação gráfica da Curva de Calibração da Quinina	33
<b>Figura 10:</b>	Correlação entre as concentrações sérica e eritrocitária de Quinina em crianças com malária falciparum não complicada .....	36
<b>Figura 11:</b>	Correlação entre as concentrações sérica e eritrocitária de Quinina em indivíduos adultos com malária falciparum não complicada .....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I:</b>	Esquema terapêutico utilizado no tratamento da Malária causada por <i>Plasmodium falciparum</i> com quinina em 7 dias.....	<b>14</b>
<b>Tabela II:</b>	Esquema terapêutico utilizado no tratamento da Malária causada por <i>Plasmodium falciparum</i> com quinina e associações.....	<b>15</b>
<b>Tabela III:</b>	Relação entre áreas de quinina e quinidina .....	<b>32</b>
<b>Tabela IV:</b>	Resultados da determinação de quinina ( $\mu\text{g/mL}$ ), nas amostras de soro e concentrado eritrócitos de crianças com malária <i>falciparum</i> não complicada.....	<b>35</b>
<b>Tabela V:</b>	Resultados da determinação de quinina ( $\mu\text{g/mL}$ ) em amostras de soro e eritrócitos de indivíduos adultos com malária <i>falciparum</i> não complicada.....	<b>37</b>

## RESUMO

A correlação entre as concentrações séricas e eritrocitárias de quinina foi estudada em crianças e indivíduos adultos com malária por *Plasmodium falciparum* não complicada no Município de Cachoeira do Piriá, Estado do Pará. Os pacientes receberam esquema terapêutico oral de quinina (3 dias) + Doxiciclina (5 dias) + primaquina (6º dia). As concentrações de quinina nas amostras de soro e eritrócitos foram mensuradas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no terceiro dia de tratamento. A concentração média de quinina no soro de crianças com malária falciparum não complicada foi de  $0,723 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ , e a eritrocitária de  $0,537 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ . A relação entre as concentrações séricas e eritrocitária de quinina no soro de crianças foi de  $1,89 \pm 1,25 \mu\text{g/mL}$ , não houve diferença estatisticamente significativa entre estas concentrações. A média da concentração sérica de indivíduos adultos foi de  $1,27 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$ , e a eritrocitária de  $0,63 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$ . A relação entre essas concentrações foi de  $2,27 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$ . Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa entre as médias da relação dos teores de quinina no soro e nos eritrócitos das crianças e dos indivíduos adultos.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium falciparum*. Quinina.

**ABSTRACT**

The correlation between the serum and red blood cells concentrations of quinine was studied in children and adults with falciparum malaria uncomplicated in Cachoeira of the Piriá, in the State of Pará. The patients had received the oral scheme of quinine (3 days) + doxycyclina (5 days) + primaquine (6<sup>o</sup> day). Quinine concentration in the serum and the red blood cells samples was measured by High Performance Liquid Chromatography in the third day of treatment. The average of the serum concentration of the quinine in children with uncomplicated falciparum malaria was of  $0,723 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ , and  $0,537 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$  for the red blood cells. And the relationship between the serum and red blood cells concentration was  $1,89 \pm 1,25 \mu\text{g/mL}$ , had not difference statistical significant between those concentrations. The average of the serum concentration of adult individuals was of  $1,27 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$ , and  $0,63 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$  for the red blood cells. The relationship between those concentration was of  $2,27 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$ . The results had shown that it did not have significant statistical difference between the averages of the relation of quinine levels in the serum and the red blood cells of the children and the adults.

Key-words: Malaria. *Plasmodium falciparum*. Quinine.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária tem persistido, ao longo dos anos, como relevante endemia no Mundo. Hipócrates relacionou as manifestações clínicas com as estações do ano e os locais onde os doentes habitavam ou freqüentavam. A doença é atualmente encontrada em toda a região tropical e sub-tropical do planeta. Estima-se que mais de 100 milhões de pessoas são infectadas a cada ano (BRUCE-CHWATT, 1980).

O médico francês Charles Alphonse Laveran (1881) foi o primeiro a observar e descrever o agente etiológico da malária no interior dos glóbulos vermelhos humanos. Em 1897, o médico britânico Ronald Ross, encontrou formas do parasito da malária no interior de um mosquito, o qual havia realizado o repasto sanguíneo em um portador da doença, contribuindo assim para a elucidação do modo de transmissão. Estudos realizados, entre 1898 e 1899, pelos pesquisadores italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi, descreveram o ciclo completo de desenvolvimento do parasita no homem e na fêmea do *Anopheles* (VILLALÓN, 2006).

Os protozoários intracelulares causadores da malária pertencem ao Filo Apicomplexa, Ordem Eucoccidiida, Subordem Haemosporinae, Família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium* (Machiafava & Celli, 1885), o qual apresenta cerca de 120 espécies, destas quatro infectam o homem, *Plasmodium malariae* (Laveram 1881), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti 1890), *Plasmodium falciparum* (Welch 1897), e *Plasmodium ovale* (Stephens 1922) (apud GOMES *et al*, 2001).

A malária apresenta ampla distribuição geográfica, sendo considerada endêmica em cerca de 100 países, geralmente localizada nas regiões mais pobres. A doença atua como fator limitante do crescimento demográfico, cultural e econômico (WHO, 2005).

No Brasil, a doença é causada por três das quatro espécies de *Plasmodium*, excluindo-se o *P. ovale*. O *P. falciparum* tem distribuição mundial, porém encontra-se concentrado nas regiões tropical e subtropical do planeta. É o mais letal e se multiplica rapidamente, conseqüentemente, invade e destrói mais glóbulos vermelhos que as outras espécies, causando assim, um quadro de anemia mais grave e imediato, levando a manifestações severas como comprometimento cerebral, falência renal e afecções pulmonares (HEDDINI, 2002; FERREIRA, 2005).

## 1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A malária é um grave problema de saúde pública e mundial, pois cerca 40% da população mundial convivem com o risco de contágio. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam ser a malária, hoje, a doença tropical e parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo, pois a cada ano cerca de 300 a 500 milhões de casos, com aproximadamente um milhão de óbitos ocorrem no mundo, principalmente na África, nas áreas remotas de difícil acesso aos serviços de saúde, sendo que na maioria dos casos as vítimas são crianças com menos de cinco anos de idade (GREENWOOD & MUTABINGWA, 2002; WHO, 2005).

A doença se distribui pelas regiões tropical e sub-tropical do planeta (Figura 1). A maior área de transmissão é a África-Sub-Sahariana onde ocorrem 90% dos casos. É endêmica em 53 países da África, em 21 das Américas, 4 da Europa e 14 na região leste do mediterrâneo e no sudeste Asiático (GREENWOOD & MUTABINGWA, 2002).

Fatores como o surgimento de mutações gênicas provocando resistência do *Plasmodium* as múltiplas drogas e a seleção de cepas do mosquito vetor resistentes ao inseticida, foram os responsáveis pelo aumento do número de casos, dificultando o controle da parasitose (SACHS & MALANEY, 2002).

A partir da década de 70, a implantação de projetos que visavam a integração da Amazônia ao restante do Brasil, promoveram uma grande migração interna no País, provocando alterações ambientais importantes, resultando na presença de grande contingente populacional em áreas malarígenas (BRASIL/MS//SVS/FNS, 2003). A população migrante vivia em condições precárias, o que favorecia a exposição ao vetor que, conseqüentemente, levou a rápida expansão da doença (MOTTA, 1992).





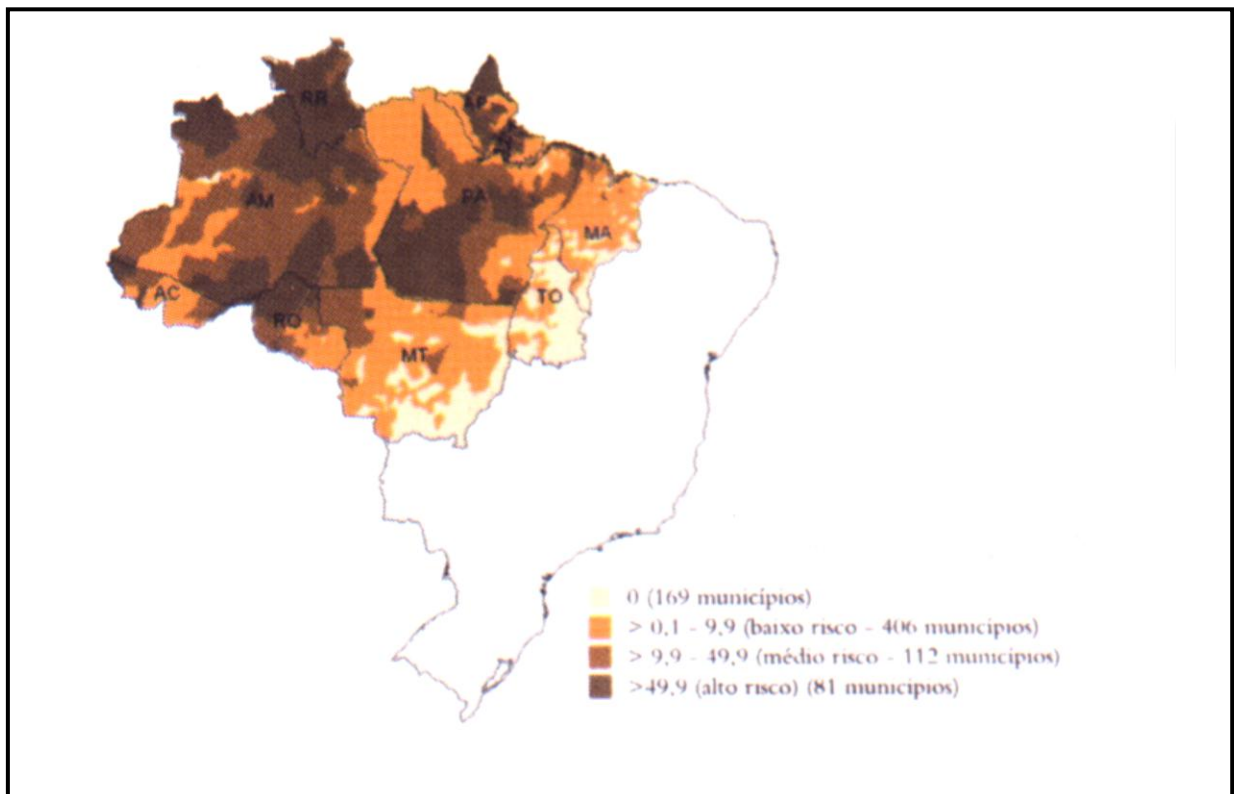
**Figura 1:** Áreas endêmicas de malária ao redor do mundo.

Fonte: CHAART Sensor Evaluation: Malaria. 2005

Atividades como a abertura de grandes rodovias, implantação de garimpos, extrativismo madeireiro, construções de hidrelétricas, instalação de projetos agrícolas, entre outras, provocaram a dispersão da malária pela região Norte e Centro-Oeste, representada pelo aumento dos casos até 1999, com mais de 637 mil relatos, com crescimento de 34% em relação a 1998, contribuindo para a permanência da transmissão nesta região (BRASIL/MS/SVS/FNS, 2003).

No Brasil, a malária se concentra na Amazônia Legal, que compreende os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, os quais contribuem com mais de 99% dos casos registrados no País (Figura 2) os fatores climáticos como a hidrografia abundante, altas temperaturas, umidade do ar elevada e os altos índices pluviométricos associados as grandes áreas de florestas contribuem para a manutenção dos criadouros e a

proliferação dos vetores (Brasil/MS/SVS, 2005). Nas demais regiões, em geral ocorrem casos importados da Amazônia ou de outros países, principalmente fronteiriços (PASSOS & FIALHO, 1998).



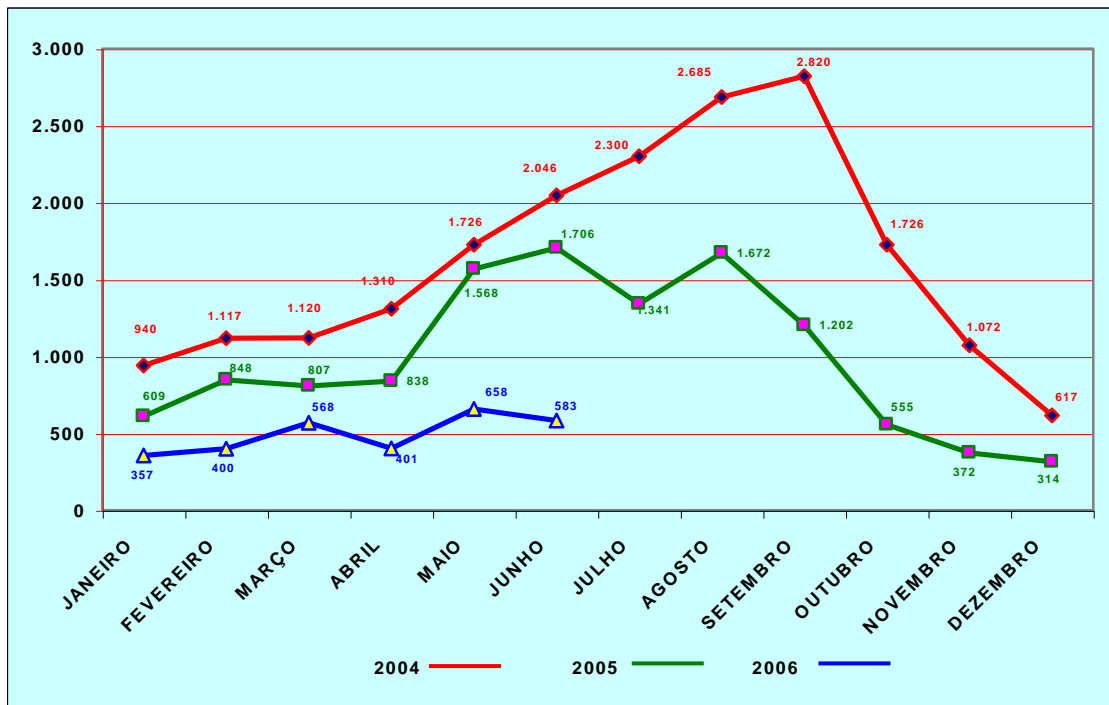
**Figura 2:** Mapa de risco de transmissão da malária, Amazônia Legal, 2005.

Fonte:BRASIL/MS/SVS/SIVEP-Malária.2005.

O Estado do Pará, em 2004, contribuiu com aproximadamente 24 mil ocorrências. No ano de 2005, foram cerca de 30 mil registros, até o julho de 2006 13.226 casos foram notificados (BRASIL/MS/SVS/Sivep, 2006).

A 4ª Regional de Proteção Social que tem como municípios prioritários Augusto Corrêa, Bragança, Viseu e Cachoeira do Piriá, apresentou 20.079 e 11.832

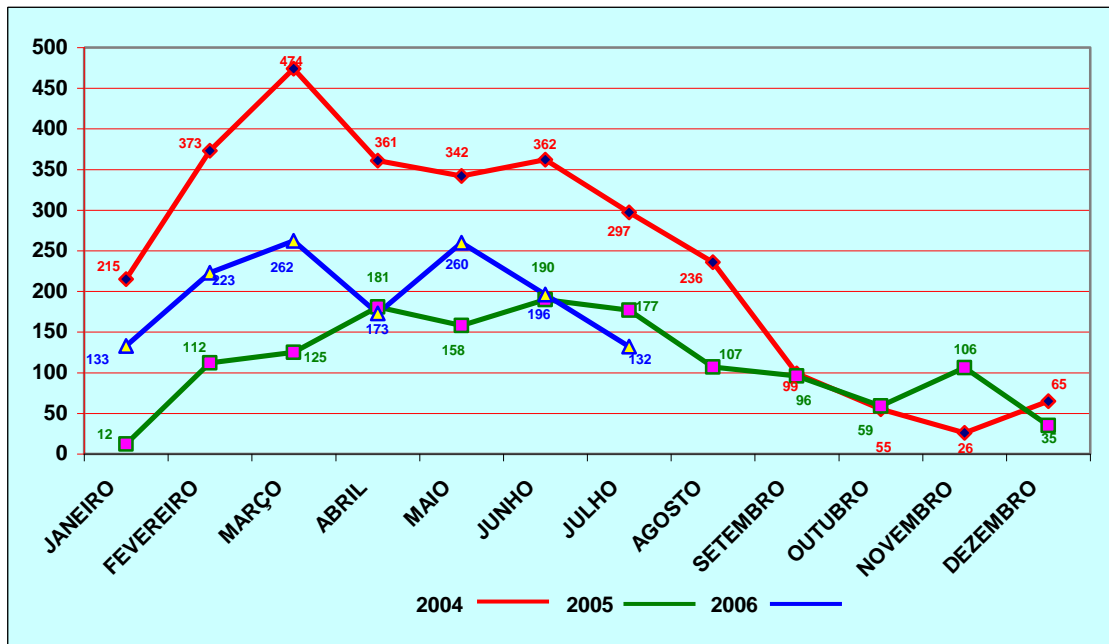
casos de malária nos anos de 2004 e 2005, respectivamente. Até Julho de 2006 já haviam sido registrados 2.967 casos nessa região (BRASIL/MS/SVS/Sivep, 2006).



**Figura 3:** Notificação dos Casos de Malária na 4ª RPS em 2004/2005/2006

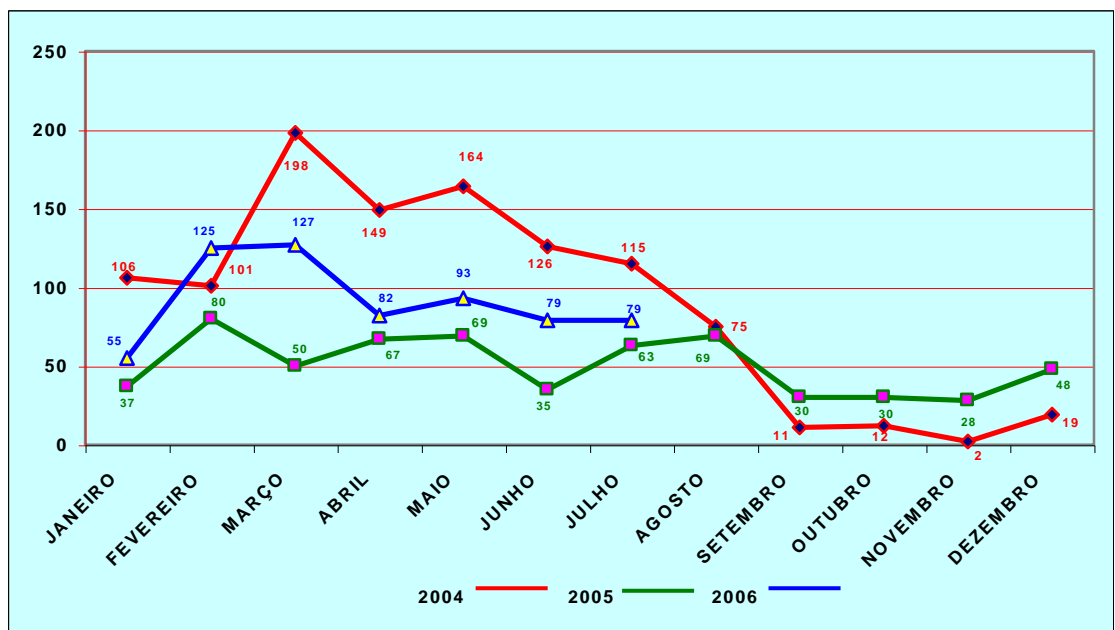
Fonte: Adaptado dos Dados de Laboratório da 4ª RPS

Em 2004, o município de Cachoeira do Piriá registrou 2.905 casos de malária. E no ano de 2005, foram cerca de 1.358 registros, dentre estes 606 foram devido ao *P. falciparum*. Em 2006, ocorreu um aumento no número de casos de malária causada por *P. falciparum* neste município, onde até o mês de julho deste ano foram registrados 640 novos casos (BRASIL/MS/SVS/Sivep, 2006).



**Figura 4:** Notificação dos Casos de Malária no Município de Cachoeira do Piriá/Pará/Brasil em 2004/2005/2006.

Fonte: Adaptado dos Dados de Laboratório da 4ª RPS



**Figura 5:** Notificação dos Casos de Malária por *P. falciparum* em Cachoeira do Piriá/Pará/Brasil em 2004/2005/2006

Fonte: Adaptado dos Dados de Laboratório da 4ª RPS

### 1.3 CICLO BIOLÓGICO DO PLASMODIUM

O ciclo do Plasmodium (Figura 6) ocorre em dois hospedeiros, um intermediário (vertebrado), onde ocorre a reprodução por esquizogonia e o desenvolvimento das formas assexuadas, e o outro definitivo (invertebrado), onde ocorre a reprodução sexuada do tipo esporogonia (SACHS & MALANEY, 2002; MOORE *et al.*, 2002).

Os transmissores da malária humana são insetos conhecidos como “pernilongos”, “carapanãs” e “mosquitos-prego”, da Ordem dos dípteros, da Família *Culicidae*, do gênero *Anopheles* e Subgênero *Nyssorhincus*. No Brasil, o principal vetor é o *Anopheles (N.) darlingi* (Root, 1926), que apresenta distribuição geográfica ampla, possuindo alto grau de antropofilia e endofagia, tendo a capacidade de transmitir diferentes espécies de *Plasmodium*. Os criadouros desta espécie são coleções de águas limpas, quentes, sombreadas e de baixo fluxo, encontrados com muita frequência na Amazônia. Todavia, outras espécies como o *Anopheles aquasalis*, *Anopheles albitarsis s.l.*, *Anopheles cruzi* e *Anopheles bellator*, também exercem importante papel na transmissão da doença (PÓVOA *et al.*, 2000; TADEI & THATCHER, 2000; SESP, 2005).

A fêmea do mosquito ingere os gametócitos (microgametócitos e macrogametócitos) de um indivíduo infectado. Após o rompimento dos eritrócitos, o microgametócito sofre processo de ex-flagelação, originando microgametas, que são móveis e migram até o estômago do mosquito, onde irão fecundar os macrogametas, formando o zigoto ou oocineto, este migra através das células

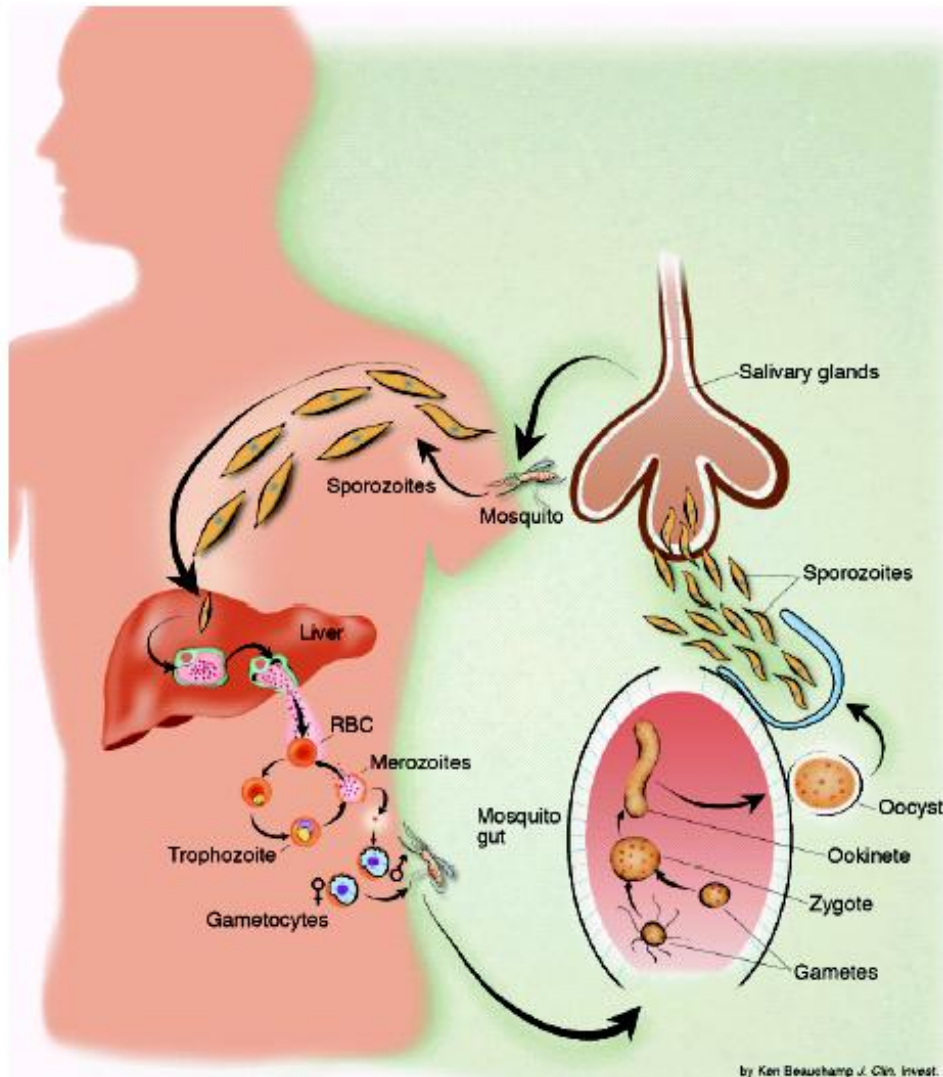
epiteliais do estômago, transformando-se em oocistos, que se fixam a membrana basal do intestino médio, aumentam de tamanho progressivamente produzindo esporozoítos. Com a ruptura do oocisto maduro, os esporozoítos migram, via linfática, para a glândula salivar do *Anopheles*. Este processo ocorre em período de 7 a 18 dias após a infecção, estando assim os mosquitos aptos para infectar um novo indivíduo. (MOORE *et al*, 2002; SOUZA & RILEY, 2002).

As formas infectantes para o homem são os esporozoítos, os quais penetram no organismo quando a fêmea exerce a hematofagia, alcançando os capilares subcutâneos, através da saliva do mosquito infectado. Alguns esporozoítas são destruídos por macrófagos, outros transportados pela circulação sanguínea, penetram no fígado onde se multiplicam assexuadamente (MOTA & RODRIGUEZ, 2001)

No hepatócito, o parasito encontra condições para iniciar a esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais. Após um período de 6 a 15 dias, dependendo da espécie, ocorre a ruptura dos hepatócitos e a liberação de milhares de merozoítas, sendo essa fase denominada pré ou exo-eritrocítica ou tecidual (MOTA & RODRIGUEZ, 2001; MOORE *et al*, 2002).

A fase denominada Eritrocítica inicia-se quando os merozoítas invadem os eritrócitos e se replicam, produzindo trofozoítas. Cada uma desta forma originará cerca de 20 a 30 merozoítas, que após a ruptura do eritrócito continuarão a invadir outros eritrócitos mantendo o ciclo esquizogônico eritrocítico, provocando o aumento

da carga parasitária sanguínea e o aparecimento dos principais sinais e sintomas da infecção (KRETTLI, 1994; MOTA & RODRIGUEZ, 2001).



**Figura 6:** Ciclo evolutivo do Plasmodium

Fonte: WHITE, 2004.

O *P. falciparum* apresenta suas formas jovens (trofozoítos jovens) com tamanho diminuto, contendo um vacúolo e o núcleo proeminente, conhecido com forma de anel, e são menores quando comparados às outras espécies de *Plasmodium* (FERREIRA & ALVARADO, 1991).

Nesta fase, conhecida como esquizogonia eritrocítica, os parasitas metabolizam a hemoglobina dos eritrócitos originando um pigmento escuro denominado hemozoína, o qual irá se depositar em vários órgãos durante a evolução clínica da doença (FERREIRA & ALVARADO, 1991).

Após o início das manifestações clínicas, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos. O crescimento das formas jovens ocorre em órgãos como o baço e a medula óssea. Na malária falciparum estas formas aparecem cerca de 10 dias após as formas assexuadas: o macrogametócito (gametócito feminino) e o microgametócito (gametócito masculino), responsáveis pela transmissão da doença ao hospedeiro definitivo (FERREIRA & ALVARADO, 1991; SOUZA & RILEY, 2002).

#### 1.4 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA FALCIPARUM

As manifestações clínicas mais graves da malária estão comumente associadas com as infecções causadas pelo *P. falciparum* (MENDIS *et al.*, 2001). Esta espécie apresenta duas características importantes, as quais justificam a maior severidade e patogênese da doença em relação a outras que parasitam o homem, quer sejam a capacidade de invadir eritrócitos em todas as fases de maturação, causando parasitemia elevada e seu acentuado crescimento, assim como a facilidade dos eritrócitos infectados aderirem ao endotélio vascular pelo processo de seqüestro (HEDDINI, 2002).

A citoaderência dos eritrócitos infectados ao endotélio e a outros eritrócitos não infectados torna-se possível devido a modificações em sua superfície,



denominadas “knobs”, as quais fornecem uma melhor maturação da atmosfera microaerofílica, permitindo assim que o parasito escape do clareamento realizado pelo baço. (KIRCHGATTER & DEL PORTILLO, 2005).

A adesão ao endotélio tem importante função na patogenicidade da doença, causando obstrução de pequenos vasos dos principais órgãos como: cérebro, fígado, rim e pulmão; devido o fluxo sanguíneo se apresentar comprometido (RIBEIRO & FERREIRA DA CRUZ, 2000, HEDDINI, 2002; KIRCHGATTER & DEL PORTILLO, 2005).

Vários estudos proporcionaram um melhor entendimento da participação das citocinas na resposta imune, com isso, a patogenia da malária passou a ser considerada como resultado da produção de citocinas pro - inflamatórias (Fator de Necrose Tumoral-TNF, Interleucinas-IL, Linfotoxinas-LT e Interferon-IFN- $\gamma$ ) ativadas pelo parasito ou por toxinas liberadas durante a ruptura dos esquizontes, as quais seriam responsáveis pelo ataque paroxístico característico da doença (CLARK *et al*, 1997; RIBEIRO & FERREIRA DA CRUZ, 2000).

O quadro clínico é variável, dependendo da espécie de *Plasmodium* e do grau de imunidade do hospedeiro. Geralmente nos primeiros 15 dias da infecção, o indivíduo é assintomático, configurando o período chamado de pré-patente. A seguir, o hospedeiro começa a manifestar episódios febris, acompanhados de calafrios, sudorese e cefaléia, os quais se apresentam irregulares ou contínuos, passando a ocorrer de forma cíclica ao final da primeira semana (GOMES *et al*, 2001).

Outras manifestações são náuseas, vômitos, astenia, mialgia, fadiga, diarreia, tosse, artralgia e dor abdominal. A doença evolui com anemia, icterícia e hepatoesplenomegalia (GOMES *et al*, 2001).

A febre é o sinal mais freqüente e está relacionada à produção de IL-1 e IL-6, às quais são atribuídos os papéis de citocinas pirogênicas (CLARK & SCHOFIELD, 2000), geralmente ela se apresenta intermitente, com intervalos de 36 a 48 horas na malária por *P. falciparum* (SOUZA *et al*, 1997).

A anemia é uma das manifestações mais freqüentes, apresentando grau variado. Pode ser decorrente da destruição dos eritrócitos durante a esquizogonia intra-eritrocitária, redução da eritropoese e da fagocitose dos eritrócitos não parasitados. Entretanto, o grau de hemólise não se correlaciona com a parasitemia, indicando que a patogênese é multifatorial (CLARK *et al.*, 1997; RIBEIRO & FERREIRA DA CRUZ, 2000).

## 1.5 TRATAMENTO

O tratamento da malária depende da identificação da espécie de *Plasmodium* causadora da infecção, pois, até o momento, não há nenhuma terapia efetiva contra as duas espécies de maior prevalência no Brasil (*P. vivax* e *P. falciparum*). A expansão da resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos e a ausência de uma vacina antimalárica, tornam o controle da doença dependente, quase exclusivamente, da quimioterapia e do controle de vetores (MELO, 2004).

A multi-resistência de algumas cepas de *P. falciparum* torna-se importante obstáculo às políticas de tratamento e controle da malária, impondo a necessidade de estudos contínuos da suscetibilidade do *Plasmodium* às drogas antimaláricas, como fonte de subsídios rápidos e regulares ao monitoramento da quimiorresistência (MELO, 2004).

No Brasil, o tratamento das infecções pelo *P. falciparum* segue dois esquemas terapêuticos, preconizado pelo Ministério da Saúde/ FNS, sendo que a primeira escolha emprega a quinina isolado (Tabela I) ou associado a antibióticos (Doxiciclina e Primaquina), seguindo o esquema da Tabela II, já o de segunda escolha utiliza a mefloquina em dose única (BRASIL/MS/FNS/CENEPI, 2001).

**Tabela I:** Esquema terapêutico utilizado no tratamento da Malária causada por *Plasmodium falciparum* com quinina em 7 dias.

GRUPOS ETÁRIOS	DROGA E DOSE
	Quinina Comprimidos 500mg e dose diária – 8/8hs.
Menor de 6 meses	$\frac{1}{4}$
6 a 11 meses	$\frac{1}{2}$
1 a 2 anos	$\frac{3}{4}$
3 a 6 anos	1
7 a 11 anos	1 e $\frac{1}{2}$
12 a 14 anos	2
15 ou mais anos	3

Fonte: Adaptado de BRASIL/MS/FNS/CENEPI, 2001.

**Tabela II:** Esquema terapêutico utilizado no tratamento da Malária causada por *Plasmodium falciparum* com quinina e associações.

GRUPOS ETÁRIOS	DROGAS E DOSES			
	1º, 2º e 3º Dias		4º e 5º Dias	6º Dia
	Quinina comprimido (500mg)	Doxiciclina comprimido (100mg)	Doxiciclina comprimido (100mg)	Primaquina comprimido (15mg)
8 a 11 anos	1 e ½	1	1	1
12 a 14 anos	2 e ½	1 e ½	1 e ½	2
15 ou mais anos	4	2	2	3

Fonte: Adaptado de BRASIL/MS/FNS/CENEPI, 2001.

## 1.6 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA QUININA

A quinina é o principal alcalóide extraído das cascas do caule, ramos e raízes das árvores de diversas espécies de *Cinchona*. Pertencente à família das Rubiáceas, esta planta é conhecida vulgarmente como quina ou quineira, sendo nativa de certas regiões da América do Sul e também cultivada em vários países do Mundo. Dentre os alcalóides isolados da casca da *Cinchona* destacam-se dois pares de diastereoisômeros: a Quinina, Quinidina, a Cinchonina e a Cinchonidina (FERREIRA, 1994).

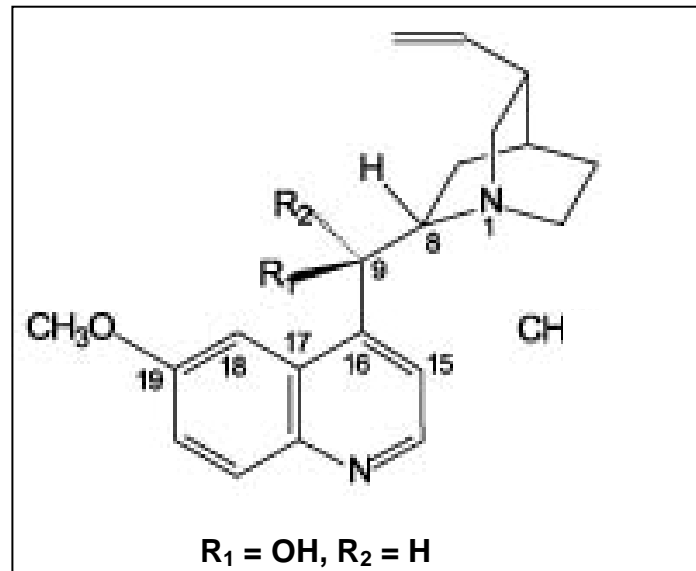
A denominação Cinchona foi escolhida por Lineu para designar as espécies da árvore produtora da casca, cujas propriedades antimaláricas já eram conhecidas pelos povos Incas, que a denominaram de *kinia*, que significa “casca, cortiça”. Os padres jesuítas (1864) introduziram a Cinchona na Europa, onde passou a ser designada como “casca dos jesuítas”. Somente em 1977, a droga foi incluída em uma edição da London Pharmacopeia como “Cortex Peruanus” (WERNSDORFER, 1987).

Em 1820, os químicos franceses Pierre Pelletier e Joseph Caventou reconheceram suas propriedades básicas, após terem isolado a quinina da casca da Cinchona (WERNSDORFER, 1987). Nos anos 40 a quinina foi sintetizada pela primeira vez em laboratório (WENSNDORFER & MCGREGOR, 1988).

A quinina é fortemente levógira, possui fórmula molecular  $C_{20}H_{24}N_2O_2$ , e peso molecular de 324,42. Apresenta-se sob a forma de pó branco inodoro e de sabor amargo, com ponto de fusão entre 173 e 175°C, pka de 5,07 a 20°C e registro CAS [130-95-0]. Encontra-se sob a forma de base livre ou formando diversos sais, entre os quais destacam-se os sulfatos –  $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$  com 82,6% de base livre (MARTINDALE, 2002). É pouco solúvel em água e muito solúvel em álcool, éter, clorofórmio. Pode ser caracterizada mediante a reação com ácido sulfúrico diluído, onde apresenta intensa fluorescência azul (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002; MERCK, 2005).

A quinina apresenta em sua estrutura química um anel quinolínico bi-conjugado heterocíclico ligado a um anel quinuclidínico alifático bi-heterocíclico

ligado por um carbono alcoólico C9, o qual constitui um dos quatro centros quirais da molécula, conforme Figura 7 (WARHURST *et al.*, 2003).



**Figura 7:** Estrutura química da Quinina.

Fonte: Adaptado de KARLE E KARLE, 2002.

### 1.6.1 Farmacocinética

As principais vias de administração da quinina são a oral e a intravenosa, sendo a gravidade do quadro clínico o fator determinante para a escolha da melhor via (WHITE, 1987; SOWUNMI, 1996).

A absorção pela via oral, escolhida para pacientes com malária não grave, ocorre por difusão simples, principalmente na porção superior do intestino delgado, com biodisponibilidade superior a 90%. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em torno de 4 horas, atingindo o equilíbrio das concentrações terapêuticas em torno de 24 a 72 horas (SUPANARANOND, 1991; WANWIMOLRUK, 1991; KRISHNA, 1996; SOWUNMI, 1996).

Hall *et al.* (1985) demonstraram que a absorção da quinina por via oral pode sofrer interferência de vários fatores como: a formulação farmacêutica usada, vômitos, presença de helmintos, etc, refletindo nas flutuações da eficácia dos esquemas terapêuticos implantados em certas populações, porém a biodisponibilidade da droga permanece satisfatória.

A biodisponibilidade da quinina após administração via intramuscular e via intravenosa é semelhante. Após administração intravenosa, o quimioterápico difunde-se para os órgãos de maior perfusão, como o coração, pulmões e cérebro (WALLER, 1990; SCHAPIRA *et al.*, 1993).

A quinina liga-se às proteínas plasmáticas em proporções variáveis, mais de 90% em pacientes com malária grave, grávidas e crianças, aproximadamente 85 a 90% em pacientes com malária não complicada (WHITE, 1985) e em torno de 70 a 80% em indivíduos sadios (SUPANARANOND, 1991).

Esse quimioterápico liga-se tanto a albumina quanto a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, pela qual apresenta maior afinidade. Na malária por *P. falciparum*, as concentrações de  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida apresentam níveis aumentados, relacionados com a severidade da infecção, permanecendo elevados até 3 meses após a recuperação do paciente (SILAMUT *et al.*, 1985, MANSOR *et al.*, 1991).

O quimioterápico atravessa a barreira hematencefálica e a placentária. É secretado pelo leite materno e também pela saliva, sendo posteriormente reabsorvido pelo trato gastrointestinal (SILAMUT *et al.*, 1985).

A quinina sofre biotransformação principalmente no fígado, pelo sistema citocromo P450, seus anéis quinolínico e quinuclidínico sofrem reações de hidroxilação originando a 2-hidroxiquinina, 3-hidroxiquinina, 2-hidroxiquinolina, 3-hidroxiquinolina, 6-hidroxiquinolina e 10-11epóxido de quinina. O metabólito 3-hidroxiquinina é o principal produto de biotransformação (DESJARDINS *et al.*, 1988). Os seus metabólitos apresentam menor atividade antimalárica que o composto original (WHITE, 1985).

A meia-vida da quinina em indivíduos adultos com malária grave é de aproximadamente 18 horas, em indivíduos com malária não complicada esse tempo reduz para 10 a 12 horas, e em indivíduos sadios é cerca de 16 horas (SUPANARANOND, 1991)

A quinina é excretada principalmente pela urina, 10 a 20% na sua forma inalterada e o restante como produto de biotransformação. Outras vias de interesse são as fezes e a saliva. A eliminação é limitada pela ligação às proteínas plasmáticas (WHITE, 1985; SOWUNMI, 1996).

### **1.6.2 Mecanismo de Ação**

A quinina é um potente esquizotocida, tendo ação sobre todas as formas de *Plasmodium* que parasitam o homem, porém não produz efeito sob a forma exo-eritrocítica inicial do parasito (SUEBSAENG *et al.*, 1986).



Existem na literatura, diversas propostas a respeito do mecanismo de ação antimalárica da quinina, as quais se fundamentam na capacidade do seu acúmulo nos vacúolos ácidos digestivos ou lisossomos secundários do parasita, locais onde ocorre a degradação da hemoglobina, provocando a inibição da formação do pigmento malárico, atuando principalmente no estágio assexuado intra-eritrocítico do *Plasmodium* (STAMBUK *et al.*, 1992; EGAN & MARQUES, 1999; WISER, 2005).

Estudos demonstraram que a quinina acarreta aumento do pH do vacúolo digestivo, acarretando inibição das enzimas proteolíticas (plasmecinas) responsáveis pela degradação da hemoglobina, privando o parasito dos nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento (KROGSTAD & SCHLESINGER, 1986; GINSBURG *et al.*, 1989; GOLDBERG *et al.*, 1990).

Stambuk (1992) sugeriu que a inibição da enzima heme-polimerase, responsável pela polimerização do heme em hemozoína, seja o principal efeito resultante da presença do quimioterápico no vacúolo digestivo.

Estudo realizado por Warhust (1981) observou que a quinina poderia competir com proteínas endógenas na ligação a ferriprotoporfirina IX (Fe(III)PPIX), resultante da degradação da hemoglobina, levando a formação do complexo quinina-ferriprotoporfirina IX, o qual seria tóxico ao parasita, provocando lise das membranas e conseqüente morte do *P. falciparum*.

### 1.6.3 Efeitos Adversos

O Cinchonismo constitui um quadro de reações adversas associado ao uso da quinina tanto em doses terapêuticas quanto tóxicas. O quadro é observado no intervalo de concentrações plasmáticas que varia de 3,5 a 10 µg/mL de quinina. Ressalte-se que concentrações plasmáticas semelhantes, são alcançadas com os esquemas terapêuticos utilizados no tratamento da malária falciparum não grave (DESJARDINS *et al.*,1988).

Drewitt *et al.* (1993) observaram que a ingestão diária de 80 mg de quinina, por indivíduos sadios, não acarreta nenhum efeito adverso, porém o consumo de 120 mg por dia deste quimioterápico é capaz de provocar alterações oculomotoras.

As principais manifestações são relacionadas a audição, a visão, o trato gastrintestinal, o urinário, o sistema nervoso, o cardiovascular e o hematológico (DESJARDINS *et al.*,1988).

Karlsson *et al.* (1990) relataram que concentrações plasmáticas de quinina superiores a 6,4µg/mL são capazes de provocar efeitos tóxicos auditivos tais como zumbido e surdez, devido a ação direta do fármaco sobre as propriedades micromecânicas das células ciliadas externas do ouvido interno.

Os efeitos tóxicos visuais são resultantes da ação da quinina sobre as células fotorreceptoras e ganglionares da retina. As manifestações aparecem cerca

de 3 a 24 horas após a ingestão da droga, quando as concentrações plasmáticas alcançam níveis superiores a 10µg/mL. Geralmente são reversíveis e apresentam as seguintes características: visão turva, fotofobia, cegueira noturna, alterações na percepção das cores, redução do campo visual até cegueira total (BOLAND *et al.*, 1985).

Os sintomas gastrintestinais também são proeminentes no Cinchonismo, caracterizados por náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia resultante da ação local da quinina. Alguns sinais e sintomas urinários como dificuldades de micção, albuminúria, anúria e uremia também são observadas (WHO, 1973).

Em grau mais grave de intoxicação são observados alterações do sistema nervoso central, particularmente cefaléia, excitação, confusão mental e delírios. Os efeitos tóxicos cardiovasculares são considerados os mais sérios, caracterizados por hipotensão ortostática, taquicardia ventricular até o óbito por parada cardíaca (WHO, 1973).

A quinina, mesmo em concentrações plasmáticas terapêuticas, é capaz de desencadear reações alérgicas, principalmente de natureza hematológica como: trombocitopenia, neutropenia, hemólise, coagulação intravascular disseminada, etc. Outras reações também são observadas como hepatite granulomatosa, febre hemoglobinúrica, broncoespasmo e dermatite fotossensível (BARR *et al.*, 1990; SPEARING *et al.*, 1990).

## 1.7 JUSTIFICATIVA

O aumento mundial da incidência da malária e a possibilidade de resistência das diversas espécies de *Plasmodium*, particularmente o *P.falciparum*, aliados à redução dos investimentos financeiros na síntese de novos quimioterápicos e as dificuldades para produção de vacinas eficazes, constituem um desafio à terapêutica antimalárica. Uma grande parte da produção científica atual destina-se a monitoração das concentrações plasmáticas e séricas dos diversos antimaláricos disponíveis atualmente, visando alcançar o efeito terapêutico em curto período de tempo e evitar os riscos de toxicidade.

A quimioterapia deverá permanecer, por muito tempo, como importante instrumento no controle desta doença, para isso é fundamental monitorar as concentrações séricas e eritrocitárias destes medicamentos em diversos grupos populacionais com características próprias de exposição.

## 1. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as concentrações séricas e eritrocitárias de quinina em pacientes com malária *falciparum* não complicada.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar e comparar os níveis séricos e eritrocitários de quinina em indivíduos adultos com malária *falciparum*;
  
- Correlacionar e comparar os níveis séricos e eritrocitários de quinina em crianças com malária *falciparum*;
  
- Comparar os coeficientes de correlação entre as concentrações séricas e eritrocitárias nos grupos estudados.

## 2. METODOLOGIA

### 3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Cachoeira do Piriá, com área territorial de 2.418,28 Km<sup>2</sup>, localizado ao nordeste do Estado do Pará, micro-região Guamá, com população total de 18.353 habitantes. O Município possui 2 Centros de Saúde e conta com o apoio da equipe da 4<sup>a</sup> Regional de Proteção Social no combate a malária.

### 3.2 CASUÍSTICA

Para a realização deste estudo foram selecionados 18 indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 05 a 63 anos, residentes e domiciliados no município de Cachoeira do Piriá e seus arredores, com exame de gota espessa positivo para pesquisa de *P. falciparum*, nos quais ainda não havia sido instituída a terapêutica. As amostras foram coletadas durante atendimento ambulatorial, com acompanhamento da equipe da 4ª Regional de Proteção Social.

### 3.3 FATORES DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os pacientes com doença crônica ou infecciosa concomitante, com malária mista ou grave, aqueles que apresentaram ocorrência de reações adversas aos medicamentos do esquema terapêutico, gestante e os pacientes que discordaram em participar do estudo e não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A).

### 3.4 ESQUEMA TERAPÊUTICO

O esquema terapêutico utilizado foi o preconizado pela Fundação Nacional de Saúde para o tratamento da malária por *P. falciparum* não grave, que consiste da administração de: 30mg/Kg/dia de sulfato de quinina, durante 3 dias, associado a uma dose diária de 3,3mg/Kg de doxiciclina, divididas em 2 doses a cada 12 horas, mais 0,75mg/Kg de peso de primaquina administrada em dose única no 6º dia do

tratamento para indivíduos maiores de 8 anos (Tabela II). Para menores de 8 anos e maiores de 6 meses foi utilizado o esquema descrito na Tabela I.

### 3.5 AMOSTRAS

Foram coletados 4mL de sangue venoso, em tubo de vidro, de cada paciente participante do estudo. As amostras foram coletadas no terceiro dia (D3) do tratamento, isto é, após o estabelecimento do estado de equilíbrio entre a fração absorvida e a excretada, sendo obtida cerca de 2 horas após ingestão do quimioterápico. Para a separação do soro e do concentrado de eritrócitos submeteu-se a amostra a centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. As amostras foram mantidas sob refrigeração e posteriormente transferidas para Belém, sendo analisadas no Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Pará – UFPA. O tempo decorrido entre a coleta das amostras e a análise foi inferior a 15 dias.

O método descrito por Dua (1993) modificado por Vieira (1998) foi utilizado para a determinação do quimioterápico, empregando-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) em fase reversa, que consiste na separação de uma mistura, distribuída em duas fases, na qual uma permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Os componentes da amostra são retidos na fase estacionária ou então arrastados pela fase móvel, conforme a afinidade por uma das fases (COLLINS *et al.*, 1995).

## 3.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

### 3.6.1 Aparelhos e Equipamentos

- Cromatógrafo VARIAN® para CLAE composto de módulo de bombeamento isocrático ProStar 300, injetor manual Reodyne com loop de 20µL, detector duplo canal Ultravioleta e Visível ProStar 220 com monitoramento e aquisição de dados simultaneamente em software Star Chromatography Workstation® para processamento de dados, desenvolvimento de métodos, gerenciamento e controle cromatográficos.
- Coluna: Symmetricshield – VARIAN®, RP 18 com µm e 250 x 4,6 mm.
- Ultra-som: Q-335D - Quimis®
- Centrifuga: 2K15 – Sigma Laborzentrifugen®
- Vórtex : Q- 220B1 - Quimis®
- Peagâmetro digital: PHS-EB - Phtek®
- Balança digital VL-1mg - Acculab®
- Pipetas automáticas: 200, 1000 e 2000 µL (Socorex®)
- Reagentes: Acetonitrila (Vetec®), Ácido fosfórico (Merck®), Diclorometano (Vetec®), Hidróxido de sódio (Vetec®), Quinina (Sigma®), Quinidina (Sigma®) Trietilamina (Merck ®).
- Vidrarias comuns de laboratório.



### 3.6.2 Condições Cromatográficas

- ✓ **Fase Móvel:** Acetonitrila a 14%(Vetec®) em Trietilamina 0,01M (Merck ®) com pH ajustado a 2,6 com ácido fosfórico a 50% (Merck®) filtrada e desgaseificada por ultra-som por 10 minutos.
- ✓ **Padrões de Referência:** Quinina e Quinidina (Sigma®)
- ✓ **Fluxo:** 1,2 mL/min
- ✓ **Comprimento de Onda ( $\lambda$ ):** 250 nm
- ✓ **Tempo do Cromatograma:** 13 minutos

### 3.6.3 Extração de Quinina do Soro

Para a extração de quinina do soro, foram utilizados tubos do tipo eppendorff® contendo 300  $\mu$ L de soro, 40  $\mu$ L de solução de Quinidina e 40 $\mu$ L de solução de Hidróxido de sódio 0,1M. A mistura foi submetida a agitação em vórtex por 30 segundos, posteriormente foi acrescentado 1,5 mL de Diclorometano, seguindo-se uma nova agitação em vórtex com duração de 30 segundos. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm, por 10 minutos a 10°C. Retirou-se a camada orgânica e posteriormente submeteu-a a evaporação a temperatura ambiente até resíduo. O resíduo foi reconstituído com 100 $\mu$ L de Fase Móvel e submetido a agitação em vórtex por 10 segundos. Por fim, carregou-se com 50 $\mu$ L da amostra o cromatógrafo.

### **3.6.4 Curva de Calibração da Quinina**

Para a elaboração da curva de calibração foi utilizado soro branco de referência, obtido a partir de diversas amostras oriundas do Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Pará, coletadas de pacientes que relataram não estar fazendo uso de qualquer medicamento.

A curva de calibração de quinina foi elaborada a partir da diluição da solução padrão de quinina (135  $\mu\text{L}/100\text{mL}$ ), em concentrações de 0,336; 0,672; 1,008; 1,68; 3,37 $\mu\text{L}/\text{mL}$ , submetidas a determinação do antimalárico conforme procedimento descrito em 3.6.3 e Figura 9. Posteriormente foi efetuada a análise de regressão linear para obtenção da equação da reta e do coeficiente de correlação.

### **3.6.5 Extração de Quinina do Concentrado de Eritrócitos**

Para extração de quinina do concentrado de eritrócitos, foram utilizados tubos do tipo eppendorff® contendo 300  $\mu\text{L}$  do concentrado hemolisado com Triton, 40  $\mu\text{L}$  de solução de Quinidina e 40 $\mu\text{L}$  de solução de Hidróxido de sódio 0,1M. A mistura foi submetida a agitação em vórtex por 30 segundos, posteriormente foi acrescentado 1,5 mL de Diclorometano, seguindo-se uma nova agitação em vórtex com duração de 30 segundos. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm, por 10 minutos a 10°C. Retirou-se a camada orgânica e posteriormente submeteu-a a evaporação a temperatura ambiente até resíduo. O resíduo foi reconstituído com 100 $\mu\text{L}$  de Fase Móvel e submetido a agitação em vórtex por 10 segundos. Por fim, carregou-se com 50 $\mu\text{L}$  da amostra o cromatógrafo (FIGURA 8).

### 3.6.6 Determinação da Concentração de Quinina

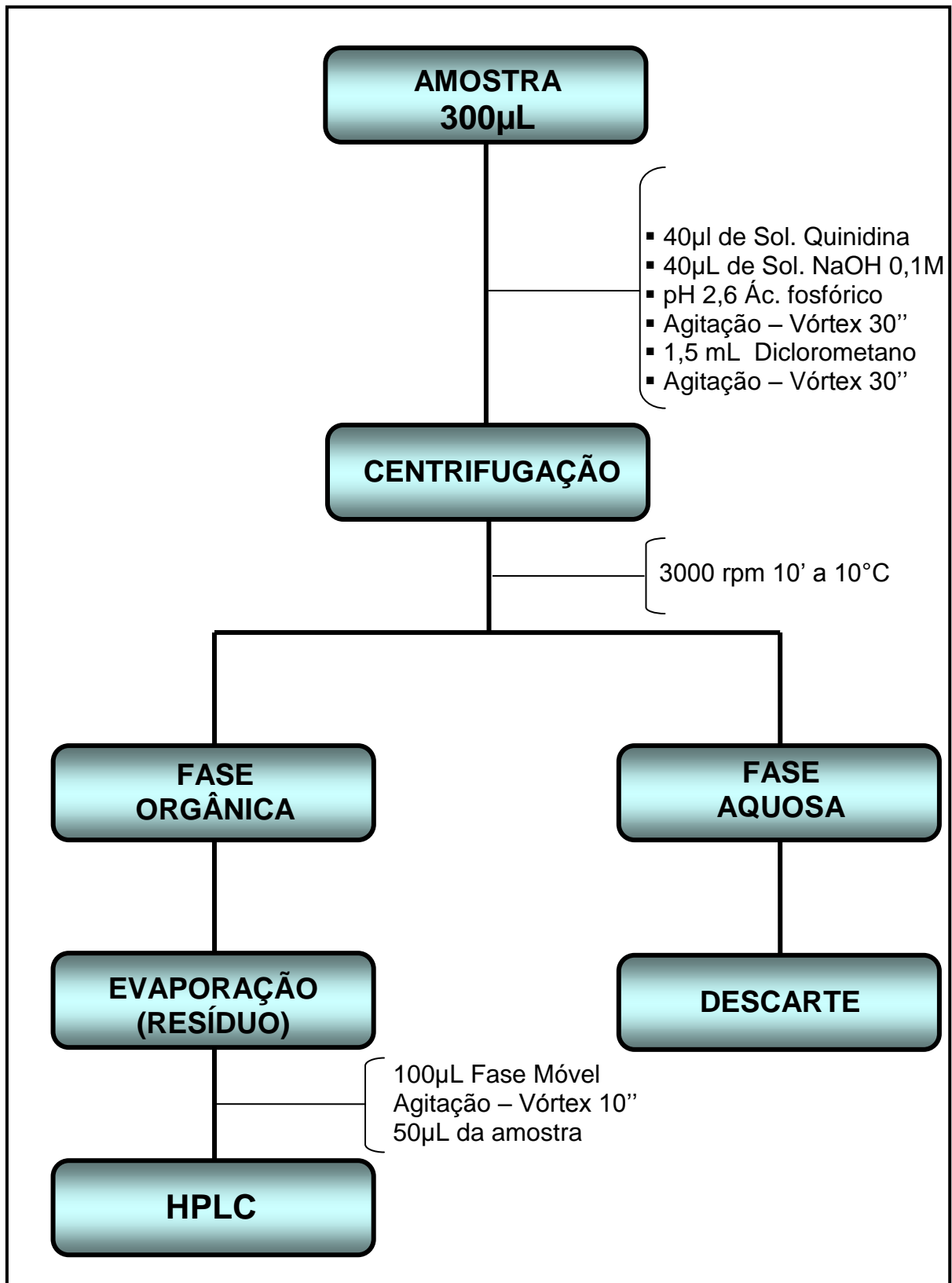
A concentração do antimalárico foi determinada a partir da relação entre a área da amostra e a área do padrão interno. Os valores obtidos foram plotados na equação da curva de calibração e a concentração do quimioterápico foi obtida.

### 3.7 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Considerando-se que as concentrações séricas de quinina possuem distribuição normal na população, foi empregado para comparação dos teores médios de quinina, o Test *t* de Student e para o estabelecimento da correlação entre as concentrações séricas e eritrocitárias do quimioterápico, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (*r*), utilizando os programa BioEstat 4.0 (AYRES *et al.* 2005). O nível de significância aceito foi de 5%.

## 3. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (ANEXO A). Os voluntários participantes do ensaio foram informados na íntegra sobre os objetivos do ensaio, suas precauções, riscos e benefícios e após aceitação, assinaram o consentimento informado para doação do material biológico (ANEXO B). No caso da participação das crianças, o termo foi assinado pelos seus responsáveis.



**Figura 8:** Esquema do Procedimento de Extração de Quinina das Amostras.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

#### 5.1.1 Curva de calibração da quinina

A curva de calibração foi obtida a partir da adição de quinina (135 µg/mL) em soro branco e elaborada a partir de diluições com concentrações finais de 3,37; 1,68; 1,008; 0,672; 0,336 µg/mL. Os tempos de retenção da quinidina (padrão interno) e da quinina foram 8,3 e 9,0 minutos respectivamente e o tempo final do cromatograma foi de 13 minutos.

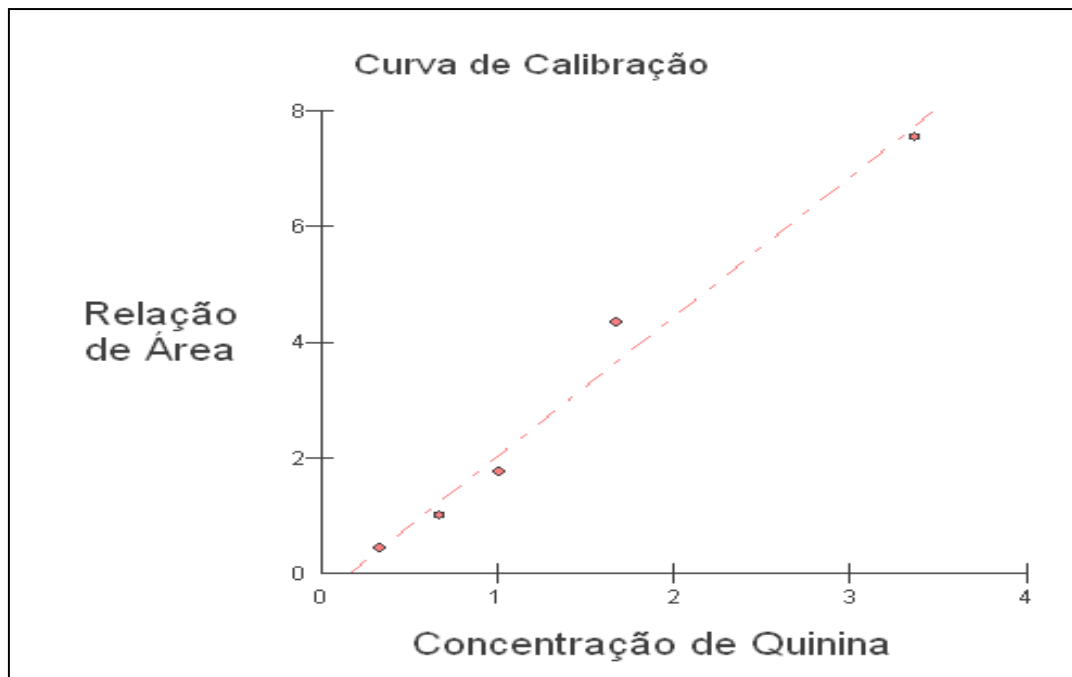
**TABELA III:** Relação entre áreas de quinina e quinidina

Concentração de Quinina ( µg/mL) (x)	n	Relação entre áreas Quinina/Quinidina (y)
3,37	3	7,5413
1,68	3	4,3357
1,008	3	1,7578
0,672	3	1,0095
0,336	3	0,4482

n: Número de determinações realizadas

A Tabela III e a Figura 9 apresentam as diversas concentrações de quinina, indicando que a correlação entre a razão da área de cada pico de quinina e de quinidina (y) e as respectivas concentrações de quinina (x) foi linear no intervalo estudado de 0,336µg/mL a 3,37µg/mL.

A regressão linear da quinina a partir da equação da reta  $y = -0,4007x + 2,4195$  foi plotada usando-se a razão de área de cada pico (y) versus as respectivas concentrações de quinina (x), conforme Figura 10, apresentou coeficiente de correlação (r) igual a 0,9909.



**FIGURA 9:** Representação gráfica da curva de calibração da quinina.

## 5.2 RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE QUININA NAS DIVERSAS AMOSTRAS ANALISADAS.

### 5.2.1 Nas Amostras das Crianças

Os resultados da determinação de quinina em 05 amostras de soro de crianças com malária por *P. falciparum* não grave, obtidos conforme 3.5 e analisados segundo 3.6.3, apresentaram valores de 0,219 µg/mL a 1,595 µg/mL, com concentração média de  $0,723 \pm 0,6$ .

Por outro lado, nas 03 amostras do concentrado de eritrócitos os valores variaram de 0,189 µg/mL a 0,948 µg/mL, com concentração média de  $0,537 \pm 0,88$  µg/mL. Os valores individuais, juntamente com a média, desvio padrão, intervalo de concentração e relação entre as concentrações séricas e eritrocitárias encontram-se descritos na Tabela IV.

Nas amostras 1 e 3 do concentrado de eritrócitos, os teores de quinina ficaram abaixo do limite de quantificação do procedimento analítico padronizado.

O emprego de teste estatístico paramétrico bilateral para comparação dos teores médios de quinina no soro e no concentrado de eritrócitos, não apresentou diferença estatística significativa ( $T= 0,4658$ ,  $p= 0,6578$ ).

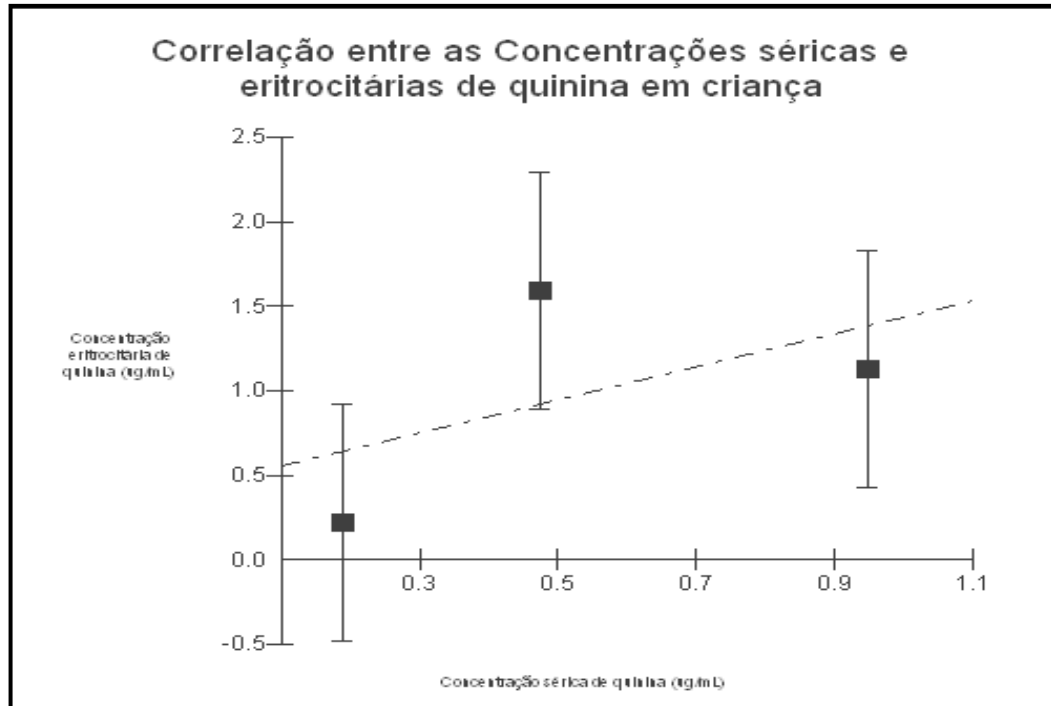
**Tabela IV:** Resultados da determinação de quinina ( $\mu\text{g/mL}$ ), nas amostras de soro e concentrado eritrócitos de crianças com malária *falciparum* não complicada.

Amostra	Idade (Anos)	Concentração de Quinina em $\mu\text{g/mL}$ (soro)	Concentração de Quinina em $\mu\text{g/mL}$ (eritrócitos)	Relação das Concentrações (soro:eritrócito)
01	05	0,438	ND	ND
06	08	0,219	0,189	1.15
09	08	0,234	ND	ND
13	13	1,595	0,474	3.34
15	10	1,129	0,948	1.19
<b>Média / Desvio Padrão</b>	<b>8,8<math>\pm</math>2,9</b>	<b>0,723 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>0,537<math>\pm</math> 0,88</b>	<b>1,89<math>\pm</math> 1,25</b>
<b>Mínimo</b>	<b>05</b>	<b>0,219</b>	<b>0,189</b>	<b>1,15</b>
<b>Máximo</b>	<b>13</b>	<b>1,595</b>	<b>0,948</b>	<b>3,34</b>

ND= Não determinado.

A correlação entre os teores de quinina no soro e nos eritrócitos apresentou coeficiente de Pearson ( $r$ ) igual a 0,5354. A regressão linear apresentou equação da reta igual a  $Y = 0,4562 + 0,9773X$ , com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 28,67%. Na Figura 10 observa-se a correlação entre as concentrações sérica e eritrocitária do quimioterápico em crianças.





**Figura 10:** Correlação entre as concentrações séricas e eritrocitárias de quinina em crianças com malária *falciparum* não complicada.

### 5.2.1 Nas Amostras dos Indivíduos Adultos

Os resultados da determinação das concentrações de quinina em 13 amostras de soro de indivíduos adultos com malária *falciparum* não grave, obtidos conforme 3.6 e analisados segundo 3.6.3 apresentaram valores de 0,219 a 1,595 µg/mL, com concentração média de  $0,723 \pm 0,6$ .

Enquanto nos eritrócitos os valores variaram de 0,189 a 0,948 µg/mL, com concentração média de  $0,537 \pm 0,88$  µg/mL. Os valores individuais, juntamente com a média, desvio padrão, intervalo de concentração e relação entre as concentrações séricas e eritrocitárias encontram-se descritos na Tabela V.

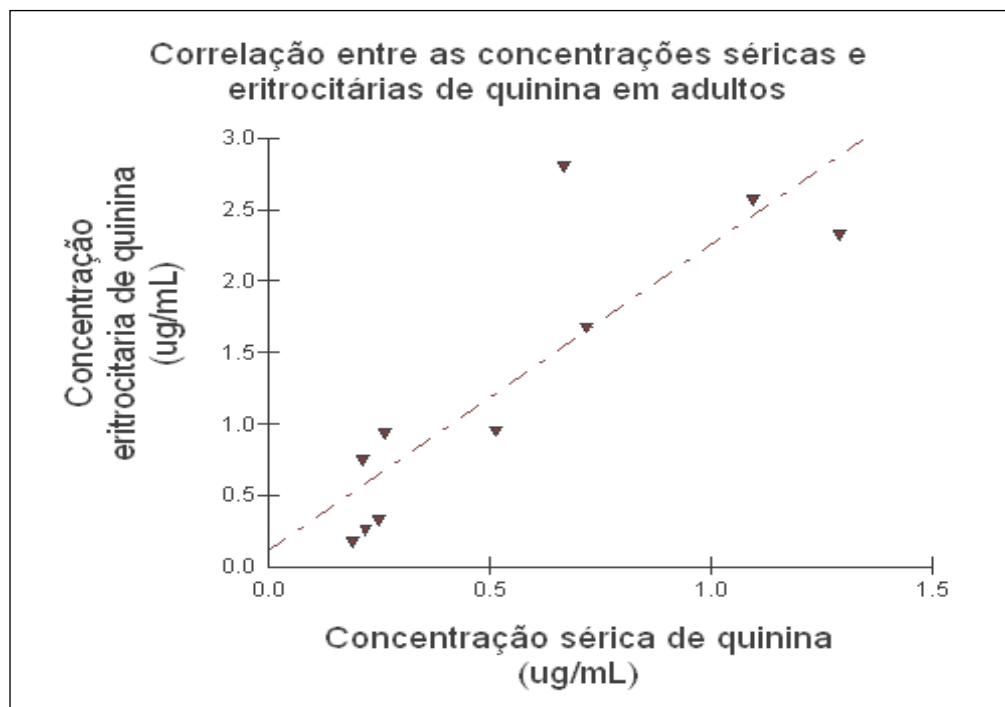
**Tabela V:** Resultados da determinação de quinina ( $\mu\text{g/mL}$ ) em amostras de soro e eritrócitos de indivíduos adultos com malária *falciparum* não complicada.

Amostra	Idade (Anos)	Concentração de Quinina em $\mu\text{g/mL}$ (soro)	Concentração de Quinina em $\mu\text{g/mL}$ (eritrócitos)	Relação das Concentrações (soro:eritrócito)
02	38	0,254	0,219	1.15
03	57	0,278	ND	ND
04	60	0,252	ND	ND
05	29	0,949	0,511	1.85
07	38	0,174	0,190	0,91
08	63	0,747	0,213	3.5
10	19	2,325	1,291	1.8
11	21	0,935	0,262	3.56
12	42	3,305	1,562	2.11
14	25	0,319	0,248	1.28
16	24	1,675	0,718	2.33
17	22	2,796	0,668	4.18
18	20	2,568	1,094	2.34
<b>Média / Desvio Padrão</b>	<b>35,2 <math>\pm</math> 2,9</b>	<b>1,27 <math>\pm</math> 1,12</b>	<b>0,63 <math>\pm</math> 0,48</b>	<b>2,27 <math>\pm</math> 1,06</b>
<b>Mínimo</b>	<b>19</b>	<b>0,174</b>	<b>0,19</b>	<b>0,91</b>
<b>Máximo</b>	<b>63</b>	<b>3,3</b>	<b>1,56</b>	<b>4,18</b>

ND= Não determinado.

O emprego de teste estatístico paramétrico bilateral para comparação dos teores médios de quinina no soro e no concentrado de eritrócitos dos indivíduos adultos com malária *falciparum*, não apresentou diferença estatística significativa ( $T=1,8649$ ,  $p=0,08$ ).

A correlação entre os teores de quinina no soro e nos eritrócitos apresentou coeficiente de Pearson ( $r$ ) igual a 0,8558. A regressão linear apresentou equação da reta igual a  $Y=0,11 + 2,1484X$ , com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 73,24%. Na Figura 11 observa-se a correlação entre as concentrações sérica e eritrocitária de quinina em indivíduos adultos.



**Figura 11:** Correlação entre as concentrações sérica e eritrocitária de quinina em indivíduos adultos com malária *falciparum* não complicada.

Não se observou diferença estatística significativa na comparação das correlações médias de quinina nos indivíduos adultos e nas crianças ( $p=1,23$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A determinação das concentrações dos antimaláricos em diferentes fluídos corporais é importante para propor modificações nos esquemas terapêuticos utilizados, na investigação das reações adversas dose-dependente e suas conseqüências na aderência do paciente à terapia e, fundamentalmente, para caracterização dos casos de resistência (DUA *et al*, 1993).

Portanto, a interpretação das falhas terapêuticas no tratamento da malária falciparum requer o conhecimento das concentrações séricas ou eritrocitárias dos fármacos, uma vez que fatores comportamentais, farmacotécnicos e farmacocinéticos alteram a probabilidade do plasmódio ser exposto a concentrações subterapêuticas do antimalárico, colaborando assim para resistência (WHITE, 2004).

Corroborando tais assertivas em um estudo realizado em um hospital de Nice na França demonstrou que entre abril de 1996 a dezembro de 2000, foram hospitalizados 95 pacientes com malária falciparum, grave e não complicada. Destes, 82% receberam tratamento adequado, o restante apresentou sérias reações adversas ao esquema proposto ou as doses foram ineficazes (DELLAMONICA *et al.*, 2002).

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza o esquema de quinina em três dias consecutivos associada à doxiciclina por cinco dias (1º ao 5º dia) e a primaquina (gametocida) em dose única no sexto dia do tratamento para os casos

de malária por *P. falciparum* não-complicada, tanto pela eficácia do tratamento quanto pela boa tolerabilidade (BRASIL/MS/FNS/CENEPI, 2001).

Neste sentido este trabalho propõe a determinação das concentrações séricas e eritrocitárias de quinina em pacientes, crianças e adultos, com malária falciparum, residentes na cidade de Cachoeira do Piriá no estado do Pará.

Evidências sugerem que a transmissão da doença nesta localidade é associada ao ambiente ocupacional, uma vez que a maioria dos casos registrados na cidade foi de indivíduos do sexo masculino na idade produtiva. Tal fato pode ser perfeitamente evidenciado na idade média dos adultos participantes do estudo, apresentada na Tabela V, sendo considerado rotineiro na região Amazônica, pois o grupo de risco é constituído por agricultores, garimpeiros e construtores de estradas (NORONHA *et al*, 2000), justificando, assim, o reduzido número de amostras de crianças neste estudo.

Some-se a possibilidade dos pacientes deste estudo, terem se infectado pela mesma cepa de *P. falciparum*, uma vez que residiam próximo, e apresentaram a doença no mesmo período.

A utilização de técnicas cromatográficas na determinação das concentrações de fármacos em fluídos biológicos é recomendada nos principais tratados de monitorização terapêutica, sendo o procedimento adotado em todas as comunicações científicas nos últimos vinte anos, pela sua sensibilidade,

especificidade, precisão, limite de quantificação adequado aos objetivos propostos, recuperação e robustez.

A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de quinina em fluidos biológicos possui como grande vantagem a possibilidade de separação do seu principal produto de biotransformação, a 3-hidroxiquinina, o que era inviável nos métodos colorimétricos anteriormente disponíveis. Some-se a possibilidade de utilização de detector ultravioleta universal, de baixo custo e a sensibilidade no intervalo de concentrações plasmáticas obtidas, geralmente, com os esquemas terapêuticos utilizados na determinação deste antimalárico, isto é de 0,3 µg/mL a 10,0 µg/mL.

Os dados da curva de calibração obtida conforme 3.6.4 representada na Tabela III e na Figura 9 indicam que a correlação entre as concentrações de quinina e as respectivas relações das áreas do quimioterápico e do padrão interno foi linear no intervalo de concentrações analisadas (0,336µg/mL a 3,37µg/mL).

O procedimento para a extração de quinina do soro e do concentrado de eritrócitos, empregando-se diclorometano em meio alcalino, foi considerado simples, de rápida execução, apresentando baixo custo operacional e resultados satisfatórios, sendo perfeitamente reproduzido em laboratório especializado.

Os resultados da determinação de quinina nas amostras de soro dos indivíduos adultos com malária *falciparum* constantes na Tabela V, apresentaram valores médios de  $1,27 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$ .

Alguns estudos envolvendo pacientes com malária *falciparum* não complicada, apresentaram teores médios de quinina no plasma de 3,6µg/mL, após três dias de tratamento com doses de 10mg/Kg (SOWUNMI, 1996),  $4,5 \pm 1,1$  µg/mL, após a administração de 10mg/Kg, 3 vezes ao dia durante sete dias (WALKER et al 1998) e  $4,82 \pm 0,48$  µg/mL, após 30mg/ Kg, de 8 em 8 horas, por 7 dias. Já em voluntários sadio, após a administração de 600mg, pela via intravenosa, 3 vezes ao dia as concentrações médias de quinina foram de  $2,0 \pm 0,5$ µg/mL.

Percebe-se que as concentrações obtidas neste estudo se assemelham aquelas dos voluntários sadios, tal fato pode ser creditado aos seguintes fatores: as concentrações séricas de quinina correspondem a cerca de 80% das plasmáticas (DUA et al., 1993), as amostras deste estudo foram coletadas no terceiro dia após a instituição da terapia, isto é, quando o estado de equilíbrio já tinha sido alcançado e a parasitemia clareado (DUA et al., 1993) e por fim as variações raciais.

Ressalta-se que as concentrações terapêuticas efetivas de quinina permanecem incertas, uma vez que os valores medidos em diversos laboratórios variam consideravelmente, o que pode ser creditado tanto aos diferentes esquemas adotados nas diversas áreas endêmicas, quanto às particularidades farmacocinéticas do medicamento.

Portanto, a gravidade da doença interfere significativamente nos parâmetros cinéticos da quinina, como volume de distribuição, ligação às proteínas plasmáticas e clearance total, os quais associados a presença dos parasitas, acarretam flutuações nas concentrações terapêuticas do fármaco no decorrer do

tratamento, inclusive após o estabelecimento do estado de equilíbrio, caracterizando assim, a necessidade da monitoração terapêutica do fármaco (LOOAREESUWAN *et al*, 1990).

Corroborando estas assertivas, estudo realizado por White *et al.*(1991), demonstraram em pacientes adultos tailandeses com malária *falciparum* não complicada que as elevadas concentrações sanguíneas de quinina durante a fase aguda da doença são relacionadas ao aumento da ligação às proteínas plasmáticas, a redução do volume aparente de distribuição e a redução do clearance sistêmico.

No que se refere à ligação às proteínas plasmáticas estudo realizado por Wanwimolruk & Denton (1992) demonstrou que a quinina liga-se preferencialmente a  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida e a albumina, apesar de outras proteínas, como as lipoproteínas possam estar envolvidas neste processo. Os mesmos autores identificaram variações raciais importantes neste parâmetro, através da demonstração de que a fração livre de quinina é menor em voluntários saudáveis caucasianos, quando comparados com os tailandeses. Bem como, no caso da comparação destas raças em indivíduos com malária *falciparum* não complicada, a ligação é maior nos caucasianos, justificado pela maior concentração de  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida nesta raça.

Os teores eritrocitários médios de quinina nos adultos com malária *falciparum* não complicada foram  $0,63 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$ , e a relação média destes com os séricos foi  $2,27 \pm 1,06$ . Tais dados corroboram com estudos realizados por Dua *et al.*



(1993), os quais demonstraram que com o decorrer do tratamento as concentrações eritrocitárias de quinina tendem a reduzir.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silamut *et al.* (1983), ao comparar os teores de quinina em pacientes com malária *falciparum* cerebral e de casos não complicados, no decorrer da fase aguda e cerca de 1 mês após a cura. Os achados demonstraram que a meia vida de eliminação da quinina dos eritrócitos é significativamente menor que a correspondente meia vida plasmática na malária cerebral, tanto na fase aguda quanto na convalescença, esta última dos dois grupos. E a correlação eritrócito: plasma diminui progressivamente do segundo para o sexto dia de tratamento.

Tal fato pode ser creditado ao fato que os quinolinometanóis mais lipofílicos, como a mefloquina e a quinina não são extensivamente concentrados no vacúolo digestivo do parasito, como ocorre com a cloroquina, um fármaco dibásico, que se difunde a favor de um gradiente de concentração chegando a se acumular cerca de 1000 vezes no vacúolo ácido dos parasitas. Especula-se que a quinina, a semelhança da mefloquina se liga às lipoproteínas de alta densidade, sendo posteriormente transferida para o parasita intracelular pela mesma via de entrada de fosfolipídeos endógenos (FOLEY & TILLEY, 1997).

Neste sentido sabe-se que a ação antimalárica dos compostos contendo grupamentos quinolinas depende de vários processos relacionados à membrana do eritrócito, dentre os quais sua composição lipídica, pois estudos *in vitro* com eritrócitos não infectados demonstraram que estes funcionam como importante fonte

de lipídios para as células infectadas, sugerindo uma troca deste componente entre estas células. Bem como uma relação inversa entre o conteúdo de fosfolípidos acídicos e colesterol foi evidenciada. E a resistência a cloroquina ou quinina foi diretamente relacionada ao conteúdo de fosfolípidos acídicos da membrana, enquanto que a mefloquina, outro antimalárico utilizado no tratamento da malária falciparum, apresenta uma relação inversa. Portanto, a modificação na composição fosfolipídica da membrana eritrocitária, poderia ser um dos responsáveis pela flutuação da relação plasma ou soro e hemácias no decorrer do tratamento (SHALMIEV & GINSBURG, 1993).

As maiores contribuições para o conhecimento da infecção malárica em crianças referem-se aos trabalhos realizados em áreas de transmissão intensa do *P. falciparum*, como algumas regiões da África, onde a maioria das crianças é infectada no primeiro ano de vida e considerada importante causa da mortalidade infantil (GREENWOOD *et al.*, 1991). Contudo, pouco é conhecido sobre a farmacocinética e efeitos adversos da quinina neste grupo, particularmente naqueles com malária *falciparum* complicada, embora este represente uma porcentagem substancial dos casos de malária destas regiões.

Some-se a desnutrição, comum nestes países e que segundo estudo realizado por Verdier *et al.* (1999), juntamente com a malária cerebral acarretam modificações significativas na farmacocinética da quinina. Os mesmos autores demonstram que a desnutrição moderada não teria um efeito tão significativo e não potencializaria os efeitos da malária cerebral sobre os parâmetros cinéticos da quinina.

Os resultados da determinação das concentrações séricas de quinina em crianças com malária *falciparum* não complicada apresentaram valores médios de  $0,723 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ . Os dados obtidos neste estudo são representativos do esquema terapêutico adotado no Brasil para o tratamento da malária *falciparum* não grave em crianças. Outros trabalhos na literatura pertinente referem-se à determinação do fármaco em crianças com malária *falciparum* grave, empregando-se vias parenterais de administração.

White *et al.* (1990) demonstraram em 21 crianças africanas com malária *falciparum* severa que após a administração do regime terapêutico padrão, isto é, 20 mg/Kg, seguido por 10mg/Kg de 12 em 12 horas, de hidrocloreto de quinina, as concentrações plasmáticas de pico são  $15,6 \pm 4,5 \mu\text{g/mL}$ .

Estudo realizado por Kager *et al.* (1996), demonstrou que os níveis de  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida não difere entre crianças em tenra idade e as mais idosas, sugerindo que as primeiras são mais suscetíveis aos efeitos adversos do quimioterápico, indicando a necessidade de avaliações posteriores para avaliação dos esquemas terapêuticos atualmente utilizados.

Edstein *et al.* (1985), demonstraram que as concentrações séricas de quinina devem ser monitoradas em crianças pela grande variabilidade individual, comprovando também a biodisponibilidade semelhante entre as vias intranasal e intramuscular para administração do fármaco. O mesmo autor em outro estudo (EDSTEIN *et al.*, 1983) sugeriu que nos casos de malária complicada em crianças prefere-se a via intramuscular, pois o fármaco é rapidamente absorvido, com níveis

séricos significativamente superiores, quando comparados a via oral, bem como é pouco dolorido e sem relatos de necrose muscular.

Merece destaque no tratamento da malária falciparum não complicada em crianças a falta de adesão terapêutica nesta faixa etária, uma vez que está é melhor nos primeiros dias de terapia, recomenda-se o uso de formas farmacêuticas alternativas, como supositórios e xaropes (VERDIER *et al.*, 1996).

O resultado da determinação de quinina nos eritrócitos das crianças apresentou valor médio de  $0,537 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ , e a média da relação soro: eritrócitos foi  $1,89 \pm 1,25 \mu\text{g/mL}$ , conforme dados apresentados na Tabela IV.

Os resultados da determinação de quinina em eritrócitos e a relação entre as concentrações séricas e eritrocitárias de crianças deste estudo são corroborados por Pojjaroen-Anant *et al.* (1991), os quais demonstraram que tal relação declina rapidamente e as evidências sugerem que as concentrações eritrocitárias da droga estão mais intimamente relacionadas com a melhora do paciente que apenas as séricas ou plasmáticas.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que:

- A concentração média de quinina no soro de crianças com malária *falciparum* não complicada foi de  $0,723 \pm 0,6$   $\mu\text{g/mL}$ , e a eritrocitária de  $0,537 \pm 0,38$   $\mu\text{g/mL}$ .
- A concentração média de quinina no soro de indivíduos adultos com malária *falciparum* não complicada foi de  $1,27 \pm 1,12$   $\mu\text{g/mL}$ , e a eritrocitária de  $0,63 \pm 0,48$   $\mu\text{g/mL}$ .
- A relação entre as concentrações sérica e eritrocitária de quinina de crianças com malária *falciparum* não complicada foi de  $1,89 \pm 1,25$ .
- A relação entre as concentrações sérica e eritrocitária de quinina no soro de adultos com malária *falciparum* não complicada foi de  $2,27 \pm 1,06$ .
- A concentração média de quinina no soro de crianças com malária *falciparum* não complicada foi de  $0,723 \pm 0,6$   $\mu\text{g/mL}$ , e a eritrocitária de  $0,537 \pm 0,38$   $\mu\text{g/mL}$ .
- A ausência de diferença estatística significativa entre as médias da relação das concentrações de quinina no soro e eritrócitos dos indivíduos adultos e das crianças, justifica-se pelo fato das alterações observadas na cinética da quinina serem semelhantes em ambos os grupos etários.

## 8. REFERÊNCIAS

AYRES, M., AYRES JR., M. AYRES, D.L., SANTOS, A. S. dos. **BioEstat 4.0 Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas.** Sociedade Civil Mamirauá, 2005.

BARR, E., DOUGLAS, J. F., HILL, C.M. **Recurrent acute hypersensitivity to quinine.** British Medical Journal, London, v. 301, p. 320, 1990.

BOLAND, M.E., ROPER, S.M.B., HENRY, J.A. **Complications of quinine poisoning.** Lancet, London, v.1, n. 8425, p. 384-385, 1985.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Terapêutica da Malária.** Brasília, 102p. 2001.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim epidemiológico da Malária,** Brasília, 2003.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE / SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil,** 2005.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE - Sistema de Vigilância Epidemiológica (Sivep), **Situação Epidemiológica da malária no Estado do Pará,** 2006.

BRUCE-CHWATT, L.J. Historical outline. In: **Essential Malariology**. London: William Heinemann, p.1-9, 1980.

CHAART SENSOR EVALUATION: MALÁRIA Disponível em  
<<http://www.128.102.124.15/sge/health/sensor/diseases/malaria/html>>.

Acesso em 07 Agosto 2005.

CLARK, I.A., AL YAMAN, F.M., JACOBSON, L.S. **The Biological Basis of Malarial Disease**. International Journal of Parasitology, 27: 1237-1249, 1997.

CLARK, I.A., SCHOFIELD, L. **Pathogenesis of Malaria**. Parasitology Today, 16: 451-454, 2000.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 6ª edição. Campinas, Editora UNICAMP. 279p,1995.

DELLAMONICA, P., ROGER, P.M., MARTY, P., PRESTIFILIPPO, L., GARAFFO R., HYVERNAT, H., DUNAIS, B., CHAILLOU, S., DELAUNAY, P., BERNARDIN, G., MATTEI, M., LE FICHOUX, Y. **Consensual treatment of *Plasmodium falciparum* malaria does not lead adequate quinine blood concentrations**. Journal Infectology. Oct;45(3):160-4. 2002.

DESJARDINS, R.E., DOBERSTYN, E.B., WERNSDORFER, W.H. **The treatment and prophylaxis of malaria**. In: WERNSDORFER, W.H.; MCGREGOR, S.I., eds.

Malaria principles and practice of malariology. Edinburgh: Churchill – Livingstone, p. 827-864, 1988.

DREWITT, P.N., BUTTERWORTH, K.R., SPRINGALL, C.D., WALTERS, D.G., KAGLEN, E.M. **Toxicity threshold of quinine hydrochloride following low-level repeated dosing in healthy volunteers.** Food Chemical Toxicology Oxford, v.31, n.4, p. 235-245, 1993.

DUA, V. K., SARIN, R, PRAKASH, A. **Determination of quinine in serum, plasma, red blood cells and whole blood in healthy and *Plasmodium falciparum* malaria cases by high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography, Amsterdam, v. 614, p. 87-93, 1993.

EDSTEIN, M., STACE, J., SHANN, F. **Quantification of quinine in human serum by high-performance liquid chromatography.** J. Chromatogr. Amsterdam, v. 278, p.445-451, 1983.

EDSTEIN, M., STACE, J., SHANN, F. **Pharmacokinetics of quinine in children.** J. Pediatr., Mar;106(3):506-510, 1985.

EGAN, T.J., MARQUES, H.M. **The role of haem in the activity of cloroquine and related antimalarial drugs.** Coordination Chemistry Reviews, 493: 190-192, 1999.



EMBRAPA – Fotos Satélites Municipalidades. Disponível em:

<[http://www.cdbrasil.cnpm.embrapa.br/pa/htm0/pa23\\_53htm](http://www.cdbrasil.cnpm.embrapa.br/pa/htm0/pa23_53htm)> Acesso em: 10 outubro 2006.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA. In: **Quinina**. VII edição oficial, Vol. 1 e 2. Instituto Nacional de Farmácia e do Medicamento, 2002.

FERREIRA, E.I. Antimaláricos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 1207-1216, 1994.

FERREIRA, P. **Glossário de Doenças – Malária/ FIOCRUZ**. Disponível em <http://www.fiocruz.br/ccs/glossario/malaria/htm>. Acesso em 17 julho 2005.

FERREIRA, M.S., ALVARADO, C.A. **Malária** In: **VERONESI, R. – Doenças Infeciosas e parasitárias**. 8ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 763-785, 1991.

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

GINSBURG, H., NISSANI, E., KRUGLIAK, M. **Alkalinization of the food vacuole of malaria parasites by quinoline drugs and alkyamines is not correlated with their antimalarial activity**. Biochemical Pharmacology, Oxford, v. 38, n. 16, p. 2645-2654, 1989.

GOLDBERG, D.E., SLATER, A.F.G., CERAMI, A., HENDERSON, G.B. **Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: An ordered process in a unique organelle.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Washington, v. 87, p. 2931-2935, 1990.

GOMES, A.P., BATISTA, R.S., GONÇALVES, M.L.C., IGREJA, R.P., Malária. In: BATISTA, R.S. et al. (Coord.) **Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias.** Rio de Janeiro: Cultura Médica, v.1, p. 149-166, 2001.

GREENWOOD BM, MARSH K, SNOW EW. **Why do some children develop severe malaria?** *Parasitology Today* 7:277-288,1991.

GREENWOOD, B., MUTABINGWA, T. **Malaria in 2002.** *Nature*, 415: 670-672, 2002.

HALL, A.P., YARDUMINA, A., MATSH, A. **Exchange transfusion and quinine concentrations in falciparum malaria.** *British Medical Journal*, London, v. 291, p. 1169-1170, 1985.

HEDDINI, A. **Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces.** *International Journal of Parasitology*, 32: 1587-1598, 2002.

KAGER, P.A.; VAN HENSBROEK. M.B., KWIATKOWSKI, D., VAN DEN BERG, B., HOEK, F.J., VAN BOXTEL, C. J. **Quinine pharmacokinetics in young children with severe malaria.** Am J Trop Med Hyg. Mar;54(3):237-242,1996.

KARLE, J.M., KARLE, I.L. **Crystal structure of quinine.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46: 1857, 2002

KARLSSON, K.K., HELLGREN, U., ALVÁN, G. ROMBO, L. **Audiometry as a possible indicator of quinine plasma concentration during treatment of malaria.** Transaction of the Royal Society of Medicine and Hygiene, London, v. 84, p. 765-767, 1990.

KIRCHGATTER, K., DEL PORTILLO, H.A. **Clinical and molecular aspects of severe malaria.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, 77:455-475, 2005.

KRETTLI, A.U. **The immune response to malaria sporozoite antigens in animal models and humans: A retrospective overview and present goals.** Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, 46: 446-454, 1994.

KRISHNA, S. WHITE, N.J. **Pharmacokinetics of quinine, cloroquine and amodiaquine – clinical implications.** Clinical Pharmacokinetics, Auckland, v.30, n.4, p. 263-299, 1996.

KROGSTAD, D.J., SCHLESINGER, P.H. **A perspective on antimalarial action: effects of weak bases on *Plasmodium falciparum***. Biochemical Pharmacology. Oxford, v. 35, n. 4, p. 547-552, 1986.

LOOAREESUWAN S, CHAROENPAN P, HO M, WHITE NJ, KARBWANG J, BUNNAG D, HARINASUTA T. **Fatal *Plasmodium falciparum* malaria after an inadequate response to quinine treatment**. Journal Infect. Disease. Mar;161(3):577-80.1990.

MANSOR, S.M., MOLYNEUX, M.E., TAYLOR, T.E., WARD, S.A., WIRIMA, J.J., EDWARDS, G. **Effect of *Plasmodium falciparum* malaria infection on the plasma concentrations of alpha 1- acid glycoprotein and the binding of quinine in Malawian children**. Brazilian Journal Clinic Pharmacology, Oxford, v.32, n.9: p.317-321, 1991.

MARTINDALE – THE COMPLETE DRUG REFERENCE. **In: Quinina, Doxyxyclicina, Mefloquina**. Editor Sweerman, S. C. (ed). Pharmaceutical Press, 33<sup>a</sup> edition, London, 445p, 200p, 438p, 2002.

MELLO, Y. F. C. **Novas abordagens sobre resistência *in vitro* do *P. falciparum* e diagnóstico da malaria**. Revista Paraense de Medicina v.18 (4) out-dez, p.36,2004.

MENDIS, K., SINA, B.J., MARCHESINI, P. CARTER, R. **Neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 64: 97-106,2001.

MERCK, 2005. Disponível em:  
<<http://www.merck.com.br/quimica/tpie/edfr.htm>. > Acesso em 27 julho 2005.

MILLER, L.H., BARUCH, D.I., MARSH, K., DOUMBO, O.K. **The pathogenic basis of malaria.** Nature, 415: 673 – 679, 2002.

MOORE, S.A., SURGEY, E.G.E., CADWGAN, A.M. Malaria Vaccines: where are we and where are we going?. **THE LANCET Infections Diseases**, 2: 737-743, 2002.

MOTA, M.M., RODRIGUEZ, A. **Migration through host cells by apicomplexan parasites.** Microbes and Infection, 3: 1123-1128, 2001.

MOTTA, E.G.F. **Fatores determinantes da situação da malária na Amazônia.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, supl II: 17-30,1992.

NORONHA, E, ALECRIM, M.G., ROMERO, G.A., MACEDO, V. **Resistência à mefloquina do tipo RIII em crianças com malária falciparum em Manaus, AM, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical vol.33 n.2. p 201-205, 2000.

PASSOS, A.D.C., FIALHO, R.R. **Malária: aspectos epidemiológicos e de controle.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 31: 93-105, 1998.

POJJAROEN-ANANT, C., SABCHAREON, A., CHONGSUPHAJASIDDHI, T., ATTANATH, P., SINGHASIVANON, V., ACMOR-APOLINAR, M.M. **Red cell and plasma concentrations of combined quinine-quinidine and quinine in falciparum malaria.** Ann Trop Pediatr. 11(4):315-324, 1991

PÓVOA, M.M., SILVA, A.N.M., SANTOS, C.C.B., SEGURA, M.N.O., MACHADO, R.L.D. **Malaria transmission.** Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, 52: 208-212, 2000.

RIBEIRO, C.T.D. & FERREIRA-DA-CRUZ, M.F. **The new and the old in malaria immunopathology.** Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, 52: 269-281, 2000.

SACHS, J., MALANEY, P. **The economic and social burden of malaria.** Nature, 415: 680-685, 2002.

SCHAPIRA, A.; SOLOMON, T.; JULIEN, M.; MACOME, A.; PARMAR, N.; RUAS, I.; SIMÃO, F.; STREAT, E.; BETSCHAT, B. **Comparison of intramuscular and intravenous quinine for the treatment of severe and complicated malaria in children.** Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 87, n.3, p. 299-302, 1993.

SHALMIEV G & GINSBURG H. **The susceptibility of the malarial parasite *Plasmodium falciparum* to quinoline-containing drugs is correlated to the lipid composition of the infected erythrocyte membranes.** Biochem Pharmacol. Aug 3;46(3):365-74.1993.

SECRETARIA DE SAÚDE PÚBLICA DO PARÁ. **Agravos da saúde.** Disponível em: <http://www.sespa.pa.gov.br/atualiza%C3%A7%C3%A3o/Agravos/agravos-malaria.htm>. Acesso em: 21 de Maio de 2005.

SILAMUT, K., WHITE, N.J., LOOAREESUWAN, S., **Red cell quinine concentrations in falciparum malaria.** Am J Trop Med Hyg. May;32(3):456-460.1983.

SILAMUT, K., WHITE, N.J. LOOAREESUWAN, S. WARRELL, D.A. **Binding of quinine to plasma proteins in falciparum malaria.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 34, n. 4, p. 681-689, 1985.

SOUZA, J.M., D'ALMEIDA COUTO, A.A.R., SILVA, E.B., ABDON, N.P., SILVA, R.S.U. Malária. In: LEÃO, R.N.Q. (Coord.). **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico.** Belém: CEJUP, p. 645-669. 1997.

SOUZA, J.B., RILEY, E.M. **Cerebral Malária: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis.** Microbes and Infection, 4: 291-300, 2002.

SOWUNMI, A. **Disposition of quinine in plasma after a single oral and intramuscular dose in healthy adult Africans.** East Afr Med J. Feb;73(2):111-4, 1996.

SPEARING, R.H.; HICKTON, C.M.; SIZELAND, P.; HANNA, A.; BAILEY, R.R. **Quinine-induced disseminated intravascular coagulation.** Lancet, London, v.336, n. 8730, p. 1535-1538, 1990.

STAMBUK, B. U. **Chloroquine & quinine: how these antimalarial drugs work.** Ciência Cultural São Paulo, v. 44, n. 1, p. 14, 1992.

SUEBSAENG, L. WENSDORFER, W. H., ROONEY, W. **Sensitivity to quinine and mefloquine of *Plasmodium falciparum* in Thailand.** Bulletin of world health organization, 64: 759 – 765, 1986

SUPANARANOND, W., DAVIS, T.M., PUKRITTAYAKAMEES, S., SILAMUT, K. KARBWANG, J., MOLUNTO, P., CHANOND, L. WHITE, N.J. **Disposition of oral quinine in acute falciparum malaria.** European Journal Clinic Pharmacology, Berlin, v.40, n.4: p. 49-52, 1991.

TADEI, W.P., THATCHER, B.D. **Malaria vectors in the Brazilian Amazon: Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 42: 87-94, 2000.



VERDIER, F. BARENNE, H., PUSSARD, E., MAHAMAN SANI, A., CLAVIER, F., KAHATANI, F., GRANIC, G., HENZEL, D., RAVINET, L. **Efficacy and pharmacokinetics of a new intrarectal quinine formulation in children with *Plasmodium falciparum* malaria.** Br. J. Clin. Pharmacol. May;41(5):389-395, 1996.

VERDIER, F. PUSSARD, E., BARENNE, H., DAOUDA, H., CLAVIER, F., SANI, A.M., OSSE, M., GRANIC, G. **Quinine disposition in globally malnourished children with cerebral malaria.** Clin Pharmacol Ther. May;65(5):500-10, 1999.

VIEIRA, J.L.F. **Monitorização das concentrações plasmáticas de quinina em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum*.** Tese (Doutorado em Toxicologia), São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 118p, 1998.

VILLALÓN, J.M. **Overview of Malaria: A first Step to a Cure.** Disponível em: <<http://ecology.cwru.edu/malaria/Malaria%20Tutorial.htm>>. Acesso em 14 novembro 2006.

WALKER, O., BABALOLA, C.P., BOLAJI, O.O., OGUNBONA, F.A., SOWUNMI, A. **Pharmacokinetics of quinine in African patients with acute falciparum malaria.** Pharm World Sci. Jun;20(3):118-122. 1998.

WANWIMOLRUK, S.; CHALCROFT, S.; COVILLE, P.F.; CAMPBELL, A.J. **Pharmacokinetics of quinine in young and elderly subjects.** Transactions of

the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 85, p. 714-717, 1991

WANWIMOLRUK, S.; DENTON, J. R. **Plasma protein binding of quinine: binding to human serum albumin,  $\alpha$ -1 glycoprotein and plasma from patients with malaria.** J. Pharm. Pharmacol., London, v. 44, p. 806 – 811, 1992.

WARHURST, D.C. The **quinine-haemin interaction and its relationship to antimalarial activity.** Biochemistry Pharmacology, Oxford, v.30, n.24, p.3323-3327, 1981.

WARHURST, D.C.; CRAIG, J. C., ADAGU, I. S.; LEE, S. Y. **The relationship of physico-chemical properties and structure to the differential antiplasmodial activity of the cinchona alkaloids.** Malaria journal, 2: 26, 2003.

WERNSDORFER, W.H. **Quinine in health care in the tropics.** Acta Leiden., Dordrecht, v.55, p. 197-208, 1987.

WERNSDORFER, W.H., MCGREGOR, SIR I. In **Malaria Principles and Practice of Malariology.** (eds). Churchill Livingstone, EDINBURGH, 1988.

WHITE, N. J. **Clinical Pharmacokinetics of antimalarial drugs.** Acta Leiden, Dordrecht, v. 55, p. 65-76, 1985.

WHITE, N.J. **The pharmacokinetics of quinine and quinidine in malaria.** Acta Leiden, Dordrecht, v. 55, p. 65-76, 1987.

WHITE, N.J. **Antimalarial drug resistance – Review Series.** The Journal of Clinical Investigation. Disponível em: <<http://www.jci.org>> Volume 113 N. 8 Abril 2004.

WHITE, N. J. SUPANARANOND, W., DAVIS, T.M., PUKRITTAYAKAMEE, S., SILAMUT, K., KARBWANG, J., MOLUNTO, P., CHANOND, L. **Disposition of oral quinine in acute falciparum malaria.** Eur. J. Clin Pharmacol., 40(1): 49-52, 1991.

WHITE, N.J.; WALLER, D.; KRISHNA, S.; CRADDOCK, C.; BREWSTER, D.; JAMMEH, A.; KWIATKOWSKI, D.; KARBWANG, J.; MOLUNTO, P. **Pharmacokinetics properties of intramuscular quinine in Gambian children with severe falciparum malaria.** Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 84, p.488-491, 1990.

WISER, M.F. **Mechanism of Drugs Action and Resistance (Focus on Antimalarials),** 2003. Disponível em : <<http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/drugs.htm#action>>. Acesso em: 26 novembro 2005.

WHO – **Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials.** WHO Scientific Group, Technical Report series n. 529, Geneva, 1973.

WHO. **What is malaria? Roll Back Malaria.** Disponível em: <[http:// www.who.int/](http://www.who.int/)>

Acesso em 22 de Junho de 2005.

## **ANEXOS**

## **ANEXO A**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto: **CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS E ERITROCITÁRIAS DE QUININA NO ESTADO DE EQUILÍBRIO EM PACIENTES COM MALÁRIA POR *PLASMODIUM FALCIPARUM* NÃO COMPLICADA**

A pesquisa da qual você participará tem o objetivo de encontrar que quantidade de quinina tem no sangue de pacientes com malária falciparum e suas implicações na melhora do paciente. Este estudo permitirá melhor compreensão da doença que você apresenta. Além disso, os resultados desta pesquisa poderão ser utilizados para contribuir, se necessário, sobre a necessidade do ajuste de doses no tratamento dessa doença, ou seja, se é preciso aumentar, diminuir ou continuar tomando a mesma quantidade de quinina.

Serão coletados 4 mL de sangue da veia do braço no terceiro dia de seu tratamento. Todo o material utilizado na coleta é descartável. E os resultados obtidos serão armazenados em um banco de dados. Durante este procedimento você não será submetido a nenhum risco. Sua participação neste estudo será sigilosa e, portanto, seu nome não será utilizado em nenhuma etapa desta pesquisa. Você poderá desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento. Além disso, você será esclarecido sobre qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento da sua doença. Se desejar obter mais informações ou esclarecer qualquer dúvida sobre a sua participação, pode entrar em contato com o professor Dr. José Luiz Fernandes Vieira, no Laboratório de Toxicologia do Núcleo de Medicina Tropical - UFPA.

---

**ÉRIKA RODRIGUES GUIMARÃES /CRF: 2296**

Av. Generalissimo Deodoro, 92 FONE: 3241-9864

### **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

NOME:

DATA:

---

ASSINATURA

## ANEXO B

### FICHA EPIDEMIOLÓGICA

Nº da amostra:.....Data:.....

Nome:.....

Sexo: ( ) F ( ) M Idade:..... Local de Nasc:.....

Endereço:.....

Quanto tempo mora neste endereço?.....

Deslocou-se nos últimos 30 dias?.....

Usa alguma proteção individual? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual? .....

Doenças tropicais:

( ) Malária ( ) Leishmaniose ( ) Doença de Chagas ( ) Toxoplasmose

Quantas vezes? ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) mais de 4

Última malária:..... Tipo: .....

Medicamento(s) usado(s) na última malária: .....

Está tomando medicamento? .....

História clínica atual.....

.....

Data da coleta (D3): ...../...../.....