

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

DETERMINAÇÃO DE MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA EM
PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium falciparum* NO ESTADO
DO AMAPÁ.

LARISSA MARIA GUIMARÃES BORGES

BELÉM-PARÁ
2008

LARISSA MARIA GUIMARÃES BORGES

DETERMINAÇÃO DE MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA EM
PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium falciparum* NO ESTADO
DO AMAPÁ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Doenças Tropicais do Núcleo
de Medicina Tropical da Universidade
Federal do Pará como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Doenças
Tropicais com área de concentração em
Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes
Vieira.

Belém-Pará
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Larissa Maria Guimarães Borges

DETERMINAÇÃO DE MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA EM PACIENTES
COM MALÁRIA POR *Plasmodium falciparum* NO ESTADO DO AMAPÁ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais, área de concentração Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira.

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira (Orientador)

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

Profa. Dr. Edna Aoba Yassui Ishikawa

Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa

Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde - UFPA

Profa. Dr. Rosana Maria Feio Libonati

Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

Profa. Dr. Hellen Thais Fuzii

Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

DEDICATÓRIA

A Deus que é a fonte de toda sabedoria.

Aos meus pais Francisco e Célia, pelos valiosos princípios que nortearam minha vida e aos meus irmãos Marina, Francisco Neto e Alícia pelo apoio e dedicação em todos os momentos.

A Val por todos os cuidados e proteção durante todos os anos da minha vida.

AGRADECIMENTO

A Deus, sem o qual seria impossível nossas realizações e vitórias;

A Universidade Federal do Pará e ao Núcleo de Medicina Tropical, pela oportunidade de aprendizado;

Ao prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira, pela oportunidade, orientação e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico e intelectual.

A meus pais e familiares que com paciência e carinho, foram meu porto seguro em todos os momentos de minha caminhada científica;

As amigas do Laboratório de Toxicologia (LATOX), Margareth, Daniella, Tânia, Glaécia e Kariane, pela colaboração e momentos proporcionados durante a realização deste trabalho.

A Margarete Gomes pela atenção e auxílio na obtenção das amostras e informações dos pacientes.

A todas as pessoas que colaboraram com a realização e conclusão desta dissertação.

“O futuro do homem não está nas estrelas, mas sim na sua vontade.”

Willian Shakespeare

RESUMO

A determinação das concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina (MQ) e carboximefloquina (CMQ) foram estudadas em crianças e adultos com malária por *Plasmodium falciparum* não complicada no estado do Amapá. Os pacientes adultos receberam esquema oral de MQ 20 mg/kg dividido em dois dias e artesunato 4 mg/kg/dia durante três dias. Para as crianças a dose de MQ seguiu o esquema preconizado pelo manual de terapêutica da malária. As concentrações eritrocitárias de MQ e CMQ foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência no terceiro dia de tratamento (D3) e os teores plasmáticos foram mensurados no terceiro e quadragésimo segundo dia após a instituição da terapia (D3 e D42). A concentração média de MQ e CMQ no plasma de crianças em D3 foram $1,84 \pm 0,83 \mu\text{g/mL}$ e $1,44 \pm 0,70 \mu\text{g/mL}$, e a eritrocitária $5,26 \pm 1,46 \mu\text{g/mL}$ e $1,18 \pm 0,65 \mu\text{g/mL}$. Em D42 as concentrações plasmáticas foram $0,45 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ e $0,51 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A relação entre as concentrações eritrocitárias e plasmáticas de MQ e CMQ foram $2,86 \pm 1,27$ e $0,75 \pm 0,26$. Nos indivíduos adultos, as concentrações de MQ e CMQ no plasma foram $2,43 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$ e $1,10 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$, e as eritrocitárias $5,51 \pm 1,92 \mu\text{g/mL}$ e $1,08 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A concentração plasmática em D42 foram $0,54 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ e $0,58 \pm 0,93 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A relação hemácia:plasma para MQ foi $3,03 \pm 1,56$ e para CMQ $1,12 \pm 0,29$. O coeficiente de correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de MQ nas crianças foi 0,035 e nos adultos 0,0436. Para CMQ o coeficiente de correlação foi 0,8722 nas crianças e 0,5155 nos adultos. O maior acúmulo de MQ no eritrócito nos permite enfatizar a importância do mecanismo de difusão simples para a entrada do fármaco na célula em função das suas características físico-químicas.

Palavras-chaves: mefloquina, carboximefloquina, monitorização, malária.

ABSTRACT

The determination of plasmatic and erythrocyte concentrations of mefloquine (MQ) and carboxymefloquine (CMQ) were studied in children and adults with malaria by *Plasmodium falciparum* not complicated in the Amapa state. The adult patients received oral outline of MQ 20 mg/kg divided in two days and artesunate 4 mg/kg/day for three days. For children the dose of MQ followed the schedule recommended by the manual of malaria therapy. Concentrations of MQ and CMQ in erythrocytes were quantified by high performance liquid chromatography on the third day of treatment (D3) and plasma levels were measured in the third and second fortieth day after the institution of therapy (D3 and D42). The average concentration of MQ and CMQ in plasma of children in D3 were 1.84 ± 0.83 $\mu\text{g/mL}$ and 1.44 ± 0.70 $\mu\text{g/mL}$, and in erythrocytes 5.26 ± 1.46 $\mu\text{g/mL}$ and 1.18 ± 0.65 $\mu\text{g/mL}$. In D42 the plasma concentrations were 0.45 ± 0.11 $\mu\text{g/mL}$ and 0.51 ± 0.10 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The relationship between plasma and erythrocytes concentrations of MQ and CMQ were 2.86 ± 1.27 and 0.75 ± 0.26 . In adults, concentrations of MQ and CMQ in plasma were 2.43 ± 1.13 $\mu\text{g/mL}$ and 1.10 ± 0.38 $\mu\text{g/mL}$, and in erythrocytes 5.51 ± 1.92 $\mu\text{g/mL}$ and 1.08 ± 0.35 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The plasma concentrations in D42 were 0.54 ± 0.15 $\mu\text{g/mL}$ and 0.58 ± 0.93 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The relationship erythrocyte:plasma for MQ was 3.03 ± 1.56 and 1.12 ± 0.29 to CMQ. The correlation coefficient between plasma and erythrocytes concentrations of MQ in children was 0.035 and adults 0.0436. For CMQ the correlation coefficient in children was 0.8722 and in adults 0.5155. The higher accumulation of MQ in the red blood cells allows us to emphasize the importance of the simple diffusion for the entry of the drug in the cell because of their physical and chemical characteristics.

Keywords: mefloquine, carboxymefloquine, monitoring, malaria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Distribuição global do risco de transmissão da malária, 2006.....	19
Figura 02 -	Mapa da transmissão da malária no Brasil, 2006.....	20
Figura 03 -	Casos de malária de acordo com a espécie de parasita, no período de 1970 a 2005.....	21
Figura 04-	Proporção dos casos de malária por <i>P. falciparum</i> , Amazônia Legal, 1999 a 2005.....	22
Figura 05 -	Esquema do ciclo biológico da malária humana e indicação do local de ação da mefloquina.....	28
Figura 06 -	Dose de mefloquina de acordo com a idade.....	30
Figura 07 -	Estrutura química da mefloquina.....	31
Figura 08 -	Carboximefloquina – principal metabólito da mefloquina.....	35
Figura 09 -	Estratificação dos municípios do Amapá, 2006.....	47
Figura 10 -	Fluxograma do procedimento analítico para determinação de mefloquina e carboximefloquina.....	52
Figura 11 -	Cromatograma das soluções padrões de mefloquina (25 µg/mL) (C), carboximefloquina (25 µg/mL) (B) e quinidina (21 µg/mL) (A), segundo condições cromatográficas previamente padronizadas.....	59
Figura 12 -	Linearidade da mefloquina.....	61
Figura 13 -	Linearidade da carboximefloquina.....	62
Figura 14 -	Curva de calibração da mefloquina no plasma.....	63
Figura 15 -	Curva de calibração da carboximefloquina no plasma.....	64
Figura 16 -	Curva de calibração da mefloquina nos eritrócitos.....	65
Figura 17 -	Curva de calibração da carboximefloquina nos eritrócitos.....	66
Figura 18 -	Correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de	

	mefloquina nas crianças com malária por <i>P. falciparum</i> não complicada..	74
Figura 19 -	Correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de carboximefloquina nas crianças com malária por <i>P. falciparum</i> não complicada.....	75
Figura 20 -	Correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina nos adultos com malária por <i>P. falciparum</i> não complicada....	80
Figura 21 -	Correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de carboximefloquina nos adultos com malária por <i>P. falciparum</i> não complicada.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Tempo de retenção das soluções padrões de MQ (25 µg/mL), CMQ (25 µg/mL) e PI (21 µg/mL), segundo condições cromatográficas previamente padronizadas.....	59
Tabela 02 -	Linearidade da mefloquina.....	60
Tabela 03 -	Linearidade da carboximefloquina.....	61
Tabela 04 -	Curva de calibração da mefloquina no plasma	66
Tabela 05 -	Curva de calibração da carboximefloquina no plasma	63
Tabela 06 -	Curva de calibração da mefloquina nos eritrócitos.....	64
Tabela 07 -	Curva de calibração da carboximefloquina nos eritrócitos	65
Tabela 08 -	Recuperação absoluta da mefloquina e carboximefloquina.....	66
Tabela 09 -	Precisão intraensaio e interensaio da mefloquina expressa como coeficiente de variação.....	67
Tabela 10 -	Precisão intraensaio e interensaio da carboximefloquina expressa como coeficiente de variação.....	67
Tabela 11 -	Tempo de retenção dos fármacos de interesse, de acordo com as condições cromatográficas padronizadas para determinação de mefloquina e carboximefloquina.....	68
Tabela 12 -	Estabilidade da mefloquina e carboximefloquina no plasma após ciclos de congelamento e à temperatura ambiente.....	68
Tabela 13 -	Avaliação da robustez do método por CLAE – alterações no valor de pH e na proporção dos solventes, de acordo com as condições cromatográficas previamente padronizadas.....	69
Tabela 14 -	Concentrações plasmáticas de mefloquina (µg/mL) e carboximefloquina (µg/mL) em D0, D2 e D3, nas crianças com malária falciparum não	

	grave, oriundas do Amapá, no período de agosto de 2005 a agosto de 2006.....	72
Tabela 15 -	Concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina ($\mu\text{g/mL}$) e carboximefloquina ($\mu\text{g/mL}$) e suas respectivas relações, nas crianças com malária por <i>P. falciparum</i> não complicada em D3, oriundas do Amapá, no período de agosto de 2005 a agosto de 2006.....	73
Tabela 16 -	Concentrações plasmáticas de mefloquina ($\mu\text{g/mL}$) e carboximefloquina ($\mu\text{g/mL}$) nos adultos com malária por <i>P. falciparum</i> , oriundas do Amapá, no período de agosto de 2005 a agosto de 2006.....	77
Tabela 17 -	Concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina ($\mu\text{g/mL}$) e carboximefloquina ($\mu\text{g/mL}$), e suas respectivas relações nos adultos com malária por <i>P. falciparum</i> não complicada em D3, oriundos do Amapá, no período de agosto de 2005 a agosto de 2006.....	78

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18	Grupo Octadecil
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CF3	Trifluorometil
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMQ	Carboximefloquina
CRDT	Centro de Referência em Doenças Tropicais
CV	Coefficiente de Variação
FDA	Food and Drug Administration
FNS	Fundação Nacional de Saúde
H	Hora
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonization
IPA	Índice Parasitário Anual
L/kg	litro/kilograma
LQ	Limite de Quantificação
M	Molar
Mm	Milímetro
mg/Kg	miligrama/kilo
mg/mL	miligrama/mililitro
MQ	Mefloquina
MTBE	Éter metil-terc-butílico
m/v	Massa/volume

MS	Ministério da Saúde
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng/mL	nanograma/mililitro
Nm	Nanômetro
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
PI	Padrão interno
pKa	- log da constante de ionização de um ácido
QI	Quinidina
rpm	rotações por minuto
RAVREDA	Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
v/v	Volume/volume
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
µg/mL	micrograma/mililitro
µg/L	micrograma/litro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
1.1.	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....	18
1.2.	VETORES DA MALÁRIA.....	23
1.3.	AGENTES ETIOLÓGICOS DA MALÁRIA.....	25
1.4.	CICLO BIOLÓGICO DA MALÁRIA HUMANA.....	26
1.5.	TRATAMENTO DA MALÁRIA POR P. FALCIPARUM NÃO COMPLICADA.....	28
1.6.	ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA MEFLOQUINA.....	30
1.6.1.	Estrutura química e propriedades físico-químicas da mefloquina.....	30
1.6.2.	Indicações terapêuticas.....	32
1.6.3.	Farmacocinética da mefloquina.....	32
1.6.3.1.	Absorção.....	32
1.6.3.2.	Distribuição.....	33
1.6.3.3.	Biotransformação.....	34
1.6.3.4.	Excreção.....	35
1.6.4.	Interação farmacocinética entre mefloquina e artesunato.....	36
1.6.5.	Mecanismo de ação da mefloquina.....	37
1.6.6.	Efeitos adversos.....	39
1.6.7.	Efeitos tóxicos.....	41
1.6.8.	Contra-indicações.....	42
1.7.	CONCENTRAÇÕES DE MEFLOQUINA NOS COMPARTIMENTOS SANGUÍNEOS.....	42
1.8.	JUSTIFICATIVA.....	44

2.	OBJETIVOS	46
2.1.	GERAL.....	46
2.2.	ESPECÍFICOS.....	46
3.	MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1.	ÁREA DE ESTUDO.....	47
3.2.	CASUÍSTICA.....	47
3.2.1.	Fatores de exclusão	48
3.3.	ESQUEMA TERAPÊUTICO.....	48
3.4.	AMOSTRAS.....	48
3.5.	PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA.....	49
3.5.1.	Reagentes e soluções de referência	50
3.5.2.	Preparação das soluções-padrão	50
3.5.2.1.	Soluções estoque.....	50
3.5.2.2	Soluções de trabalho.....	50
3.5.3.	Aparelhos e equipamentos	51
3.5.4.	Condições cromatográficas	51
3.5.5.	Procedimento de extração de mefloquina e carboximefloquina da matriz biológica	51
3.5.6.	Determinação das concentrações de mefloquina e carboximefloquina	53
3.6.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	53
3.6.1.	Tempo de retenção	53
3.6.2.	Limite de detecção e de quantificação	53
3.6.3.	Linearidade	54

3.6.4.	Curva de calibração.....	54
3.6.5.	Recuperação absoluta.....	55
3.6.6.	Precisão intraensaio e interensaio.....	55
3.6.7.	Interferentes.....	56
3.6.8.	Estabilidade da mefloquina e carboximefloquina na amostra.....	56
3.6.9.	Robustez.....	57
3.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
3.8.	ASPECTOS ÉTICOS.....	57
4.	RESULTADOS	59
4.1.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	59
4.1.1.	Tempos de retenção da mefloquina, carboximefloquina e quinidina	59
4.1.2.	Limite de detecção.....	60
4.1.3.	Limite de quantificação.....	60
4.1.4.	Linearidade.....	60
4.1.5.	Curvas de calibração.....	62
4.1.6.	Recuperação absolutada mefloquina e carboximefloquina.....	66
4.1.7.	Estudo da precisão.....	67
4.1.8.	Interferentes.....	67
4.1.9.	Estabilidade.....	68
4.1.10.	Robustez.....	69
4.2.	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA NAS AMOSTRAS ANALISADAS.....	70
4.2.1.	Características epidemiológicas dos participantes.....	70
4.2.2.	Determinação das concentrações plasmáticas e eritrocitárias de	

mefloquina e carboximefloquina nas crianças.....	70
4.2.3. Concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina e	
carboximefloquina nos adultos.....	75
5. DISCUSSÃO.....	82
6. CONCLUSÃO.....	96
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	98
ANEXOS.....	122

1. INTRODUÇÃO

1.1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

A malária é uma das doenças parasitárias mais severas do mundo, representando um grave problema de saúde pública pela alta incidência e elevadas taxas de morbidade e mortalidade (GREENWOOD et al., 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2005), 3,2 bilhões de pessoas vivem em zonas de risco de transmissão da doença, em 107 países e territórios situados, principalmente, na África, Ásia e América Latina (Figura 01) (CDC, 2005). Nestas regiões, estima-se que ocorram entre 300 a 500 milhões de casos clínicos por ano, que seriam responsáveis por 700 mil a três milhões de mortes anuais (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2005).

Em 2001, a incidência mundial da malária nas áreas de alto risco foi de 396 milhões de casos, dos quais mais de 80% ocorreram no continente africano, ocasionando a morte de 1.123.000 pessoas, principalmente crianças (HAY et al., 2004).

A África tropical, região situada ao sul do deserto do Saara, é a mais afetada, onde se estima que ocorram 90% das mortes atribuída à malária. A eficiência do mosquito vetor (*Anopheles gambiae*) e a predominância do *Plasmodium falciparum* e, conseqüentemente, a possibilidade das manifestações graves da doença, aliados a falta de programas de controle eficientes de combate à infecção, são os fatores que contribuem para as altas taxas de incidência e mortalidade nesta área (CDC, 2005).

Nas Américas e Caribe, 38% da população de 21 países moram em áreas de transmissão da malária, com média de 1,3 milhões de casos por ano (COURA et al., 2006).

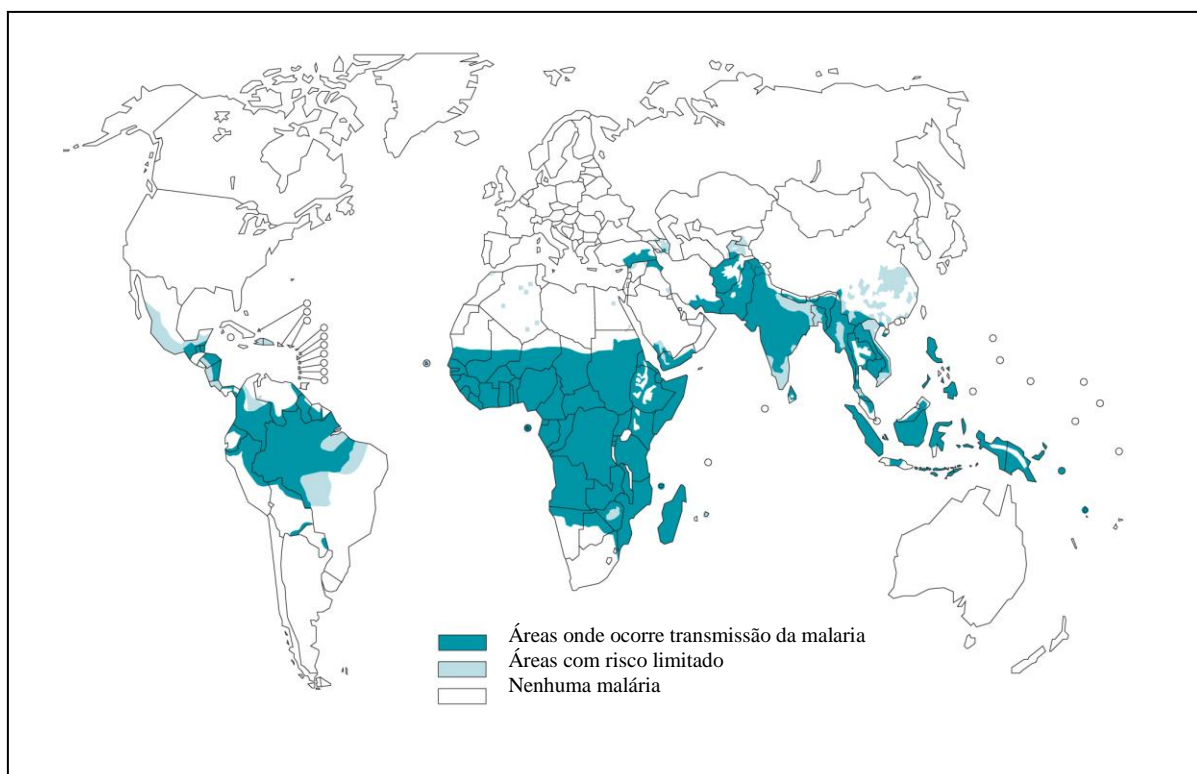


Figura 01: Distribuição global do risco de transmissão da malária, 2006.

Fonte: WHO, 2007.

Em 2002, o Brasil foi responsável por aproximadamente 40% dos casos registrados nas Américas (WHO, 2005), com mais de 99% na Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão (BRASIL/MS/FNS/SVS, 2003). No entanto, a malária não se apresenta distribuída uniformemente em toda a região, haja vista a existência de determinadas áreas com baixa transmissão ou isentas da doença (Figura 02) (SOUZA et al., 1997).

Cerca de 10% da população da Amazônia Legal, aproximadamente 2,4 milhões de pessoas, vivem em áreas de alto risco de transmissão da malária, correspondendo a 90 municípios considerados prioritários (BRASIL/MS/SVS, 2007).

Nesta região, a malária é a mais expressiva das endemias, favorecida pelas condições climáticas com hidrografia abundante, altas temperaturas, elevada umidade relativa

do ar e alto índice pluviométrico, os quais favorecem a manutenção dos criadouros e a proliferação dos vetores (BRASIL/MS/FNS/SVS, 2005).

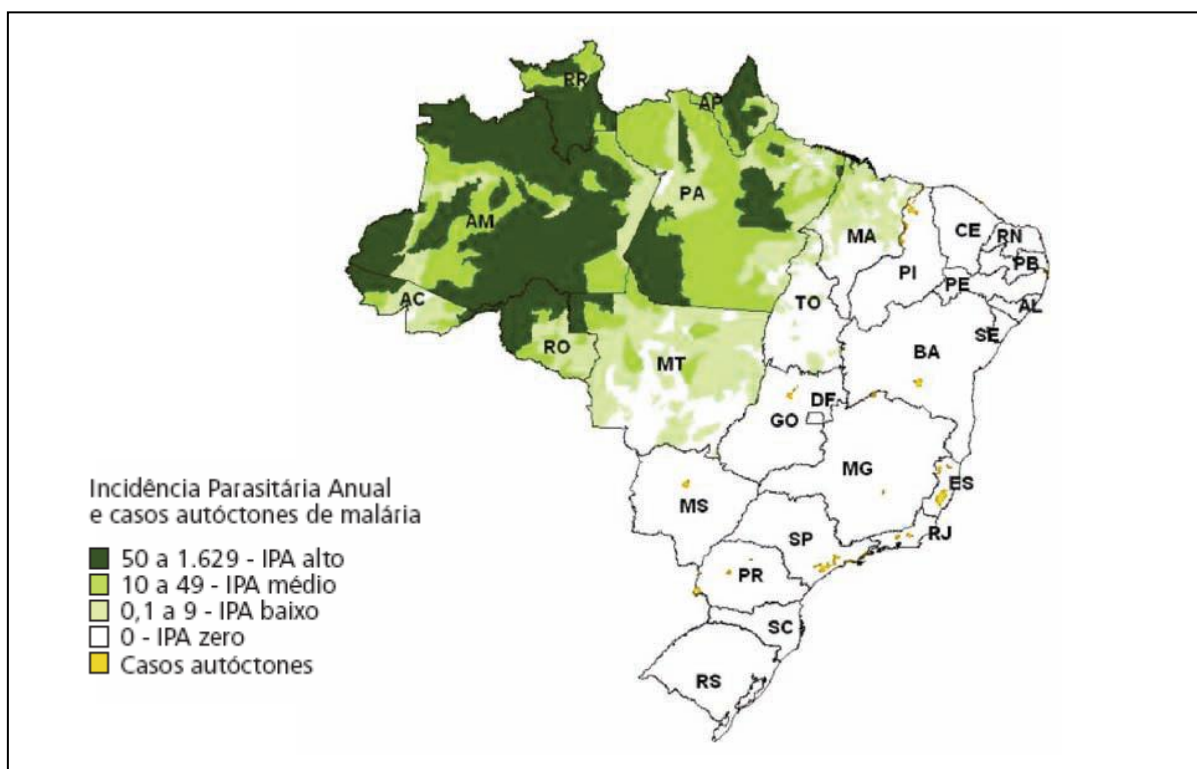


Figura 02: Mapa da transmissão da malária no Brasil, 2006a.

Fonte: BRASIL/MS/SVS, 2007.

Desde 1970, quando cerca de 52.000 casos de malária foram registrados no Brasil, a infecção vem aumentando gradualmente, principalmente no norte do país, propiciada pela ocupação desordenada da região uma vez que, o desenvolvimento intensificado da Amazônia nas décadas de 70 e 80 acelerou o processo migratório, atraindo moradores de outras partes do país devido aos programas de colonização agrária, construção de estradas e hidrelétricas, projetos agropecuários e extração da madeira e minérios (NEVES, 1998; COURA et al., 2006).

A incidência da malária aumentou de tal modo que, na década de 90, o número de casos ultrapassou 500.000, alcançando 632.813 notificações no ano de 1999 (IPA 31,9).

Destacaram-se, pela intensidade de transmissão, os estados do Pará, Amazonas e Rondônia, responsáveis por 76% dos casos relatados (BRASIL/MS/FNS, 2001).

Devido a elevada incidência e seus efeitos debilitantes, a malária é a doença que mais contribui para o comprometimento da saúde do homem na Amazônia, com considerável impacto econômico regional por reduzir a capacidade produtiva da população acometida (BRASIL/MS/FNS/SVS, 2006a).

Buscando solucionar o problema, o Brasil colocou em prática estratégias para prevenir a mortalidade e aliviar as perdas sociais produzidas pela doença. Provavelmente devido à intensificação dos programas de controle, em 2001 foi observado o maior declínio na ocorrência da malária nos últimos 40 anos, com 388.277 casos registrados (IPA 18,8) em nove estados amazônicos (BRASIL/MS/SVS, 2004). Infelizmente, a transmissão da doença voltou a subir em 2003, com 404.806 notificações (TAUIL, 2005) se mantendo elevada em 2004 (IPA 19,9/ 1.000 habitante) (Figura 03).

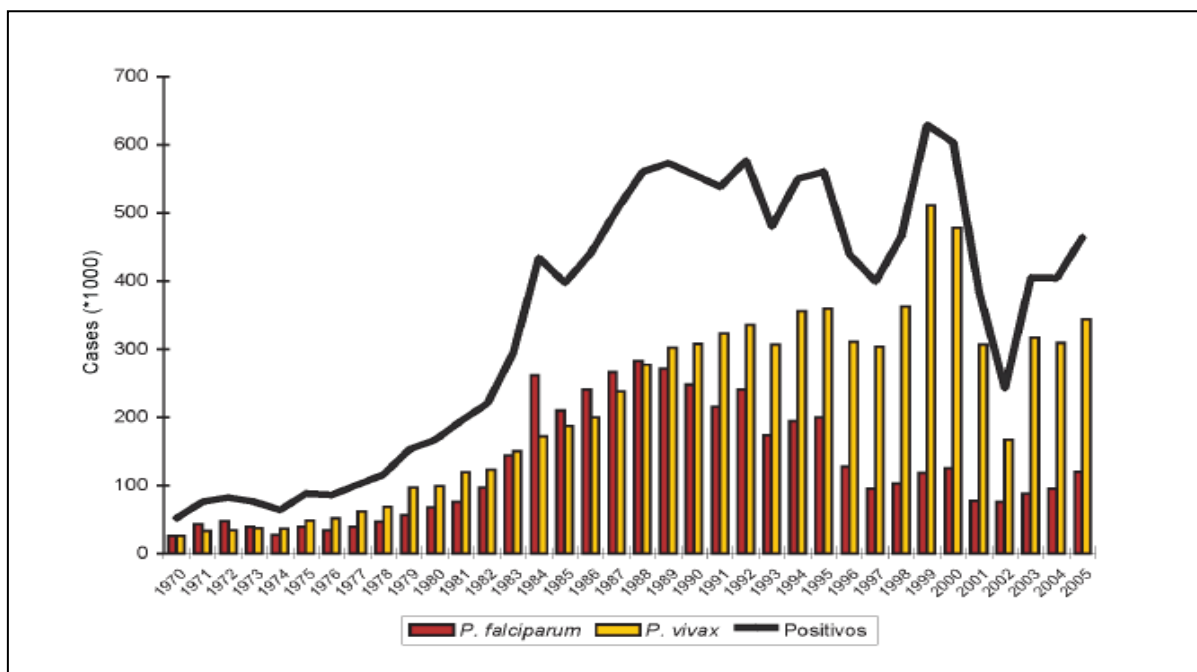


Figura 03: Casos de malária de acordo com a espécie de parasita, no período de 1970 a 2005.

Fonte: COURA et al., 2006.

Na Amazônia Legal as infecções causadas pelo *Plasmodium vivax* prevalecem e, em 2006, foram registrados cerca de 369.000 casos, correspondendo a 73,4 % das notificações (BRASIL/MS/SVS, 2007a). Entretanto, no período de 1999 a 2005 houve um aumento na proporção dos casos de malária *falciparum* de 19,2% para 25,7%, representando um incremento total de 33,9% (Figura 04). O Amapá foi o estado que mais contribuiu (189,9%) para essa situação (BRASIL/MS/SVS, 2006b). Em 2006 houve diminuição desse número no estado (7,4%), mesmo assim, a proporção dos casos por *P. faciparum* foi de 25,4% (BRASIL/MS/SVS, 2007b).

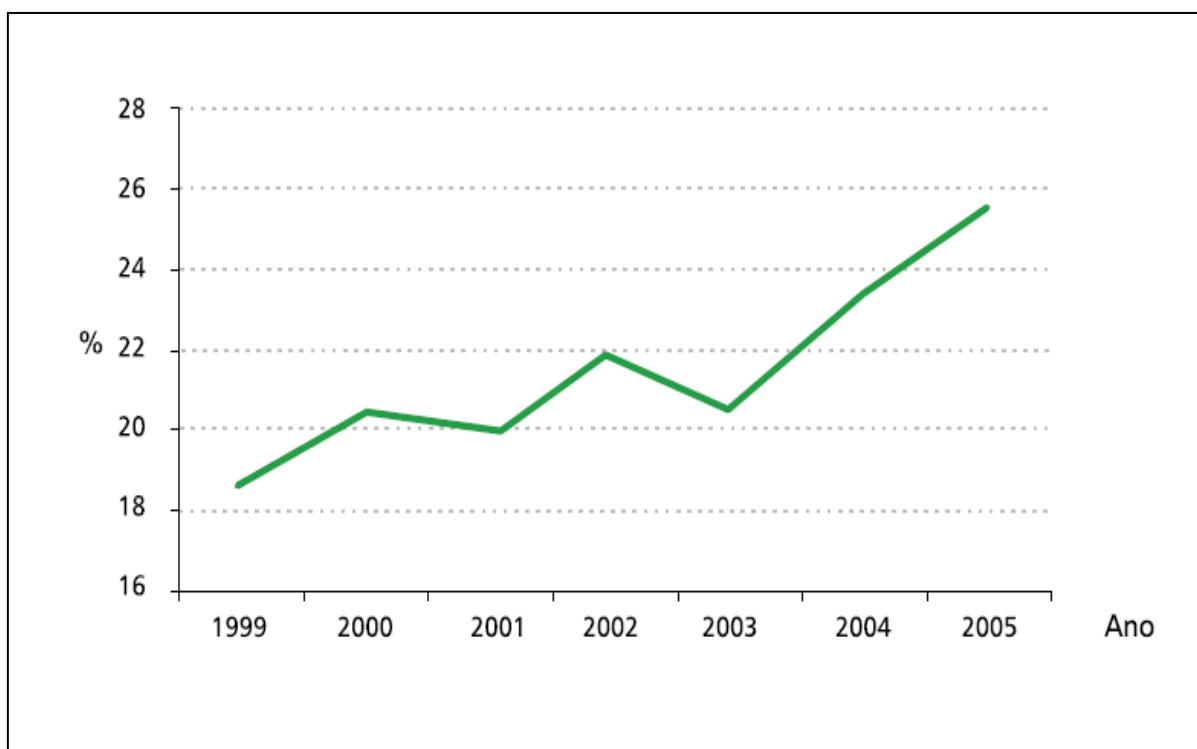


Figura 04: Proporção dos casos de malária por *P. falciparum*, Amazônia Legal, 1999 a 2005.

Fonte: BRASIL/MS/SVS, 2006a.

O Amapá registrou 24.087 casos de malária em 2006, com aumento de 5,6% em comparação a 2005, correspondendo a 4,5% do total de casos da Amazônia Legal. Os

municípios que mais contribuíram foram: Mazagão, Porto Grande, Pedra Grande do Amapari, Calçoene, Santana, Oiapoque e Macapá (BRASIL/MS/SVS, 2007b).

Além destes, Tartarugalzinho, Ferreira Gomes e Serra do Navio merecem destaque por apresentarem alta incidência de malária ($IPA \geq 50/1.000\text{hab.}$) (BRASIL/MS/SVS, 2007b).

Dentre as principais dificuldades para o controle da doença, não só no Brasil como nas outras áreas do mundo, destacam-se: o aumento acelerado das populações nas áreas endêmicas, as migrações para as áreas de transmissão, a degradação ambiental que causa desequilíbrio ecológico, o desmatamento e formação de novos criadouros para o vetor, carência de políticas e estratégias adequadas para o controle da infecção e o advento da resistência do plasmódio, em especial o *P. falciparum*, as drogas antimaláricas e do vetor, aos principais inseticidas (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2005; VITTOR et al., 2006).

1.2. VETORES NA MALÁRIA

Os vetores responsáveis pela malária são Artrópodes, da ordem Díptera, subordem Nematocera, família Culicidae e do gênero *Anopheles* (NEVES, 1998).

Este gênero se caracteriza por pequenos insetos medindo cerca de 4-5 mm de envergadura, apresentam porte delgado e pernas longas, sendo os machos geralmente menores que as fêmeas. O corpo é revestido por escamas formando manchas brancas e negras nas asas e nos palpos. As fêmeas são vetores naturais da malária pois necessitam de sangue para o amadurecimento dos ovos, enquanto os machos se alimentam do néctar e sucos vegetais (REBÊLO, 2001). No mundo existem cerca de 400 espécies descritas, contudo somente 60 são vetores da malária (SOUZA et al., 1997).

No Brasil, as principais espécies transmissoras pertencem a dois subgêneros: *Nyssorhyncus*, destacando-se as espécies *A. (N.) darlingi*, Root, 1926, *A. (N.) aquasalis*,

Curry, 1932 e *A. (N.) albitarsis*, Arribalzaga, 1878; e o subgênero *Kerteszia*, com as principais espécies *A. (K) cruzzi*, Dyar; Knab, 1908 e *A. (K) bellator*, Dyar; Knab, 1908 (DEANE, 1986).

A. (N) darlingi é um importante transmissor da malária no Brasil (LOPES, 1978), sendo considerada a espécie de maior importância epidemiológica, especialmente na Amazônia Brasileira, pela abundância, ampla distribuição, alto grau de antropofilia e endofagia e capacidade de transmitir diferentes espécies de plasmódios (CONN; PÓVOA, 2006).

Outras espécies, apesar de serem transmissores de menor importância, também devem ser consideradas na disseminação da doença em várias cidades do Brasil. *A. (Nyssorhynchus) albitarsis*, é o principal vetor do parasita da malária humana no estado de Roraima (PÓVOA et al., 2006). Em Belém, no período de 1993 a 1999, foram identificadas 10 espécies: *A. albitarsis*, *A. aquasalis*, *A. braziliensis*, *A. darlingi*, *A. evansae*, *A. galvaoui*, *A. nuneztovari*, *A. oswaldoi*, *A. strodei* e *A. triannulatus* (PÓVOA et al, 2003), sendo *A. aquasalis* a espécie de maior densidade e distribuição no município (SILVA et al., 2006). Em Macapá e no interior do estado do Amapá, *A. aquasalis*, *A. marajoara* e *A. albitarsis* são importantes vetores (PÓVOA et al, 2001; CONN et al., 2002).

A prevalência e a periodicidade da malária são influenciadas pelas características ambientais: temperaturas entre 20 e 30 °C e umidade relativa acima de 60% são ideais para a criação de anofelinos e desenvolvimento dos parasitas no seu interior (TAUIL, 2005). Na região amazônica é observada sazonalidade na transmissão da doença, com maior número de casos no período de junho a setembro (BRASIL/MS/SVS, 2006a).

1.3. AGENTES ETIOLÓGICOS DA MALÁRIA

A malária é causada por protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiidae, subordem Haemosporinae, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium* (LAINSON, 1992).

Atualmente são conhecidas aproximadamente 172 espécies de plasmódios que podem infectar vários animais incluindo aves, répteis e mamíferos (LEVINE, 1988). Destas, apenas quatro são causadoras da malária humana: *P. malariae* Laveran, 1881, *P. vivax* Grassi; Feletti, 1890, *P. falciparum* Welch, 1897, e *P. ovale* Stephens, 1922 (SOUZA et al., 1997).

O *P. vivax* é o mais prevalente no mundo, ocorrendo nos países tropicais e subtropicais e está associado à chamada febre terçã benigna. Assim com o *P. vivax*, o *P. ovale* também pode desencadear a febre terçã benigna e está presente em algumas áreas da África Tropical e, ocasionalmente, em alguns países da Ásia como Filipinas, Nova Guiné e Vietnã, não existindo no Brasil (SOUZA et al., 1997).

O *P. falciparum* é encontrado comumente nas zonas tropicais, predominando nos países africanos ao sul do Saara e nas regiões tropicais e subtropicais das Américas e do Sudeste Asiático. Está associado à chamada febre terçã maligna. Por fim, o *P. malariae*, de incidência mais baixa, restrito as pequenas áreas das regiões tropicais e temperadas e produz a febre quartã benigna (BRUCE-CHWATT, 1985).

Dentre as espécies de plasmódios que podem infectar o homem, o *P. falciparum* é, sem dúvida, a mais severa, sendo responsável pelas graves complicações da malária (insuficiência renal, edema pulmonar, hipoglicemia, acidose metabólica, dificuldades respiratórias, dentre outras) e a maioria das fatalidades associadas à doença (MILLER et al., 2002).

1.4. CICLO BIOLÓGICO DA MALÁRIA HUMANA

O ciclo biológico do plasmódio (Figura 05) se processa em dois hospedeiros. No homem, considerado intermediário, ocorre reprodução assexuada por esquizogonia e, no mosquito, hospedeiro definitivo, é do tipo sexuada por esporogonia (REBÊLO, 2001).

O ciclo se inicia quando a fêmea do mosquito *Anopheles*, infectada pelo plasmódio, ao exercer a hematofagia, inocula a forma infectante, chamada esporozoíto, na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Os esporozoítos migram pela circulação periférica e alcançam os hepatócitos. Nesse estágio o parasita está recoberto pela proteína circunsporozoíto (CS) e pela proteína adesiva relacionada com a trombospondina (TRAP), responsáveis por mediar o processo de invasão nas células do fígado e a formação do vacúolo parasitóforo (PRUDENCIO et al., 2006; MILLER et al., 2002).

Neste vacúolo o esporozoíto se diferencia em trofozoíto pré-eritrocítico, que se multiplica por reprodução assexuada do tipo esquizogonia dando origem aos esquizontes teciduais e, posteriormente, merozoítos. Essa fase primária do ciclo é chamada pré ou exo-eritrocítica ou tissular (CDC, 2006a).

Nas infecções causadas pelo *P. ovale* e *P. vivax* algumas formas exoeritrocíticas, denominadas hipnozoítas, podem permanecer latentes no fígado por meses ou anos, e parecem ser responsáveis pelas recidivas tardias da doença, observadas nas infecções causadas por estas duas espécies (FERREIRA, 2005).

A segunda fase do ciclo é denominada eritrocítica e se inicia quando os merozoítos tissulares, liberados na corrente sanguínea, invadem os eritrócitos, estabelecendo a infecção (MARSH; KINYANJUI, 2006). A seqüência de invasão nas hemácias é, provavelmente, similar para todos os plasmódios. O parasita se adere à superfície dos glóbulos vermelhos através das glicoproteínas presentes na sua membrana celular e induz a formação de um

vacúolo derivado da membrana plasmática do eritrócito. O parasita penetra no interior deste vacúolo infectando a hemácia (MILLER et al., 2002).

Os merozoítos se desenvolvem por esquizogonia eritrocitária e sofrem maturações morfológicamente distintas, a saber: formas em anel, trofozoítos e esquizontes. Os eritrócitos se rompem liberando os parasitas na circulação sanguínea que invadirão novos glóbulos vermelhos reiniciando o ciclo (CDC, 2006a).

Após sucessivas gerações de merozoítos sanguíneos, uma proporção dos parasitas assexuados se diferencia em estágios sexuais, os microgametócitos (masculino) e macrogametócito (feminino) (REBÊLO, 2001).

A infecção do vetor ocorre quando a fêmea do mosquito *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado, ingere gametócitos machos e fêmeas que irão evoluir no interior do inseto dando origem ao ciclo sexual ou esporogônico (CDC, 2006a).

No intestino médio do mosquito, fatores como temperatura inferior a 30 °C, pH e baixa pressão de CO₂, estimulam a gametogênese, poucos minutos após a ingestão do sangue. Os microgametócitos, por exflagelação originam oito microgametas que fertilizarão o macrogameta gerando o ovo ou zigoto. Estes, após 18 a 24 horas, tornam-se alongados e móveis e são denominados oocinetos, que atravessam a matriz peritrófica alcançando a parede gástrica do intestino médio, onde se encistam na camada epitelial do órgão dando origem ao oocisto (REBÊLO, 2001).

Inicia-se então, o processo de divisão esporogônica para formar os esporozoítos que, liberados na hemolinfa, se disseminam pelo corpo do inseto e alcançam as glândulas salivares (WHITTEN et al., 2006). A partir daí, as fêmeas se tornam infectantes (FERREIRA, 2005). O inseto, ao exercer nova hematofagia, inocula os esporozoítos com a saliva, iniciando um novo ciclo (REBÊLO, 2001).

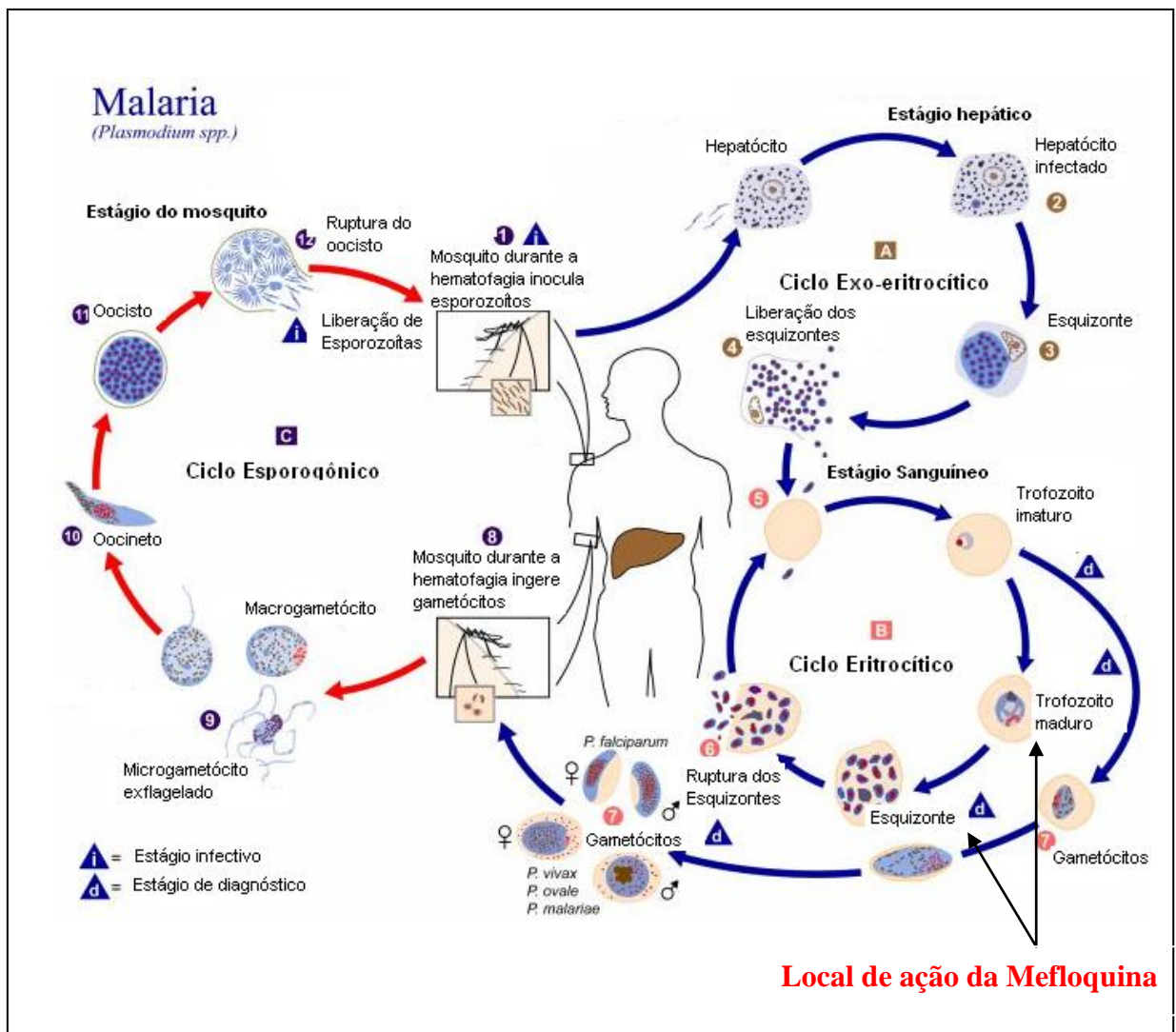


Figura 05: Esquema do ciclo biológico da malária humana e indicação do local de ação da mefloquina.

Fonte: Adaptado de http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm. Acesso, outubro de 2006.

1.5. TRATAMENTO DA MALÁRIA POR *P. FALCIPARUM* NÃO COMPLICADA

No tratamento da malária, o objetivo fundamental é abolir o ciclo de reprodução sanguínea do parasita responsável pela doença, suas manifestações clínicas agudas e eventuais complicações. Dentre os vários medicamentos utilizados se destaca a mefloquina, um esquizonticida sanguíneo que age nas formas eritrocíticas do parasita (BOULOS, 2005).

Esse fármaco foi desenvolvido em 1971 por Ohnmacht e colaboradores do programa Walter Reed Institute for Medical Research, com o objetivo de combater cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina (SALLES; SALLES, 2000). Foi introduzido na Tailândia em 1984, sendo utilizado em dose única de 15 mg de base/kg de peso corporal (SIMPSON et al., 2000).

A eficácia do tratamento monoterápico, mesmo após o aumento da dose para 25 mg/kg, declinou rapidamente e, em 1994, a taxa de cura nos pacientes tailandeses caiu para aproximadamente 50%. No mesmo ano foi implantado um novo esquema terapêutico utilizando mefloquina (25 mg/kg) e artesunato por três dias, combinação que se caracterizou por uma resposta rápida, altas taxas de cura e menor potencial de transmissão (PRICE et al., 1999).

Há muitos anos, a associação quinina e doxiciclina vem sendo utilizada no Brasil para o tratamento da malária falciparum não complicada. Entretanto, avaliações recentes deste esquema apontaram eficácia inferior a 90%, abaixo do recomendado pela Organização Mundial de Saúde. Estudo realizado no estado do Pará, mostrou problemas na adesão a este esquema, indicando que cerca de 75% das pessoas complementavam o esquema terapêutico proposto (BRASIL/MS/SVS, 2007a).

Pela soma das evidências acumuladas, no segundo semestre de 2005, por intermédio da Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas (Ravreda), foi implantado no Brasil novo esquema terapêutico para o tratamento da malária por *P. falciparum*, com drogas associadas à derivados da artemisinina. Neste sentido, a associação mefloquina e artesunato vem sendo avaliada nos estados de Rondônia, Roraima, Amapá, Pará e Acre, e os resultados obtidos até o momento apontam para eficácia próxima a 100% (BRASIL/MS/SVS, 2007a).

O cloridrato de mefloquina, comercialmente conhecido como Lariam (Roche®) e Mephaquin (Mepha®), é distribuído no Brasil sob supervisão da Fundação Nacional de Saúde e está disponível em comprimidos contendo 274 mg de cloridrato de mefloquina, equivalente a 250 mg de mefloquina-base, não sendo disponível para administração parenteral (BRASIL/MS/FNS, 2001).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, a mefloquina é recomendada na dose de 15-20 mg/kg em adultos e não deve ser utilizada em crianças menores de 6 meses de idade ou pesando menos de 15 kg (Figura 06) (BRASIL/MS/FNS, 2001).

Grupos Etários	Mefloquina Comprimido 15-20 mg/kg
Menor de 6 meses	*
6 a 11 meses	¼
1 a 2 anos	½
3 a 4 anos	1
5 a 6 anos	1 e ¼
7 a 8 anos	1 e ½
9 a 10 anos	2
11 a 12 anos	2 e ½
13 a 14 anos	3
15 ou mais	4

Figura 06: Dose de mefloquina de acordo com a idade.

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

1.6. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA MEFLOQUINA

1.6.1. Estrutura química e propriedades físico-químicas da mefloquina

A mefloquina é um derivado 4-quinoleína-metanol ou 4-hidroximetilquinoleína, quimicamente relacionada à quinina (TAVARES, 1996). A molécula apresenta conformação

relativamente estável, com um anel conjugado bi-heterocíclico e radical trifluorometil (CF₃) nas posições C14 e C21 do anel quinoliníco (Figura 07). A presença destes radicais confere lipossibilidade e contribui para a sua elevada e prolongada atividade antimalárica (WARHURST et al., 2003; SKÓRSKA et al., 2006).

Está presente no mercado como uma mistura racêmica de igual proporção, cujas propriedades farmacocinéticas são estereoespecíficas (ASHLEY et al., 2006). Estudos *in vitro* sugerem que (+)-mefloquina apresenta maior atividade antimalárica que (-)-mefloquina contra algumas cepas de *P. falcipraum* (SKÓRSKA et al., 2006).

A base de mefloquina apresenta a nomenclatura química (R*,S*)-(±)-α-2-piperidinil-2,8-bis(trifluorometil)-4-quinolinometanol, fórmula molecular C₁₇H₁₆F₆N₂O e peso molecular de 414.78 Kda. É um pó cristalino branco ou levemente amarelado, pouco solúvel em água, facilmente solúvel em metanol e solúvel em acetato de etila e etanol; possui ponto de fusão de 259 a 260 °C e constante de dissociação (PKa) de aproximadamente 9.0 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2006).

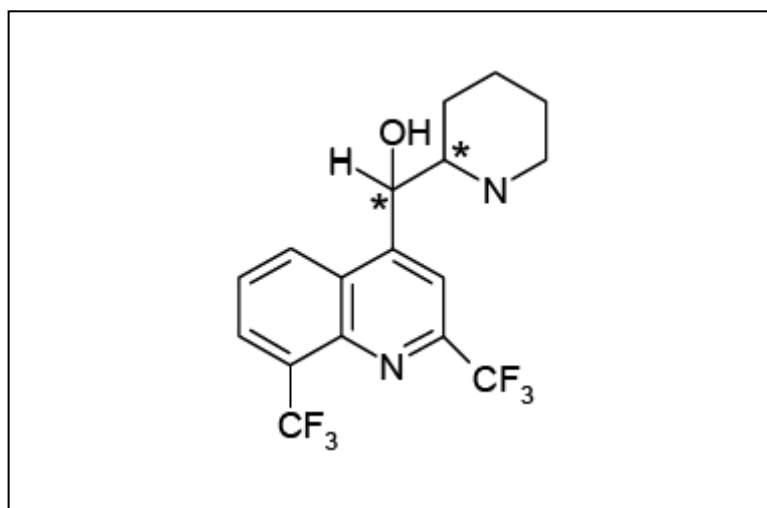


Figura 07: Estrutura química da mefloquina.

Fonte: Adaptado de GREEN et al. (1999).

1.6.2. Indicações terapêuticas

A mefloquina é empregada no tratamento da malária não complicada causada por *P. falciparum*, na malária complicada causada por cepas de *P. falciparum* e *P. vivax* suscetíveis e para quimioprevenção nas áreas com elevado risco de transmissão de *P. falciparum* resistente a cloroquina (SALLES; SALLES, 2000; KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1998). Apresenta, também, atividade contra formas assexuadas intra-eritrocíticas de *P. malariae* e *P. ovale* (PANISKO; KEYSTONE, 1990).

1.6.3. Farmacocinética da mefloquina

1.6.3.1. Absorção

A mefloquina administrada via oral apresenta meia-vida de absorção de aproximadamente 2 horas (SCHWARTZ et al., 1982). A biodisponibilidade oral absoluta de mefloquina ainda não foi determinada uma vez que, a formulação intravenosa não está disponível. No entanto, a biodisponibilidade do comprimido comparado à solução oral é cerca de 85% (LARIAM, 2004).

Estudo com voluntários saudáveis indicou que a ingestão de mefloquina na presença de água ou de alimentos, eleva significativamente a velocidade e a quantidade do fármaco absorvido, aumentando a biodisponibilidade em até 40% (CREVOISIER et al., 1997). Em contraste, Dao et al. (2005), observaram que uma refeição gordurosa não parece aumentar a biodisponibilidade do fármaco em paciente com malária falciparum após dose única de 15 mg/Kg.

Segundo Ashely et al. (2006), a malária aguda em crianças está associada à redução da absorção de mefloquina, e a ingestão conjunta de alimentos não corrige esta situação. No mesmo estudo, a administração do fármaco na convalescença aumentou a

biodisponibilidade, o que pode ser creditado ao fato do paciente estar afebril e com funções gastrintestinais normais.

Foi demonstrado em indivíduos saudáveis que a mefloquina apresenta pico de concentração plasmática entre 0,05 e 0,11 µg/mL após 6 a 24 horas (média de 17 h) da ingestão de dose única do fármaco de 250 mg. Nos pacientes com malária falciparum não complicada o pico de concentração plasmática é duas a três vezes maiores, isto é, de 0,112 a 0,209 µg/mL, o que pode estar associado a contração no volume de distribuição aparente total (KARBWANG; WHITE, 1990). A ingestão de 250 mg de mefloquina semanalmente produz concentrações plasmáticas máximas de 1000 a 2000 µg/L após 7 a 10 semanas de tratamento (LARIAM, 2004).

A ocorrência de êmese, até uma hora após administração do medicamento, tem influência nas concentrações sanguíneas e pode resultar em falha terapêutica (KARBWANG; NA-BANGCHANG, 1994).

1.6.3.2. Distribuição

Em adultos saudáveis, o volume de distribuição aparente, após dose única de 250 mg, é aproximadamente 20 L/Kg, indicando uma extensa distribuição tecidual e prolongada atividade (KARBWANG; WHITE, 1990). A mefloquina apresenta alta capacidade de ligação às proteínas plasmáticas (>98%) e se distribui intensamente não só nos tecidos, como também nos fluídos orgânicos, sendo detectada em altas concentrações nos pulmões, fígado, rins, músculos, tecido adiposo e eritrócitos (SALLES; SALLES, 2000). Entretanto, o volume de distribuição é significativamente menor nos pacientes com malária severa (JUMA; OTEGO, 1989).

O elevado volume de distribuição pode ser justificado pelo fato da mefloquina apresentar tropismo pelos lisossomos, podendo se acumular nos lipídios presentes nestas estruturas intracelulares (GLAUMANN et al., 1992).

Mulheres grávidas apresentam maior volume de distribuição sanguínea do fármaco em virtude da expansão do líquido intracelular e da ligação tecidual aumentada, necessitando de doses maiores de mefloquina para alcançar níveis sanguíneos semelhantes aqueles observados nas não grávidas (NA-BANGCHANG et al., 1994).

A mefloquina atravessa a barreira hematoencefálica estereoseletivamente (BAUDRY et al., 1997) e uma pequena quantidade (11%) pode atravessar a barreira placentária e chegar ao feto (BARZAGO et al., 1994). É secretada pelo leite materno em concentrações inferiores aquelas mensuradas no plasma (EDSTEIN et al., 1988).

1.6.3.3. Biotransformação

Evidências indicam que a mefloquina é biotransformada pela subfamília 3A do citocromo P-450. Este achado deve ser considerado na poliquimioterapia da malária uma vez que, outros medicamentos podem interferir na biotransformação deste medicamento (FONTAINE et al., 2000). Fatores genéticos ligados ao citocromo P-450 (polimorfismo) e fatores ambientais (dieta, estado nutricional, processos inflamatórios e infecciosos) também podem influenciar no comportamento desse sistema enzimático e, conseqüentemente, na farmacocinética do fármaco (GUZMAN; CARMONA-FONSECA, 2006).

A mefloquina origina em humanos produtos de biotransformação carboxilados e hidroxilados. O principal metabólito é a carboximefloquina que, diferentemente do composto original, não apresenta centros quirais (Figura 08) (KARBWANG; NA-BANGCHANG, 1994). Em voluntários saudáveis os níveis plasmáticos do metabólito carboxilado aparecem no plasma 2 a 4 horas após dose única oral e a sua concentração plasmática máxima pode

exceder, em cerca de 50%, a do fármaco original após duas semanas (SCHWARTZ et al., 1982).

Estudos *in vitro* demonstraram ausência de atividade antimalárica da carboximefloquina, porém sua determinação plasmática é importante para o acompanhamento do tratamento (HAKANSON et al., 1990).

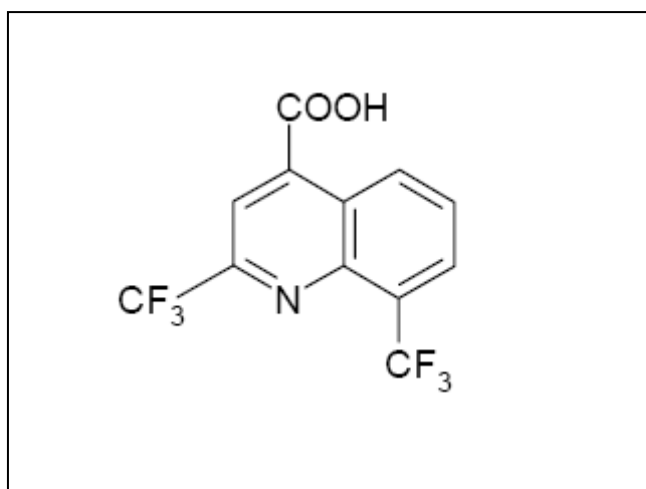


Figura 08: Carboximefloquina – principal metabólito da mefloquina.

Fonte: Adaptado de GREEN et al. (1999).

1.6.3.4. Excreção

A meia-vida de eliminação da mefloquina é prolongada, permanecendo no organismo humano entre 10 a 40 dias (média de 21 dias) em adultos, porém tende a ser mais curta em crianças (BRASIL/MS/FNS, 2001). Já a carboximefloquina foi estimada em 26 dias, sendo excretada de forma mais lenta que o fármaco original (ASHLEY et al., 2006).

Esta característica cinética pode diferenciar entre várias populações étnicas. Verificou-se, por exemplo, que a meia vida de eliminação é mais demorada nos caucasianos quando comparados aos africanos e tailandeses (PALMER et al., 1993).

Ressalta-se que a meia vida prolongada se constitui na principal desvantagem do uso da mefloquina em monoterapia nas áreas endêmicas uma vez que, o indivíduo pode se reinfectar em um momento que apresenta níveis plasmáticos sub terapêuticos, o que poderá favorecer o desenvolvimento de cepas resistentes (BRASIL/MS/FNS, 2001).

A excreção ocorre principalmente pela via fecal, pois o fármaco apresenta secreção biliar e substancial circulação entero-hepática (SCHWARTZ et al., 1982). Pequena quantidade de mefloquina inalterada é excretada pela urina. Baseado em um estudo com voluntários africanos, Schwartz et al. (1987), observaram que após dose única de 250 mg, a excreção urinária semanal da droga inalterada e seu principal metabólito representa cerca de 9% e 4,2% respectivamente. Em torno de 3 a 4% de mefloquina é secretada pelo leite materno, seguida de uma dose equivalente a 250 mg de base livre (LARIAM, 2004).

Nos pacientes com malária por *P. falciparum* não complicada a meia vida de eliminação é mais curta (média de 13 dias), possivelmente pela diminuição da recirculação entero-hepática (LOOAREESUWAN et al., 1982; KARBWANG; NA-BANCHANG, 1994).

1.6.4. Interação farmacocinética entre mefloquina e artesunato

A influência do artesunato na cinética da mefloquina foi investigada, apresentando resultados aparentemente inconsistentes (DAVIS et al., 2007). De acordo com Karbwang et al. (1994), as concentrações de mefloquina em vinte pacientes tailandeses com malária por *P. falciparum* estavam diminuídas na presença de artesunato. Em contraste, Hung et al. (2004), não observaram nenhuma interação entre estes dois antimaláricos em relação a tolerância, eficácia e farmacocinética. De maneira semelhante, a mefloquina não altera a cinética do artesunato quando as drogas são administradas conjuntamente (DAVIS et al., 2007).

1.6.5. Mecanismo de ação da mefloquina

A mefloquina é um potente esquizotocida sanguíneo de ação prolongada que atua nos estágios intra eritrocíticos assexuados do plasmódio, particularmente as formas trofozoíta e esquizonte do *P. falciparum* e do *P. vivax* (GUSTAFSSON et al., 1987). O fármaco interrompe a esquizogonia eritrocitária abolindo as manifestações clínicas. Possui ação rápida, com regressão da parasitemia em cerca de três dias (TAVAREZ, 1996). O tratamento deve ser acompanhado de Primaquina uma vez que o fármaco não tem ação sobre os estágios hepáticos iniciais do plasmódio, os gametócitos maduros do *P. falciparum* e as formas tissulares latentes do *P. vivax* (BRASIL/MS/FNS, 2001).

O mecanismo de ação dos quinolinometanóis não é bem conhecido, entretanto, pode envolver ligação direta ao grupo heme e inibição da heme polimerase (FOLEY; TILLEY, 1998).

O plasmódio, no interior da hemácia, se alimenta de pequenas partículas de hemoglobina que é degradada no compartimento ácido do parasita, conhecido como vacúolo digestivo, por uma série de proteases, chamadas plasmecinas, originando um composto tóxico do grupo heme denominado ferriprotoporfirina IX (Fe (III) PPIX) (EGAN; MARQUES, 1999).

A heme polimerase é utilizada pelo parasita para catalisar a reação de detoxificação da Fe (III) PPIX, formando um composto inerte, não tóxico, denominado hemozoína ou pigmento malárico, que tem por unidade básica a β -hematina (SULLIVAN et al., 1998).

Acredita-se que a principal anormalidade estrutural produzida pela mefloquina no *P. falciparum* seja o aumento dos vacúolos alimentares, alterando seu processo digestivo provavelmente por se unir a hematina, ou por inibição da heme polimerase, que impediria a

polimerização do heme com crescente acúmulo de Fe(III)PPIX no vacúolo digestivo (ORJIH et al., 1994).

O mecanismo preciso de ação tóxica da Fe(III)PPIX livre não está completamente esclarecidas, mas se acredita que possa resultar da sua atividade peroxidativa que atuam promovendo danos nas membranas e outros componentes do plasmódio (SUGIOKA; SUZUKI, 1991).

Outra hipótese é que a Fe(III)PPIX possa lisar o parasita através de um mecanismo colóido-osmótico, possivelmente pela inibição da manutenção do gradiente de cátions (EGAN; MARQUES, 1999).

Apesar da suposição de que a ação antiparasitária esteja associada a inibição da heme polimerase, a mefloquina, a exemplo da quinina, não se concentra tão intensamente no parasita, quando comparado a cloroquina, sugerindo-se que outros mecanismos possam estar envolvidos (FOLEY; TILLEY, 1998).

De fato, acredita-se que a cloroquina, por ser uma base fraca diprotonada, se concentra cerca de 1000 a 5000 vezes no interior do vacúolo, ao passo que a mefloquina, por ser uma base fraca monoprotônica, acumula-se no vacúolo apenas cerca de 70 vezes, concentração insuficiente para inibir a polimerização do heme (FOLEY; TILLEY, 1998).

Segundo Slater (1993) e Raynes et al. (1996), a mefloquina inibe a polimerização do heme *in vitro*, com similar ou menor eficiência que a cloroquina. No entanto, é sabido que este fármaco inibe o crescimento parasitário de forma mais potente que a cloroquina, levando estudiosos a sugerir a existência de sistemas de transportes específicos para sua penetração no eritrócito infectado ou de outros locais de ação no parasita (FOLEY; TILLEY, 1998).

Segundo Berman et al. (1994), a mefloquina, por ser altamente lipossolúvel, associa-se especificamente a um polipeptídeo denominado apo-A1, presente nas lipoproteínas de alta densidade (HDL). Eritrócitos infectados tendem a se ligar às partículas de HDL

circulantes para obtenção do suprimento de lipídios, o que facilitaria a passagem e o acúmulo do fármaco no eritrócito infectado, transferido pelas translocases e os fosfolipídios através das proteínas de transferências de lipídios (FOLEY; TILLEY, 1998).

Desneves et al (1996), demonstrou que a mefloquina pode interagir com uma proteína presente na membrana do eritrócito, chamada estomatina cuja função está relacionada a reorientação dos fosfolipídios. Estudos sugerem que a mesma possua alta afinidade por esta proteína, facilitando sua absorção pelo eritrócito e contribuindo para longa meia vida no organismo (SCHWARTZ et al., 1982).

Atualmente os estudos são dirigidos para a caracterização molecular das proteínas nas quais a mefloquina se liga, buscando identificar a localização destas no interior da célula e as regiões onde se acumula, para desvendar novos locais de ação deste fármaco (FOLEY; TILLEY, 1998).

1.6.6. Efeitos adversos

A mefloquina é geralmente bem tolerada por crianças e adultos, no entanto pode ocasionar reações adversas como distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares, dermatológicos e neuropsiquiátricos (WOOLTORTON, 2002).

Embora seja difícil distinguir os sinais e sintomas associados à ingestão de mefloquina daqueles atribuídos a doença em si, os eventos adversos mais frequentes são: tontura, náusea, vômito, diarreia e dor abdominal, os quais podem ocorrer em cerca de 40% dos pacientes e, em geral, são leves ou moderados, auto-limitados e não requerem tratamento específico (PALMER et al., 1993; WOOLTORTON, 2002). O vômito e a diarreia são, provavelmente, dependentes da dose e podem interferir com o resultado do tratamento, especialmente nas crianças, haja vista influenciarem as concentrações sanguíneas de

mefloquina e, conseqüentemente, na resposta ao tratamento (KARBWANG; NABANGCHANG, 1994).

Outras reações adversas são: labirintite, anorexia e transtornos neuropsicológicos tais como dor de cabeça, sonolência e distúrbios do sono (insônia e sonhos anormais) (KOLLARITSCH et al., 2000).

Há relatos de esofagite e três casos na literatura de pneumonite após o uso de mefloquina (BRASIL/MS/FNS, 2001; SOENTJENS et al., 2006). Distúrbios cardiovasculares como hipotensão, hipertensão, síncope, angina pectoris, taquicardia, bradicardia, extra sístoles e outras alterações na condução cardíaca podem ser observados (FONTEYNE et al., 1996).

A mefloquina ocasiona efeitos dermatológicos de gravidade variável nos viajantes saudáveis e nos pacientes com malária, os quais são, na maioria das vezes, auto-limitados e raramente requerem tratamento. Prurido, urticária, edema, alopecia, exantemas, vasculite cutânea, síndrome de Stevens-Johnson, necrose epidermal tóxica já foram relatados em 4 a 10% dos pacientes que utilizaram o fármaco por curto período de tempo, e em 30% após o uso profilático prolongado (SMITH et al., 1999).

O principal temor em relação ao uso de mefloquina são as manifestações neuropsiquiátricas graves como: psicose, encefalopatias e convulsões. Ocorrem em proporção de um para 215 pacientes que a utilizam para o tratamento da malária e, em cerca de 1 para 13.000 indivíduos saudáveis que a utilizaram na profilaxia da malária (WOOLTORTON, 2002).

Outros possíveis efeitos são polineuropatias motora e sensorial (incluindo parestesia, tremor e ataxia), confusão mental, depressão, ansiedade, crise de pânico, mudanças de humor, reações paranóicas, fadiga, alterações visuais, alucinações e, raramente, suicídio (CRAIG; STITZEL, 1996; WATT-SMITH et al., 2001; SANJEEV et al., 2006).

Estes efeitos são bem tolerados por jovens do sexo masculino. Já as mulheres são menos tolerante a mefloquina, possivelmente, pelo menor peso corporal e volume de distribuição (KOLLARITSCH et al., 2000). Estudo realizado por Schwartz et al. (2001), sugere que os níveis sanguíneos de mefloquina não se correlacionam com os efeitos adversos severos observados após seu uso.

Para os pacientes que apresentam algum distúrbio psiquiátrico, deve ser prescrito um esquema terapêutico alternativo, como a associação doxiciclina e quinina (WOOLTORTON, 2002).

Alterações laboratoriais como diminuição do hematócrito, elevação passageira das transaminases, leucopenia e trombocitopenia podem, possivelmente, ser atribuídas ao uso do fármaco (LARIAM, 2004). De acordo com Rendi-Wagner et al. (2002), pacientes também podem apresentar aumento significativo de sódio, cloreto, cálcio, bilirrubina, gama glutamiltransferase e LDH.

A carboximefloquina contribui apenas com pequena parte dos efeitos adversos por possuir volume de distribuição aparente menor que o fármaco original (SCHWARTZ et al., 1982).

Ressalta-se que como a mefloquina apresenta meia vida longa, há possibilidade destes efeitos persistirem ou ocorrerem vários dias após o término do tratamento (MARTIN et al., 1993).

1.6.7. Efeitos tóxicos

A mefloquina demonstrou ser teratogênica em ratos e camundongos em dose de 100 mg/kg/dia. Em coelhos, uma dose de 160 mg/kg/dia foi embriotóxica e teratogênica, e uma dose de 80 mg/kg/dia foi teratogênica, mas não embriotóxica (LARIAM, 2004).

Ainda não há estudos adequados e bem controlados envolvendo mulheres grávidas. No entanto, a experiência clínica atual não revelou a existência de efeito embriotóxico ou teratogênico em humanos (LARIAM, 2004). Entretanto, foi demonstrado aumento na ocorrência de abortos espontâneos nas usuárias de mefloquina (SCHLAGENHAUF, 1999). Assim, como o uso seguro de mefloquina durante o primeiro trimestre de gravidez ainda não foi totalmente estabelecido, o Ministério da Saúde do Brasil (2001), recomenda a administração, com segurança, apenas no segundo e terceiro trimestres de gestação.

1.6.8. Contra-indicações

A mefloquina não deve ser prescrita como medicação profilática em: pacientes que tenham antecedentes de convulsão, depressão ativa, história recente de depressão, ansiedade generalizada, psicose, esquizofrenia ou outras desordens psiquiátricas; naqueles com história de hipersensibilidade à mefloquina e compostos relacionados como quinina e quinidina, ou a algum excipiente contido na formulação; pacientes que tenham recebido tratamento recente com quinina ou halofantrina, devido ao risco de convulsões ou cardiotoxicidade ou que tenham recebido tratamento com mefloquina nos últimos 21 dias e naqueles que apresentem arritmias cardíacas ou exerçam tarefas que exija boa coordenação e discriminação espacial (tripulantes de aeronaves, operadores de máquinas, motoristas, dentre outros) (BRASIL/MS/FNS, 2001; LARIAM, 2004).

1.7. CONCENTRAÇÕES DE MEFLOQUINA NOS COMPARTIMENTOS SANGUÍNEOS.

Segundo Tajerzadeh e Cutler (1993), a afinidade e a concentração de mefloquina nos compartimentos sanguíneos apresentam resultados controversos. Algumas pesquisas

apontam uma proporção plasma e eritrócito próximo de 1, enquanto outros indicam uma extensiva acumulação nos eritrócitos.

Antimaláricos como a mefloquina, que contém anfifílicos catiônicos na sua composição, se acumulam em elevados níveis nos lisossomos, interagindo com fosfolipídios presentes na membrana dos eritrócitos (GINSBURG; KRUGLIAK, 1988). Por outro lado, a mefloquina também apresenta alta afinidade pelas proteínas plasmáticas, a qual se liga em torno de 98% (SALLES; SALLES, 2000).

Vidrequin et al (1996), examinaram a estereoespecificidade cinética dos isômeros da mefloquina *in vitro*, e observaram que a entrada do fármaco no eritrócito ocorre rapidamente, através de um mecanismo passivo associado a sua alta ligação à membrana. Quando plasma foi adicionado ao meio, a passagem pela membrana eritrocitária diminuiu, provavelmente, devido a forte ligação às proteínas plasmáticas.

Segundo Rozman et al. (1978), após administração oral de hidrocloreto de mefloquina marcado com C14 em ratos fêmeas, a concentração do fármaco nos eritrócitos foi aproximadamente cinco vezes maior que no plasma.

No interior do eritrócito, a mefloquina se acumula, principalmente, no vacúolo parasitóforo e no citoplasma do parasita (ADOVELANDE et al, 1994). O fármaco também pode se ligar a hemoglobina, mas com menor afinidade. No entanto, devido à alta concentração desta proteína, este pode ser um compartimento importante na célula vermelha. A troca de fármaco entre hemoglobina e a membrana do eritrócito é rápida e pode ter um papel importante na biodisponibilidade da droga ao parasita (GEORGE et al., 1984).

1.8. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas o aparecimento e a propagação de parasitas resistentes à grande parte dos antimaláricos disponíveis, a redução dos investimentos financeiros na síntese de novos quimioterápicos e as dificuldades para produção de vacinas eficazes, constituíram um desafio à terapêutica antimalárica (CRAVO; ROSÁRIO, 2002).

Na ausência de novos medicamentos, grande parte da produção científica atual se destina à busca por novas estratégias para o aperfeiçoamento das políticas de tratamento e controle da doença. Um importante instrumento é a monitorização das concentrações plasmáticas dos medicamentos visando maior conhecimento da cinética dos diversos antimaláricos, objetivando alcançar o tratamento ótimo, isto é, o efeito terapêutico rápido com reduzido riscos de toxicidade (MELLO, 2004).

Neste sentido, o conhecimento da disposição de mefloquina nos dois compartimentos sanguíneos (plasma e hemácia) é de fundamental importância para uma melhor avaliação, uma vez que a distribuição da droga nas diferentes frações sanguíneas pode influenciar diretamente a concentração do medicamento no sítio de ação.

Atualmente a maioria das informações são derivadas de pesquisas utilizando teste *in vitro* ou amostras de animais e voluntários adultos saudáveis. A extrapolação direta destes resultados para pacientes com malária causada por *P. falciparum* deve ser feita com cautela haja vista que, foi demonstrada diferença entre alguns aspectos farmacocinéticos da mefloquina em voluntários saudáveis e pacientes com malária falciparum (LOOAREESUWAN et al, 1982; KARBWANG et al, 1987; JUMA; OGETO, 1989). Além disso, eritrócitos de animais não são iguais aos dos seres humanos e a distribuição da droga nas frações sanguíneas também difere entre eles (HINDERLING, 1997).

Como a quimioterapia deverá permanecer por muito tempo, um importante instrumento no controle desta doença, é fundamental monitorar *in vivo* as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina e seu metabólito em pacientes com malária *falciparum*, a fim de se observar o comportamento cinético destas substâncias em grupos étnicos diversos, somado a ausência de estudos na população brasileira referente à associação mefloquina e artesunato.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Determinar as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina e carboximefloquina em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* não complicada.

2.2. ESPECÍFICOS

- Validar a metodologia analítica para determinação de mefloquina e carboximefloquina por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Determinar as concentrações plasmáticas (D3 e D42) e eritrocitárias (D3) de mefloquina e carboximefloquina em adultos e crianças com malária por *P. falciparum*;
- Avaliar se as concentrações plasmáticas de mefloquina encontram-se acima da concentração inibitória mínima para *P. falciparum*;
- Estabelecer a relação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina e carboximefloquina nas crianças e nos adultos;
- Correlacionar os níveis plasmáticos e eritrocitários de mefloquina e carboximefloquina nas crianças e nos adultos com malária por *P. falciparum*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no estado do Amapá, localizado ao norte da região Amazônica. Esta área é considerada de alto risco para transmissão da malária falciparum, sendo uma das principais contribuintes para a sua ocorrência no ano de 2006 (Figura 09) (Brasil/MS/SVS, 2007b).

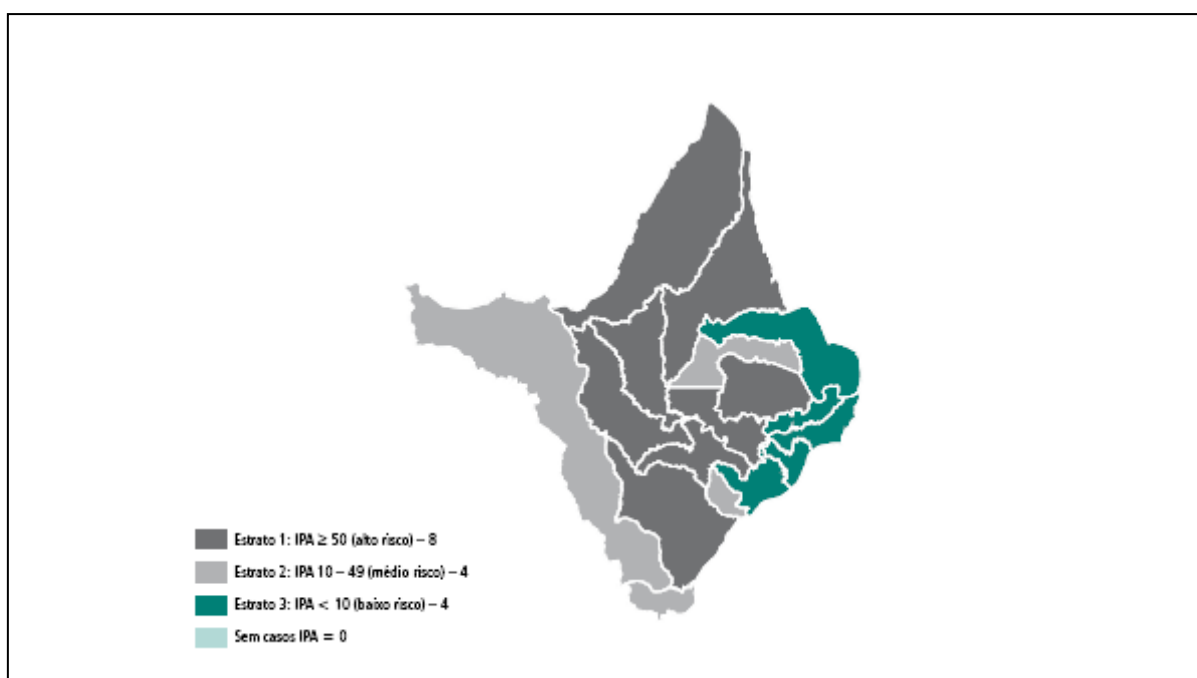


Figura 09: Estratificação nos municípios do Amapá, 2006.

Fonte: Brasil/MS/SVS, 2007b.

3.2. CASUÍSTICA

No período de agosto de 2005 a agosto de 2006 foram selecionados 39 pacientes atendidos no Centro de Referência em Doenças Tropicais (CRDT) – Macapá/AP, de ambos os sexos, com idades entre 08 e 74 anos, residentes e domiciliados no estado do Amapá e seus arredores, com diagnóstico de malária por *P. falciparum*, confirmado através

do exame da gota espessa. Todos os pacientes que participaram do estudo ainda não haviam iniciado o tratamento e a administração foi supervisionada pelo projeto RAVREDA.

3.2.1. Fatores de exclusão

Foram excluídos do estudo, pacientes que apresentaram doença crônica ou infecciosa concomitante, portadores de malária vivax, mista ou falciparum grave, aqueles que apresentaram histórico de hipersensibilidade a mefloquina, gestante, lactantes e que recusaram assinar o Termo de Consentimento e/ou discordaram de qualquer etapa do estudo.

Todos os voluntários que aceitaram participar do estudo responderam a ficha de inclusão e acompanhamento do paciente, para avaliação do perfil da resposta terapêutica dos medicamentos utilizados no tratamento da malária sem complicações no Brasil.

3.3. ESQUEMA TERAPÊUTICO

Todos os pacientes seguiram esquema terapêutico alternativo para o tratamento da malária falciparum não complicada, empregado recentemente na região. Pacientes adultos tomaram doses fixas de Artesunato 4,0 mg/Kg em D0, D1 e D2, e 2 comprimidos de 250 mg de Cloridrato de Mefloquina, correspondendo a 20 mg/Kg via oral durante o primeiro dia (D1) e 2 comprimidos no segundo dia (D2). Pacientes com idade inferior a 15 anos seguiram o esquema de mefloquina apresentado na Figura 06 (BRASIL/MS/FNS, 2001) e mantiveram a mesma dose de artesunato.

3.4. AMOSTRAS

O universo amostral foi composto por 39 pacientes dos quais foram obtidos amostras de sangue para análise no estudo.

Na avaliação da correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina (MQ) e carboximefloquina (CMQ), foram selecionados 29 pacientes (22 adultos e 07 crianças).

Para determinação do quimioterápico e seu metabólito foram coletados 10 mL de sangue venoso em tubo de vidro contendo heparina como anticoagulante. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm para separar o plasma das hemácias e foram imediatamente armazenadas em tubos tipo eppendorf a -5 °C até processamento (KAPETANOVIC et al., 1983). Nos eritrócitos foi adicionado 1,0 mL de glicerolato e armazenados em tubos eppendorf a - 5 °C até processamento.

A coleta foi realizada antes da administração da droga (D0), três dias (D3) e quarenta e dois dias (D42) após a instituição da terapia. Em seguida, as amostras foram transferidas para Belém e analisadas no Laboratório de Toxicologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará – UFPA.

3.5. PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA

As determinações de MQ e CMQ foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia descrita por Bergqvist et al. (1988) e Green et al. (1999), com modificações.

Para garantir que o método analítico empregado gerasse resultados confiáveis e seguros, foi realizada a validação da técnica, seguindo-se os principais parâmetros propostos pelas agências regulamentadoras (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003; Food and Drug Administration, 2001) para análise de fármacos em fluídos biológicos, como: tempo de retenção, limite de detecção e de quantificação, linearidade, recuperação, curva de calibração, precisão, interferente, estabilidade e robustez.

3.5.1 Reagentes e soluções de referência

O padrão de mefloquina foi adquirido da Sigma (Sigma-Aldrich, Inc. St Louis, Mo), de carboximefloquina foi gentilmente cedido pelo CDC (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA doado por Walter Reed Institute for Medical Research) e quinidina (Padrão Interno) foi obtido da Sigma (Sigma-Aldrich, Inc. St Louis, Mo). Hidróxido de sódio 2,0M foi adquirido da Labsynth (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, São Paulo). O ácido orto-fosfórico 50% da Vetec (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro) e trietilamina da Merck (Merck, Hohenbrunn, Alemanha). Todos os reagentes foram preparados em água ultrapura. Os solventes utilizados foram de grau cromatográfico, o metanol foi obtido da J.T.Baker (Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ) e o éter metil terc butílico da Vetec (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro).

3.5.2. Preparação das soluções-padrão

3.5.2.1 Soluções estoque

As soluções estoques de MQ em concentração de 1,0 mg/mL, CMQ de 46 µg/mL e do padrão interno (quinidina) de 1,0 mg/mL, foram preparadas pela dissolução dos respectivos sais em volume apropriado de metanol.

3.5.2.2 Soluções de trabalho

As soluções estoque de MQ, CMQ e QI foram diluídas em metanol, a fim de obter concentrações de 25 µg/mL; 25 µg/mL e 21 µg/mL, respectivamente.

Todas as soluções padrões foram acondicionadas a – 5 °C e protegidas da luz em frasco âmbar, envolto em papel alumínio durante o processo.

3.5.3. Aparelhos e equipamentos

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido VARIAN® composto de módulo de bombeamento isocrático ProStart 300, injetor manual reodine com

loop de 20ul, detector duplo canal Ultravioleta e Visível ProStar 220. A aquisição dos dados foi realizada em software Star Chromatography Workstation[®].

A coluna foi uma X-terra[®], RP18 com 5 µm e 4.6 x 150 mm. Também foram utilizados: ultra-som, Q-335D, Quimis[®]; agitador de tubos vortex, Q-22OB1, Quimis[®]; centrífuga, 2K15, Sigma Laborzentrifugen[®]; peagâmetro digital PHS-EB, Phtek[®]; balança, VL-1mg, Acculab[®]; geladeira, 280L, Cònsul[®]; estufa- Quimis[®]; pipetas automáticas 200, 1000 e 2000 µl e vidrarias comuns de laboratório.

3.5.4. Condições cromatográficas

A fase móvel consistiu de uma mistura isocrática de metanol e solução aquosa de trietilamina 0,01 M (60:40, v/v) pH 5,5, ajustado com ácido orto-fosfórico a 50%. A solução preparada foi submetida à filtração e degaseificação em ultra-som por 10 minutos antes do uso. O fluxo utilizado foi 1,0 mL/min e comprimento de onda de 222 nm (BERGQVIST et al., 1988; GREEN et al., 1999).

3.5.5. Procedimento de extração de mefloquina e carboximefloquina da matriz biológica

Para extração de MQ e CMQ do plasma sanguíneo ou do concentrado de hemácias foi utilizada uma alíquota de 250µL de cada amostra, que foi transferida para tubo de ensaio de capacidade de 5mL com rosca de teflon. A seguir, foi adicionado 50 µL do padrão interno e 50 µL de hidróxido de sódio 2,0 M. Foi agitado em vórtex por 30 segundos e adicionado 2,0 mL de éter metil terc butílico (MTBE). A solução foi levada ao homogeneizador durante 10 minutos e em seguida centrifugada por 10 minutos a 2500 rpm (BERGQVIST et al., 1988; GREEN et al., 1999).

A fase orgânica (sobrenadante) foi tranferida para tubo tipo eppendorf e evaporada em banho-maria a 55°C. O resíduo foi ressuspendido com 100 µL da fase móvel, agitado em

vórtex por 30 segundos, e um volume de 50 µL foi injetado no cromatógrafo, seguindo-se as condições instrumentais descritas em 3.5.4 (BERGQVIST et al., 1988; GREEN et al., 1999).

O fluxograma do procedimento analítico encontra-se descrito na Figura 10.

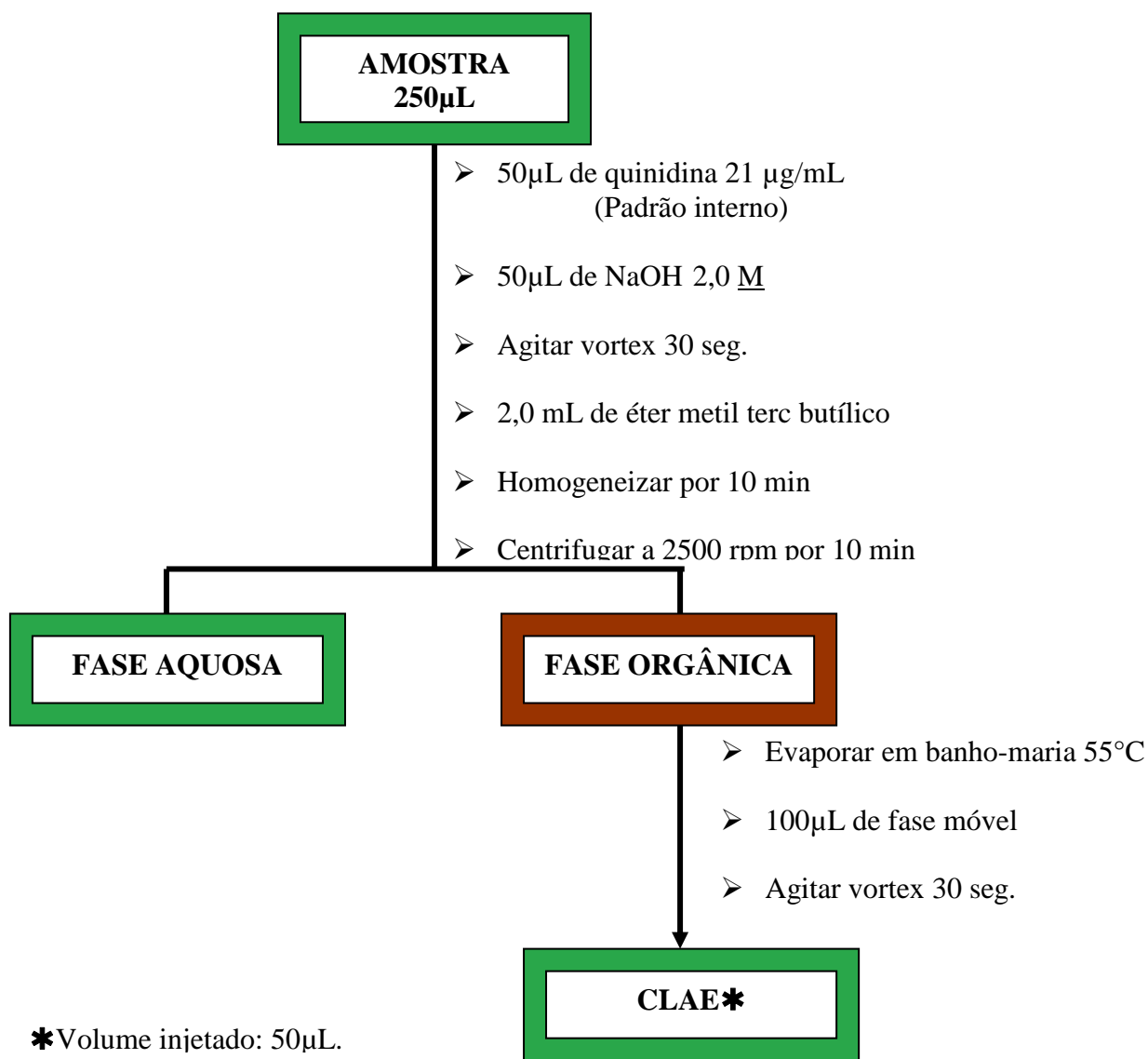


Figura 10: Fluxograma do procedimento analítico para determinação de mefloquina e carboximefloquina.

3.5.6. Determinação das concentrações de mefloquina e carboximefloquina

As concentrações de MQ e CMQ foram determinadas a partir da relação entre as áreas dos picos dos referidos fármacos e do padrão interno, que foi plotado na curva de calibração, para obtenção das concentrações de interesse.

3.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Após a definição do método de extração e da padronização das condições cromatográficas para determinação da MQ e CMQ, procedeu-se a validação do método para garantia da confiabilidade e segurança dos resultados obtidos.

3.6.1. Tempo de retenção

O tempo de retenção da MQ, CMQ e do padrão interno (PI) foi determinado através da injeção no cromatógrafo de 50µL das soluções padrões, em concentração de 5,0 µg/mL, CMQ de 5,0µg/mL e PI de 2,1µg/mL, em triplicata, seguindo as condições cromatográficas previamente descritas no item 3.5.4.

3.6.2. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção foi determinado por meio de diluições sucessivas das soluções de trabalho da MQ e CMQ. Foram realizadas dez injeções de cada solução diluída no cromatógrafo. O limite de detecção foi considerado três vezes o desvio padrão da linha de base (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

O limite de quantificação da MQ e CMQ foi determinado fortificando amostras de plasma nas concentrações de 1,25; 0,5 e 0,25 µg/mL de cada substância, as quais foram submetidas ao procedimento de extração descrito em 3.5.5. As relações das áreas das substâncias de interesse e do padrão interno nas diversas concentrações foram empregadas

para obtenção dos coeficientes de variação. O limite de quantificação foi considerado aquele que apresentou coeficiente de variação igual ou inferior a 15% (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

3.6.3. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada empregando-se concentrações crescentes das soluções de trabalho de MQ e CMQ, em intervalo de 0,25 µg/mL a 10 µg/mL que juntamente com o padrão interno, foram transferidas para tubos eppendorf e injetadas, em volume de 50 µL, no cromatógrafo. As injeções foram feitas em quintuplicata. As relações das áreas de cada substância e do padrão interno (MQ/PI e CMQ/PI) foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e expressa por $y = a + bx$, onde o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y. Já a faixa linear de trabalho foi determinada por intermédio do coeficiente de correlação de Pearson (r) (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

3.6.4. Curva de calibração

Para a elaboração da curva de calibração foram utilizados plasma e eritrócito brancos de referência, obtidos a partir de diversas amostras oriundas do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará, coletadas de pacientes que relataram não estar fazendo uso de qualquer medicamento.

A curva foi construída utilizando o plasma previamente enriquecido com MQ e CMQ nas concentrações de 0,5 µg/mL a 10 µg/mL. No caso dos eritrócitos, foram utilizadas amostras de hemácias fortificadas com as substâncias de interesse nas concentrações de 0,5 µg/mL a 5,0 µg/mL. A seguir, foram agitadas em vórtex por 3 minutos, e submetidas ao procedimento de extração descrito em 3.5.5 (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

Os ensaios foram realizados em quintuplicata e as relações das áreas de cada substância de interesse e do padrão interno foram projetadas no eixo da ordenada e as concentrações na abscissa. A regressão linear foi feita para obtenção da equação da reta e o coeficiente de Pearson (r) foi calculado para estabelecer a correlação entre as concentrações dos fármacos e as respectivas relações das áreas do analito e do padrão interno (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

3.6.5. Recuperação absoluta

A recuperação absoluta da MQ e da CMQ que avalia a eficiência da extração dos analitos de interesse, foi obtida utilizando amostras enriquecidas com soluções de MQ e de CMQ nas concentrações de 0,5 µg/mL a 5,0 µg/mL. As áreas de MQ e CMQ obtidas após extração (item 3.5.5) foram comparadas com aquelas resultantes da injeção direta no cromatógrafo das soluções padrões nas respectivas concentrações (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

Os resultados foram expressos em porcentagem da área da amostra extraída em relação aquela da solução injetada, que representa 100%. Os ensaios foram realizados em quintuplicata (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

3.6.6. Precisão intraensaio e interensaio

A precisão intraensaio foi determinada, analisando-se amostras de plasma fortificadas com MQ e CMQ, em concentrações de 0,5 a 5,0 µg/mL. A análise foi realizada em quintuplicata para cada concentração e submetida à extração conforme descrito em 3.5.5. Foram calculados os valores do coeficiente de variação para cada dia de análise (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

O estudo de precisão interensaio foi realizado analisando amostras de plasma fortificadas com MQ e CMQ nas concentrações de 0,5 a 5,0 µg/ mL de plasma, em quintuplicata por três dias consecutivos. No cálculo da precisão interensaio foram obtidos os valores do coeficiente de variação das concentrações durante os três dias de estudo (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

3.6.7. Interferentes

Para identificar a possível interferência de outros quimioterápicos administrados no tratamento da malária, as soluções padrões de quinina, doxiciclina e cloroquina, em concentrações terapêuticas, foram submetidas à técnica cromatográfica nas condições padronizadas descritas no item 3.4.4, aguardando-se um tempo de desenvolvimento de vinte minutos (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

3.6.8. Estabilidade da mefloquina e carboximefloquina

A estabilidade da MQ e CMQ foi avaliada empregando-se amostras de plasma enriquecido com concentrações de 5,0 e 2,5 µg/mL de MQ e CMQ, em quintuplicata. Para realização do estudo de estabilidade em função do tempo de análise, as amostras foram congeladas a – 10 °C por 24 horas e então submetidas a descongelamento durante 12 horas sobre a bancada de trabalho, na temperatura média de 27 °C. Na avaliação da estabilidade durante ciclos de congelamento, as amostras foram congeladas por 24 horas, em seguida descongeladas a temperatura ambiente e depois novamente submetidas a – 10 °C por 12 horas. Este ciclo foi repetido duas vezes. Por fim, os analitos foram quantificados e os valores

comparados aqueles obtidos no dia de preparação das amostras. Ressalta-se que o padrão interno foi adicionado no momento da realização das análises (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

3.6.9. Robustez

A robustez da técnica foi analisada para se determinar possíveis alterações que podem ocorrer quando o método é transferido para outros laboratórios ou realizado por analistas e equipamentos diferentes. Foram avaliados: alterações na concentração do solvente orgânico e pH da fase móvel (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação das concentrações plasmáticas e eritrocitárias de MQ e CMQ obtidas nas amostras foram utilizados testes estatísticos paramétricos e não paramétricos. Na comparação das concentrações de MQ e CMQ nos diferentes dias foi utilizado teste *t* de Student. Para determinar a correlação entre os teores destes analitos nas amostras de eritrócito e plasma foi empregada a correlação de Pearson (*r*). Na validação da técnica foi realizada análise estatística descritiva e de variância (ANOVA) para o teste de estabilidade. Os dados foram analisados no programa de estatística Bioestat 4.0 (AYRES et al, 2005) EXCEL® e INSTAT®. O nível de significância aceito foi de 5%.

3.8. ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi desenvolvido com amostras biológicas coletadas para as pesquisas associadas ao projeto RAVREDA, aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa do Instituto

Evandro Chagas (Anexo I). O estudo foi realizado em conformidade com os preceitos da Declaração de Helsinque, do Código de Nuremberg e das Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 196/96) do Conselho Nacional de Saúde. Cada paciente, candidato ao presente estudo, assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aceitando participar da pesquisa e teve sua identidade mantida em sigilo (Anexo II).

4. RESULTADOS

4.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

4.1.1. Tempos de retenção da mefloquina, carboximefloquina e quinidina.

Os tempos de retenção das soluções padrões de MQ, CMQ e PI, segundo condições previamente padronizadas, estão apresentados na Tabela 01 e o cromatograma está ilustrado na Figura 11.

TABELA 01: Tempo de retenção das soluções padrões de MQ (25 µg/mL), CMQ (25 µg/mL) e PI (21 µg/mL), segundo condições cromatográficas previamente padronizadas.

Fármaco	n	Retenção (min)
Quinidina (A)	3	2,6
Carboximefloquina (B)	3	3,3
Mefloquina (C)	3	5,8

n= número de determinações

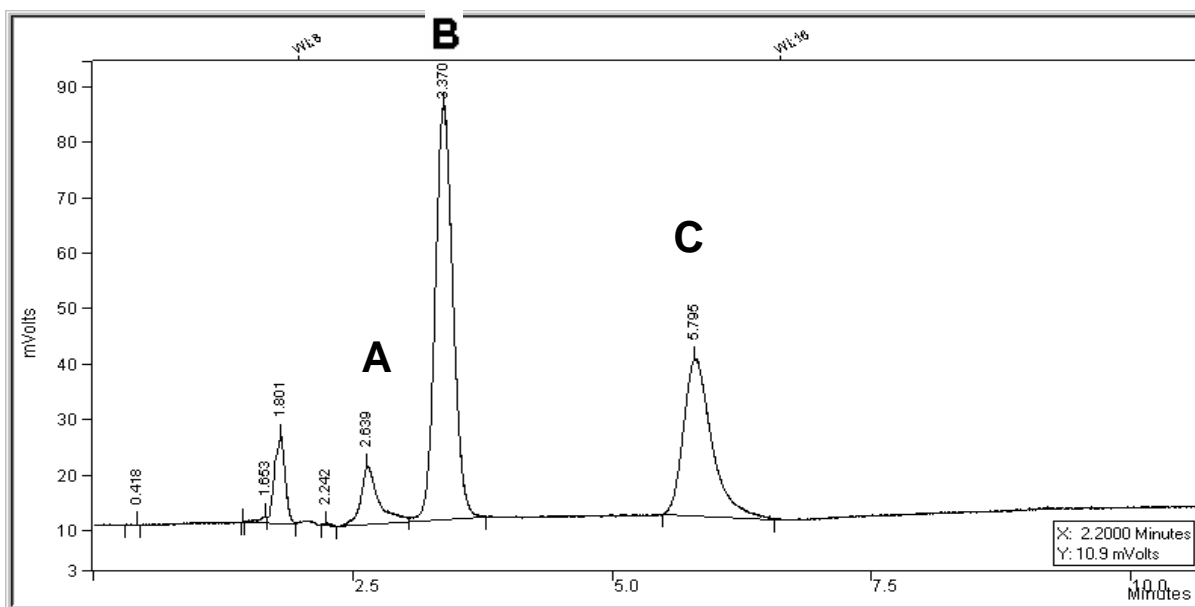


Figura 11: Cromatograma das soluções padrões de mefloquina (25 µg/mL) (C), carboximefloquina (25 µg/mL) (B) e quinidina (21 µg/mL) (A), segundo condições cromatográficas previamente padronizadas.

4.1.2. Limite de detecção

O limite de detecção para MQ e CMQ foi 0,20 µg/mL.

4.1.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação para MQ e CMQ foi 0,25 µg/mL.

4.1.4. Linearidade

A linearidade da resposta do detector frente às diversas concentrações de MQ e CMQ está apresentada na Tabela 2 e 3 e as representações gráficas nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

A equação da reta foi $Y = -0,1449 + 0,4346X$ e coeficiente de correlação de 0,9969 para MQ e $Y = -0,1759 + 0,8032X$ e coeficiente de correlação de 0,9984 para CMQ.

TABELA 2: Linearidade da mefloquina

Mefloquina µg/mL	n	Relação das áreas Amostra/Padrão interno
10,0	5	4,218
5,0	5	2,109
2,5	5	0,713
1,25	5	0,330
0,5	5	0,164
0,25	5	0,068

n= número de determinações

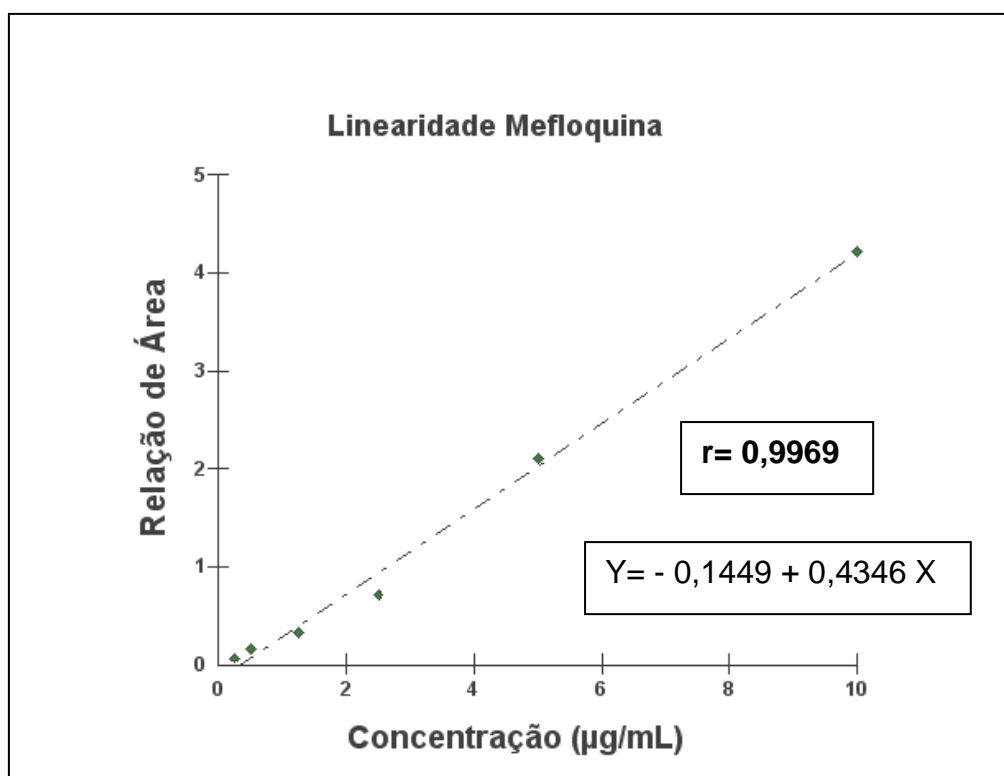


Figura 12: Linearidade da mefloquina.

TABELA 3: Linearidade da carboximefloquina

Carboximefloquina µg/mL	n	Relação das áreas Amostra/Padrão interno
10,0	5	7,993
5,0	5	3,663
2,5	5	1,616
1,25	5	0,788
0,5	5	0,371
0,25	5	0,175

n= número de determinações

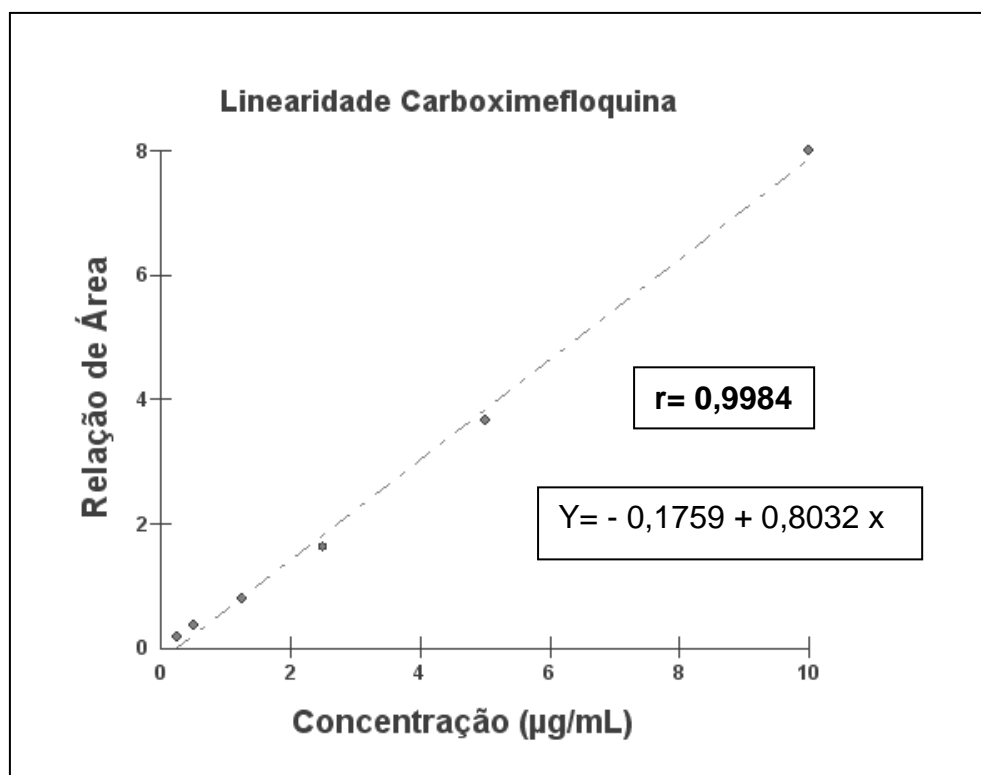


Figura 13: Linearidade da carboximefloquina.

4.1.5. Curvas de calibração

As curvas de calibração de MQ e CMQ estão apresentados na Tabela 4 e 5 e ilustradas nas Figuras 14 e 15. Para MQ a equação da reta foi $Y = -0,0716 + 0,2424 X$ e o coeficiente de correlação igual a 0,9957. Já para CMQ a equação da reta foi $Y = -0,2169 + 0,6516x$ e o coeficiente de correlação (r) de 0,9977.

TABELA 04: Curva de calibração da mefloquina no plasma.

Mefloquina µg/mL	n	Relação das áreas Amostra/Padrão interno
10,0	5	2,298
5,0	5	1,285
2,5	5	0,499
1,25	5	0,143
0,7	5	0,135
0,5	5	0,050

n= número de determinações

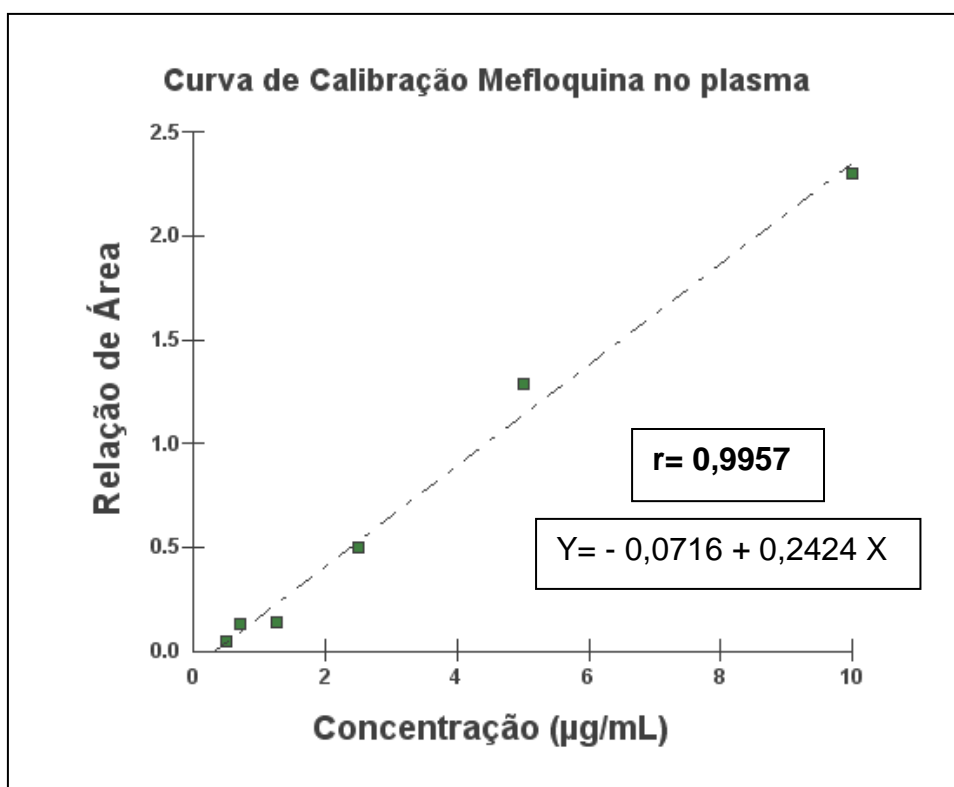


Figura 14: Curva de calibração da mefloquina no plasma.

TABELA 05: Curva de calibração da carboximefloquina no plasma.

Carboximefloquina µg/mL	n	Relação de áreas Amostra/Padrão interno
10,0	5	6,172
5,0	5	3,343
2,5	5	1,398
1,25	5	0,445
0,7	5	0,224
0,5	5	0,117

n= número de determinações

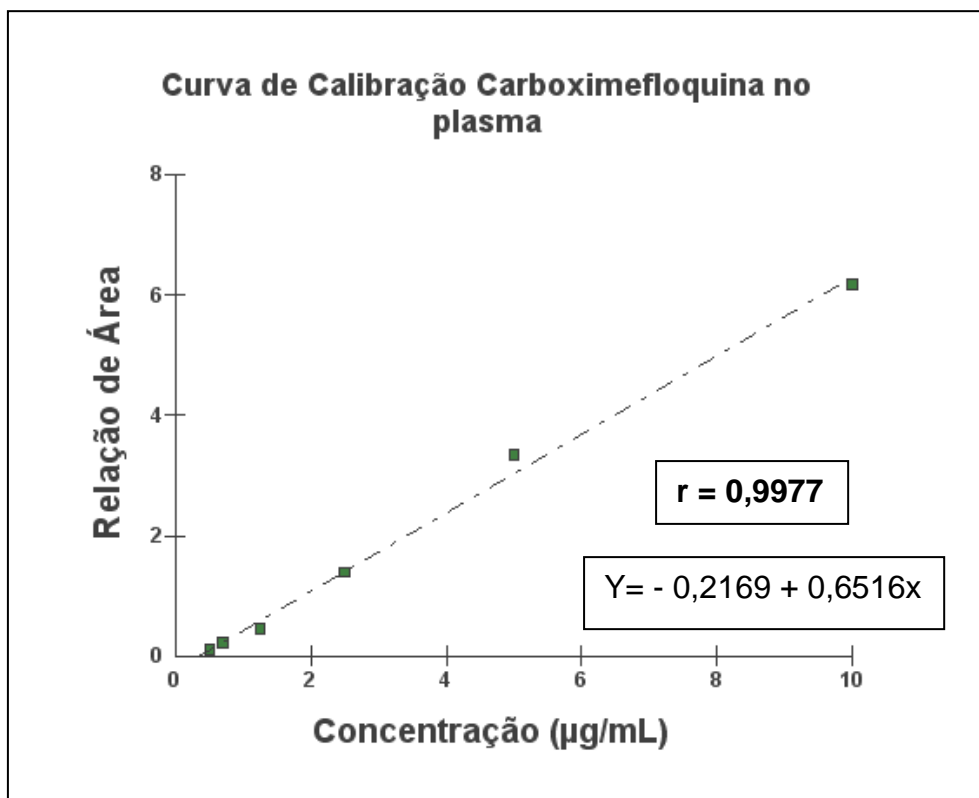


Figura 15: Curva de calibração da carboximefloquina no plasma.

As curvas de calibração de MQ e CMQ nos eritrócitos estão apresentadas na Tabela 6 e 7 e ilustradas nas Figuras 16 e 17. Para MQ, a equação da reta foi $Y = -0,0035 + 0,0144 X$ e o coeficiente de correlação (r) de 0,9915. Já CMQ, a equação da reta foi $Y = -0,0411 + 0,1410X$ e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9904.

TABELA 06: Curva de calibração da mefloquina nos eritrócitos.

Mefloquina µg/mL	n	Relação das áreas Amostra/Padrão interno
5,0	5	0,0670
2,5	5	0,0375
1,25	5	0,0107
0,5	5	0,0042

n= número de determinações

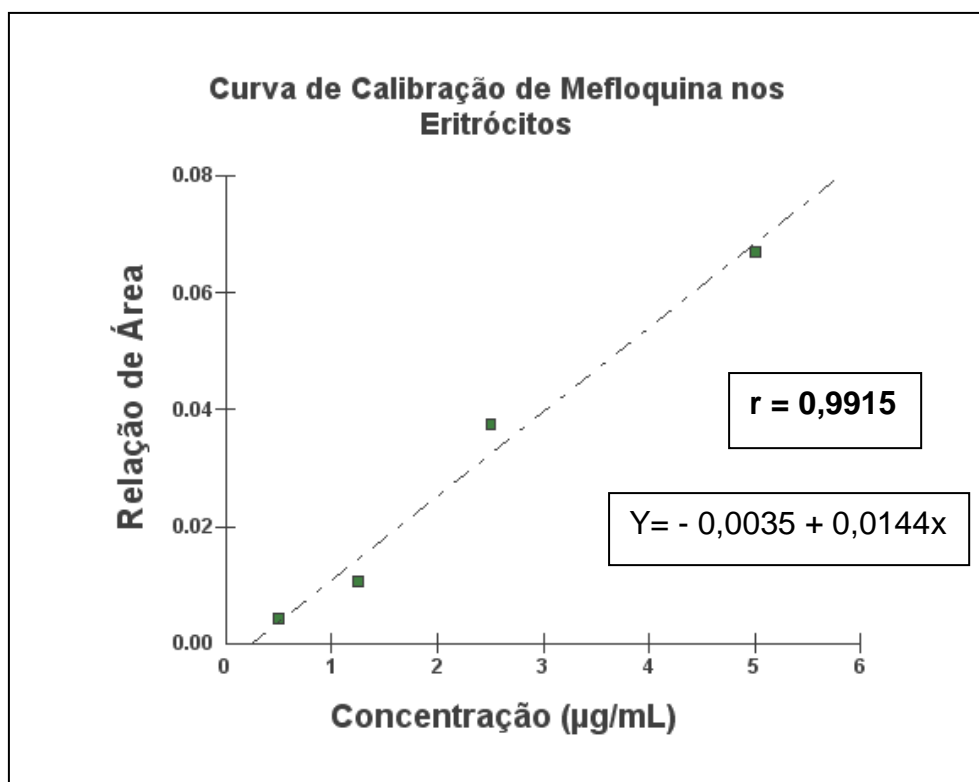


Figura 16: Curva de calibração da mefloquina nos eritrócitos.

TABELA 07: Curva de calibração da carboximefloquina nos eritrócitos.

Carboximefloquina µg/mL	n	Relação das áreas Amostra/Padrão interno
5,0	5	0,653
2,5	5	0,354
1,25	5	0,0869
0,5	5	0,0460

n= número de determinações

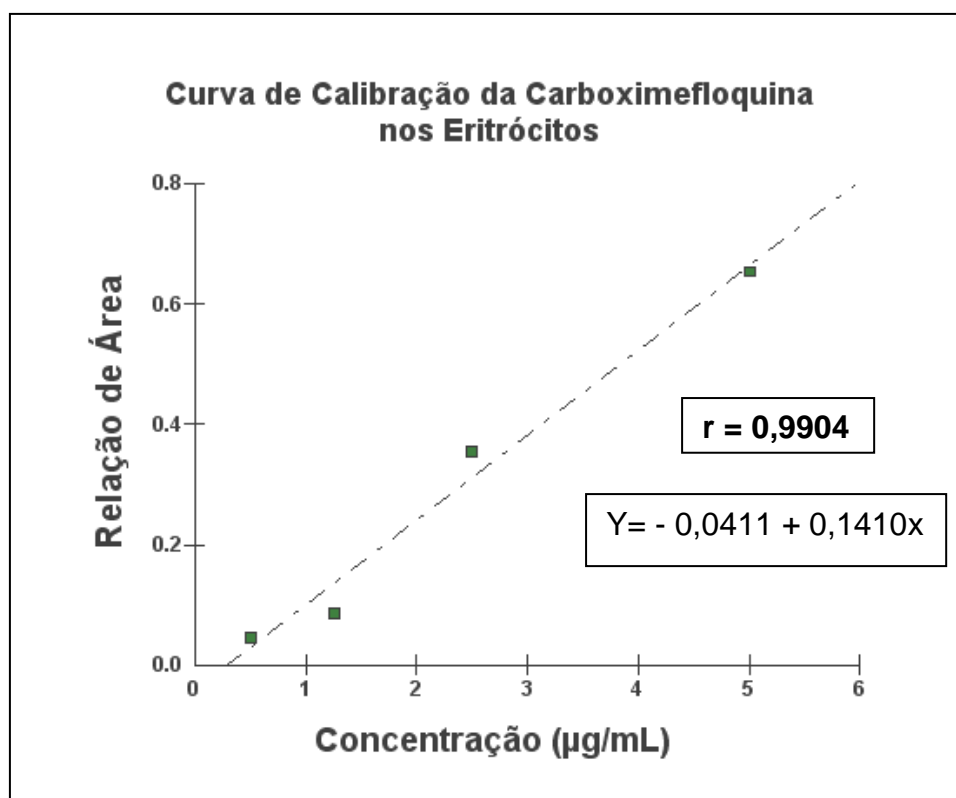


Figura 17: Curva de calibração da carboximefloquina nos eritrócitos.

4.1.6. Recuperação absoluta da mefloquina e carboximefloquina

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da recuperação absoluta de MQ e CMQ, nas diversas concentrações avaliadas.

TABELA 08: Recuperação absoluta da mefloquina e carboximefloquina

Mefloquina µg/mL	n	Recuperação (%)	Carboximefloquina µg/mL	n	Recuperação (%)
5,0	5	92,66	5,0	5	102,1
2,5	5	97,62	2,5	5	109,2
1,25	5	93,54	1,25	5	94,32
0,5	5	94,41	0,5	5	92,44

n= número de determinações

4.1.7. Estudo da precisão

As Tabelas 9 e 10 mostram os resultados obtidos nos ensaios de precisão. Pode ser observado que os coeficientes de variação para MQ e CMQ mantiveram-se abaixo de 15% aceitável para análise de fármacos em fluidos biológicos.

TABELA 09: Precisão intraensaio e interensaio da mefloquina expressa como coeficiente de variação.

Mefloquina µg/mL	n	Coeficiente de Variação INTRAENSAIO (%)	n	Coeficiente de Variação INTERENSAIO (%)
5,0	5	3,83	15	8,51
2,5	5	10,55	15	12,14
1,25	5	13,75	15	12,44
0,5	5	8,98	15	15,29

n= número de determinações

TABELA 10: Precisão intraensaio e interensaio da carboximefloquina, expressa como coeficiente de variação.

Carboximefloquina µg/mL	n	Coeficiente de Variação INTRAENSAIO (%)	n	Coeficiente de Variação INTERENSAIO (%)
5,0	5	3,13	15	4,87
2,5	5	5,39	15	6,75
1,25	5	2,49	15	5,02
0,5	5	13,51	15	13,61

n= número de determinações

1.8. Interferentes

A Tabela 11 mostra o tempo de retenção da MQ, CMQ e de outros fármacos antimaláricos.

TABELA 11: Tempo de retenção dos fármacos de interesse, de acordo com as condições cromatográficas padronizadas para determinação de mefloquina e carboximefloquina.

Fármaco	Tempo de retenção (minutos)
Mefloquina	5,8
Carboximefloquina	3,3
Quinidina	2,6
Doxiciclina	NE
Cloroquina	NE
Quinina	2,8

N.E: Não eluiu nas condições cromatográficas padronizadas

4.1.9. Estabilidade

De acordo com a Tabela 12, pode-se verificar a estabilidade da MQ e CMQ após três ciclos de congelamento a -10 °C e à temperatura ambiente por um período de 12 horas.

TABELA 12: Estabilidade da mefloquina e carboximefloquina no plasma após ciclos de congelamento e à temperatura ambiente.

Concentração (µg/mL)	n	Amostra recente	Ciclos de congelamento	Temperatura ambiente	Valores de <i>p</i>*
Mefloquina					
5,0	5	1,09	1,06	1,28	0,30
2,5	5	0,45	0,58	0,46	0,13
Carboximefloquina					
5,0	5	3,41	3,53	3,51	0,97
2,5	5	1,25	1,18	1,03	0,31

*Análise pelo teste ANOVA com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

n= número de determinações

4.1.10. Robustez

Para avaliação da robustez do procedimento foram variados o pH da fase móvel em 6,0, 5,5 e 5,4 e a concentração do solvente orgânico, metanol, nas proporções de 50:50 (v/v) e 60:40 (v/v). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13: Avaliação da robustez do método por CLAE – alterações no valor de pH e na proporção dos solventes, de acordo com as condições cromatográficas previamente padronizadas.

Variação	Tempo de Retenção (min)			
	n	Quinidina	Carboximefloquina	Mefloquina
Água : MeOH (50:50, v/v) 0,01% trietilamina pH= 6,0 (H3PO4 50%)	5	4,0	7,7	11,7
Água : MeOH (40:60, v/v) 0,01% trietilamina pH= 5,5 (H3PO4 50%)	5	2,6	3,3	5,8
Água : MeOH (40:60, v/v) 0,01% trietilamina pH= 6,0 (H3PO4 50%)	5	2,7	3,8	6,3
Água : MeOH (40:60, v/v) 0,01% trietilamina pH= 5,4 (H3PO4 50%)	5	2,2	3,3	6,0

n= número de determinações.

4.2 RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA NAS AMOSTRAS ANALISADAS.

4.2.1. Características Epidemiológicas dos Participantes

No período de agosto de 2005 a agosto de 2006, 39 pacientes portadores de malária por *P. falciparum* não complicada adquirida no estado do Amapá e proximidades foram incluídos no estudo. Destes, nove eram crianças (23,1%) e 30 adultos (76,9%).

A idade média das crianças foi $11,6 \pm 1,8$ anos, com intervalo de 08 a 14 anos, destes 55 % eram do sexo masculino e 45% do sexo feminino.

Os adultos apresentaram idade média de $31,2 \pm 13,6$, com intervalo de 16 a 74 anos, sendo constituído por 66,6% de homens e 33,4% de mulheres.

4.2.2. Determinação das concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina e carboximefloquina nas crianças.

Os resultados da determinação de MQ e CMQ nas 09 amostras de plasma das crianças em D0, D3 e D42 encontram-se na Tabela 14 e a relação entre os teores plasmáticos e eritrocitários de MQ e de CMQ em D3 na Tabela 15. Ressalta-se que, em todos os participantes deste grupo não foram detectadas MQ e CMQ em D0.

As concentrações plasmáticas de MQ em D3 variaram de 0,70 a 3,29 $\mu\text{g/mL}$, com média de $1,84 \pm 0,83$ $\mu\text{g/mL}$. Em D42 foi detectada MQ em três pacientes (33,3%), cujos valores variaram de 0,36 a 0,584 $\mu\text{g/mL}$, com média de $0,45 \pm 0,11$ $\mu\text{g/mL}$. O emprego do teste *t* (Student) demonstrou diferença estatística significativa entre os teores plasmáticos médios de MQ nos dias D3 e D42 ($p = 0.0013$).

Os teores plasmáticos de CMQ em D3 variaram de 0,77 a 2,75 $\mu\text{g/mL}$, com concentração média de $1,44 \pm 0,70$ $\mu\text{g/mL}$. Após quarenta e dois dias foi observada CMQ em

04 pacientes (44,4%), cuja concentração média foi $0,51 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$, com intervalo de 0,36 a $0,59 \mu\text{g/mL}$. O emprego do teste *t* (Student) demonstrou diferença estatística significativa entre os teores de CMQ nos dias D3 e D42 ($p = 0.005$).

A média das relações entre as concentrações plasmáticas de MQ e CMQ foi $1,55 \pm 0,89$ em D3, diminuindo para $0,83 \pm 0,20$ em D42.

Nas sete amostras dos eritrócitos coletadas em D3, os teores de MQ variaram de 4,2 a $8,2 \mu\text{g/mL}$, com média de $5,26 \pm 1,46 \mu\text{g/mL}$. A CMQ foi detectada em quatro pacientes (57,14%) que apresentaram teor médio de $1,18 \pm 0,65 \mu\text{g/mL}$, variando de de 0,35 a $1,78 \mu\text{g/mL}$.

A média da relação entre as concentrações eritrocitárias de MQ e CMQ em D3 foi $5,85 \pm 4,45$.

Foi observada diferença estatística significativa em D3 entre os teores médios de MQ no plasma e nos eritrócitos das crianças ($t= 5,0610$, $p= 0,0003$), o que não foi observado em relação a CMQ ($t= 0,5535$, $p= 0,599$). A média da relação entre as concentrações eritrocitárias e plasmáticas de MQ foi $2,86 \pm 1,27$, ao passo que para CMQ foi de $0,75 \pm 0,26$.

TABELA 14: Concentrações plasmáticas de mefloquina ($\mu\text{g/mL}$) e carboximefloquina ($\mu\text{g/mL}$) em D0, D2 e D3, nas crianças com máalaria por *P. falciparum* não grave, oriundas do Amapá, no período de agosto de 2005 a agosto de 2006.

Participantes	Idade	Mefloquina			Carboximefloquina		
		($\mu\text{g/mL}$)			($\mu\text{g/mL}$)		
		D0	D3	D42	D0	D3	D42
4	08	ND	0,702	0,415	ND	0,771	ND
8	13	ND	2,225	ND	ND	0,785	0,360
16	11	ND	1,820	0,584	ND	1,119	0,597
18	12	ND	3,299	ND	ND	2,752	ND
24	14	ND	2,176	ND	ND	0,889	ND
27	13	ND	1,53	ND	ND	2,428	ND
30	10	ND	0,881	ND	ND	1,457	ND
37	12	ND	1,297	0,365	ND	1,426	0,535
38	12	ND	2,640	ND	ND	1,340	0,576
Média	11,6	0	1,84	0,45	0	1,44	0,51
DP	1,8	0	0,83	0,11	0	0,70	0,10
CV (%)	15,45	0	45,59	25,24	0	49,02	20,85
Mínimo	08	0	0,702	0,365	0	0,77	0,360
Máximo	14	0	3,299	0,584	0	2,75	0,59

ND= Não Determinado; DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de Variação.

TABELA 15: Concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina ($\mu\text{g/mL}$) e carboximefloquina ($\mu\text{g/mL}$) e suas respectivas relações, nas crianças com malária por *P. falciparum* não complicada em D3, oriundas do Amapá, no período de agosto de 2005 a agosto de 2006.

Pacientes	Concentração de		Relação MQ (eritrócito: Plasma)	Concentração de		Relação CMQ (eritrócito: plasma)
	MQ ($\mu\text{g/mL}$)			CMQ ($\mu\text{g/mL}$)		
	Hemácia	Plasma	Hemácia	Plasma		
08	4,26	2,226	1,91	0,354	0,785	0,450
16	6,072	1,820	3,29	0,979	1,119	0,74
18	4,54	3,299	1,37	ND	2,752	-
24	8,28	2,176	3,8	ND	0,889	-
27	4,385	1,53	2,86	1,781	2,428	0,733
30	4,38	0,881	4,97	1,610	1,457	1,105
38	4,92	2,640	1,83	ND	1,340	-
Média	5,26	2,08	2,86	1,18	1,53	0,75
DP	1,46	0,77	1,27	0,65	0,76	0,26
CV (%)	27,92	37,46	44,44	55,07	49,47	35,46
Mínimo	4,2	0,88	1,37	0,354	0,78	0,450
Máximo	8,2	3,29	4,97	1,78	2,75	1,105

ND= Não Determinado; DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de Variação.

A correlação entre as concentrações de MQ no plasma e nos eritrócitos, constantes na Figura 18, apresentou coeficiente de Pearson (r) igual a 0,0584 ($p=0.8962$). Já para CMQ, demonstrada na Figura 19, o referido coeficiente foi 0,8722 ($p=0.1281$).

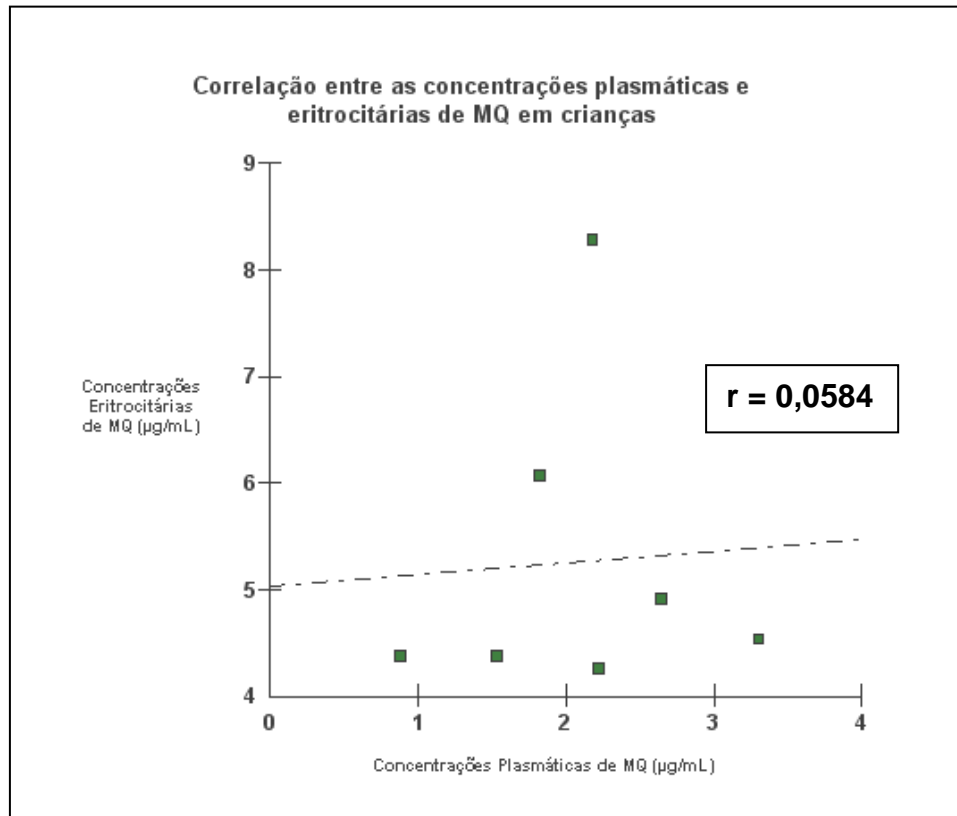


Figura 18: Correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina nas crianças com malária por *P. falciparum* não complicada.

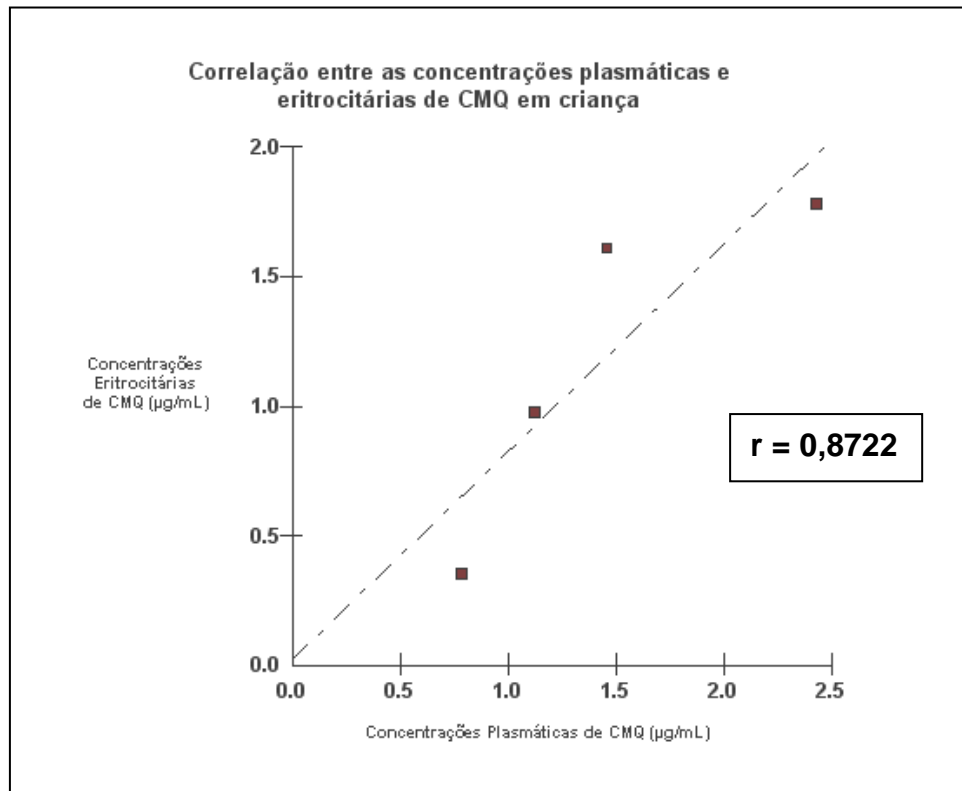


Figura 19: Correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de carboximefloquina nas crianças com malária por *P. falciparum* não complicada.

4.2.3. Concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina e carboximefloquina nos adultos.

Os resultados da determinação de MQ e CMQ no plasma dos pacientes adultos em D0, D3 e D42 encontram-se na Tabela 16 e a relação entre os teores plasmáticos e eritrocitários de MQ e de CMQ em D3 na Tabela 17. De maneira semelhante aos resultados obtidos nas crianças, não foram detectados MQ e CMQ em D0.

As concentrações plasmáticas de MQ em D3 apresentaram valores de 0,77 a 5,1 µg/mL, com média de $2,43 \pm 1,13$ µg/mL. Em D42 a MQ estava presente no plasma de 11

pacientes adultos (36,6%), com concentração média de $0,54 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$, variando de 0,33 a $0,765 \mu\text{g/mL}$.

Já os teores de CMQ em D3 nestes mesmos pacientes variaram de 0,58 a 2,36 $\mu\text{g/mL}$, com valor médio de $1,10 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$. Em D42 16 pacientes (53,3%) apresentaram teor médio de CMQ de $0,58 \pm 0,93 \mu\text{g/mL}$, variando de 0,39 a $0,77 \mu\text{g/mL}$.

Foi observada diferença estatística significativa entre os teores plasmáticos médios de MQ entre os dias D3 e D42 ($t= 8,8033, p < 0,0001$), bem como de CMQ nos mesmos dias ($t= 7,2408, p < 0,0001$).

A média das relações entre as concentrações de MQ e CMQ em D3 foi $2,3 \pm 1,07$, diminuindo para $0,85 \pm 0,37$ em D42.

As concentrações eritrocitárias de MQ e CMQ em D3 foram determinadas em 22 participantes do estudo. Os teores eritrocitários de MQ variaram de 2,1 a 9,89 $\mu\text{g/mL}$, com concentração média de $5,51 \pm 1,92 \mu\text{g/mL}$. A CMQ foi detectada em 45,54% dos pacientes, que apresentaram concentração média de $1,08 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$, variando de 0,72 a 1,68 $\mu\text{g/mL}$.

Foi observada diferença estatística significativa entre os teores médios de MQ no plasma e nos eritrócitos ($t= 7,3401, p < 0,0001$), o que não foi observado em relação a CMQ ($t= 0,1727, p=0,8640$). A média da relação entre as concentrações eritrocitárias e plasmáticas de MQ foi $3,03 \pm 1,56$, ao passo que para CMQ foi de $1,12 \pm 0,29$.

A média da relação entre as concentrações eritrocitárias de MQ e CMQ em D3 foi $5,32 \pm 2,73$.

TABELA 16: Concentrações plasmáticas de mefloquina ($\mu\text{g/mL}$) e carboximefloquina ($\mu\text{g/mL}$) nos adultos com malária por *P. falciparum*, oriundas do Amapá, no período de agosto de 2005 a agosto de 2006.

Participantes	Idade	Concentração de MQ			Concentração de CMQ		
		($\mu\text{g/mL}$)			($\mu\text{g/mL}$)		
		D0	D3	D42	D0	D3	D42
1	40	ND	2,53	ND	ND	0,83	0,56
2	74	ND	2,42	0,74	ND	1,36	0,705
3	38	ND	1,74	ND	ND	1,05	ND
5	57	ND	1,55	ND	ND	1,50	ND
6	20	ND	1,30	0,34	ND	0,90	0,58
7	22	ND	1,31	0,53	ND	0,72	ND
9	22	ND	2,15	0,70	ND	2,36	0,57
10	30	ND	4,15	ND	ND	1,39	0,68
11	39	ND	1,94	ND	ND	0,86	ND
13	30	ND	1,08	ND	ND	0,58	0,52
15	31	ND	1,74	ND	ND	0,88	0,48
17	54	ND	0,77	0,765	ND	1,11	0,50
19	18	ND	3,22	ND	ND	1,82	ND
20	22	ND	2,40	ND	ND	0,82	ND
21	32	ND	2,05	ND	ND	1,22	0,56
22	52	ND	5,10	0,49	ND	1,47	ND
23	33	ND	4,28	0,33	ND	1,43	ND
25	23	ND	2,92	ND	ND	0,91	ND
28	31	ND	1,55	0,70	ND	1,12	0,77
29	23	ND	1,03	ND	ND	0,98	ND

32	22	ND	2,21	0,45	ND	0,69	0,55
33	20	ND	4,94	ND	ND	0,98	ND
34	25	ND	2,93	ND	ND	1,65	0,39
35	16	ND	2,83	ND	ND	1,09	ND
36	20	ND	3,14	ND	ND	0,94	0,58
39	21	ND	1,43	0,49	ND	0,86	0,61
40	17	ND	4,03	0,44	ND	0,79	0,67
41	34	ND	2,20	ND	ND	0,83	0,50
42	42	ND	2,33	ND	ND	1,02	ND
43	28	ND	1,87	ND	ND	1,04	ND
Média	31,2	0	2,43	0,54	0	1,10	0,58
DP	13,6	0	1,13	0,15	0	0,38	0,93
CV (%)	43,63	0	46,69	28,63	0	34,23	16,06
Mínimo	16	0	0,77	0,33	0	0,58	0,39
Máximo	74	0	5,1	0,76	0	2,36	0,77

ND= Não Determinado; DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de Variação.

TABELA 17: Concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina ($\mu\text{g/mL}$) e carboximefloquina ($\mu\text{g/mL}$), e suas respectivas relações nos adultos com malária por *P. falciparum* não complicada em D3, oriundos do Amapá, no período de agosto de 2005 a agosto de 2006.

Pacientes	Mefloquina		Relação eritrócito: plasma	Carboxi-mefloquina		Relação eritrócito: plasma
	($\mu\text{g/mL}$)			($\mu\text{g/mL}$)		
	Hemácia	Plasma		Hemácia	Plasma	
01	2,25	2,53	0,89	0,84	0,83	1,01
05	6,03	1,55	3,89	ND	1,50	-

06	6,93	1,30	5,30	ND	0,90	-
07	7,66	1,31	5,84	0,922	0,72	1,28
09	6,57	2,15	3,05	ND	2,36	-
11	5,51	1,94	2,84	1,192	0,86	1,38
13	3,75	1,08	3,47	0,724	0,58	1,24
15	5,20	1,74	2,98	ND	0,88	-
17	2,10	0,77	2,72	1,681	1,11	1,51
19	4,00	3,22	1,24	ND	1,82	-
20	5,79	2,40	2,41	ND	0,82	-
21	5,46	2,02	2,70	ND	1,22	-
22	7,41	5,10	1,45	1,24	1,47	0,84
25	4,90	2,92	1,67	ND	0,91	-
28	4,22	1,55	2,72	1,66	1,12	1,48
29	6,77	1,003	6,57	0,76	0,98	0,77
34	2,74	2,93	0,93	ND	1,65	-
35	5,26	2,83	1,85	0,78	1,09	0,71
36	4,98	3,14	1,58	ND	0,94	-
39	5,53	1,43	3,86	ND	0,86	-
41	9,89	2,20	4,49	ND	0,83	-
43	8,19	1,87	4,37	1,07	1,04	1,02
Média	5,51	2,13	3,03	1,08	1,11	1,12
DP	1,92	0,97	1,56	0,35	0,41	0,29
CV (%)	34,85	45,55	51,56	32,70	37,39	26,20
Mínimo	2,1	0,77	0,89	0,72	0,58	0,71
Máximo	9,89	5,1	6,5	1,68	2,36	1,51

ND= Não Determinado; DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de Variação.

A correlação entre as concentrações de MQ no plasma e nos eritrócitos de adultos, demonstrada na Figura 20, apresentou coeficiente de Pearson (r) de 0,0436 ($p=0,8450$). Já para CMQ, na Figura 21, o coeficiente de Pearson (r) foi 0,5155 ($p=0,1250$).

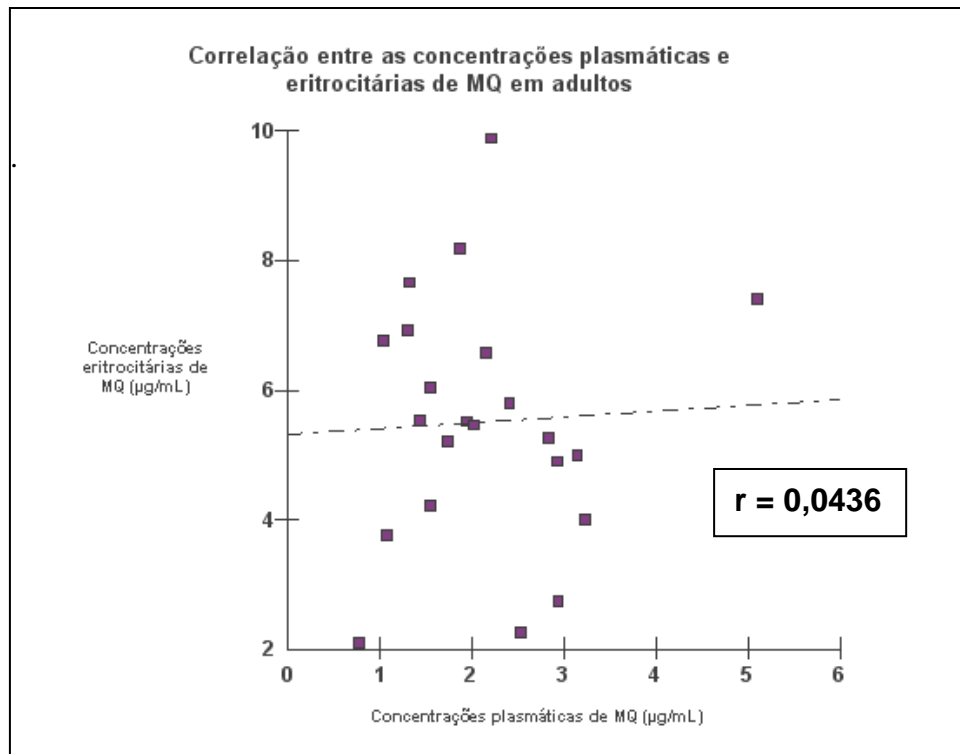


Figura 20: Correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina nos adultos com malária por *P. falciparum* não complicada.

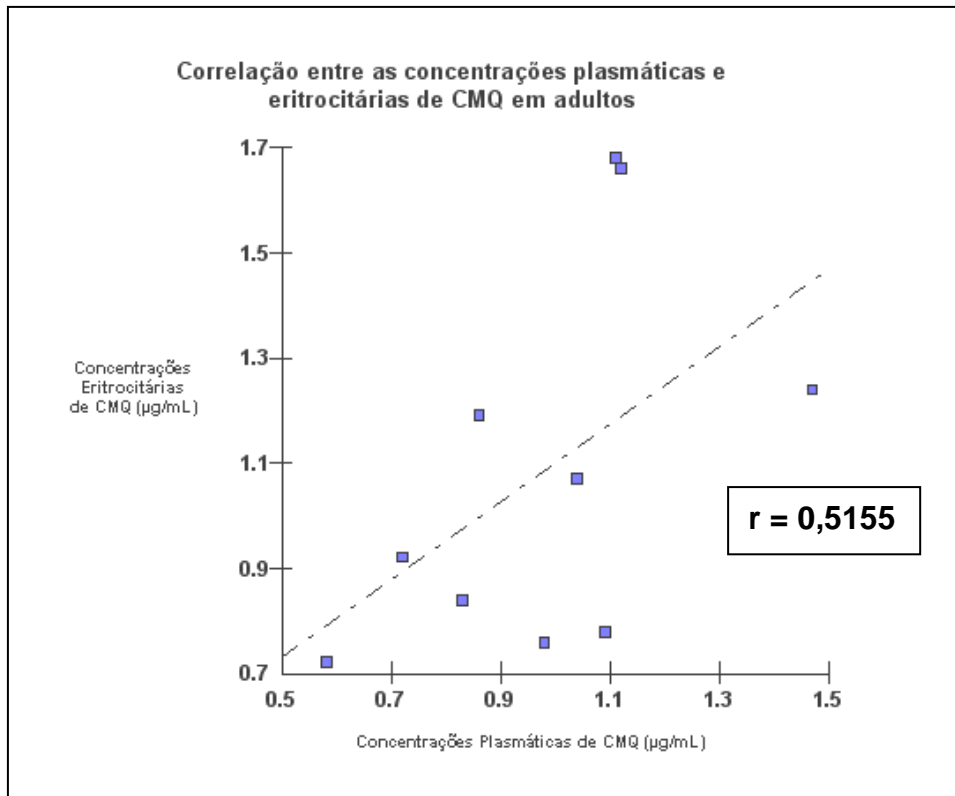


Figura 21: Correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de carboximefloquina nos adultos com malária por *P. falciparum* não complicada.

5. DISCUSSÃO

Apesar da redução mundial no número de casos diagnosticados nos últimos cinco anos, a malária por *Plasmodium falciparum* continua sendo um importante problema de saúde pública nos países emergentes. Neste sentido, as diversas agências regulamentadoras governamentais atuam de maneira incessante na busca de novas estratégias para o tratamento e controle da doença, tais como o uso de mosquiteiros impregnados com praguicidas de longa ação residual e baixa toxicidade para humanos, a associação medicamentosa e a monitorização das concentrações dos antimaláricos nas amostras biológicas (LIMA, 1992).

A monitorização de antimaláricos nos fluidos biológicos constitui um fator fundamental para otimização dos esquemas terapêuticos, quer seja evitando ou detectando precocemente concentrações tóxicas ou sub terapêuticas, que podem levar ao insucesso do tratamento, investigando as reações adversas dose-dependente e suas conseqüências na aderência do paciente à terapia e, fundamentalmente, caracterizando os casos de resistência, uma vez que a resposta terapêutica associa-se a concentração do fármaco no sítio de ação (LIMA, 1992; DUA et al., 1993).

Portanto, a interpretação das falhas terapêuticas requer o conhecimento das concentrações séricas ou eritrocitárias dos antimaláricos, pois vários fatores comportamentais, farmacotécnicos e farmacocinéticos (absorção, distribuição, biotransformação e excreção) comprometem a resposta do fármaco, contribuindo para o surgimento da resistência (LIMA, 1992; WHITE, 2004).

Como exemplo, estudo realizado em um hospital de Nice na França, entre abril de 1996 a dezembro de 2000, envolvendo 95 pacientes portadores de malária *falciparum* nas formas grave e não complicada, demonstrou que 82% destes responderam satisfatoriamente

ao tratamento, nos demais foram caracterizadas sérias reações adversas ao esquema proposto ou concentrações plasmáticas sub terapêuticas (DELLAMONICA et al., 2002).

Neste sentido, merece destaque a importância dos estudos de cinética dos antimaláricos realizados em crianças, tanto pela escassez dos dados referentes à relação entre as concentrações dos antimaláricos nos diversos compartimentos sanguíneos *in vivo*, nos diferentes grupos etários (STEPNIEWSKA; WHITE, 2008), quanto pela gravidade que a malária *falciparum* pode assumir nesse grupo de risco (PRICE et al., 1999).

Outra estratégia de ação adotada para contornar problemas regionais de resistência em diversos países, consiste na utilização das associações medicamentosas que originaram múltiplos esquemas terapêuticos, objetivando maior eficácia e controle das cepas resistentes de *P. falciparum* (SOUZA et al., 1997).

Dentre os quimioterápicos utilizados no tratamento da malária *falciparum*, destaca-se a MQ, que ganhou notoriedade no final do século passado em virtude de seu sucesso clínico, o que foi corroborado por estudos realizados na região amazônica, que demonstraram altas taxas de cura e eficácia deste medicamento (CERUTTI JR. et al., 1999; MAGILL et al., 2004; CALVOSA, 2005).

Entretanto, fármacos apresentando meia vida de eliminação prolongada como a MQ, por serem excretados lentamente, poderão no decorrer do tempo, acarretar concentrações sub terapêuticas e, apesar de alcançar o propósito inicial de cura, pode constituir uma potente força seletiva para o aparecimento da resistência (WATKINS; MOSOBO, 1993), haja vista a pressão da droga ser um pré-requisito de seleção crítico e essencial para o desenvolvimento da resistência (TALISUNA et al., 2004).

Neste sentido, a emergência de cepas de *P.falciparum* resistentes a MQ, em algumas partes do sudeste asiático como na Tailândia e Mianmar, preocupou a comunidade científica com a possibilidade de ocorrência de casos não-tratáveis, resultando na proposição

de diversas associações da MQ, dentre estas, com os derivados da artemisinina que já tomava parte da política de tratamento da doença em diversos países desta região desde 1994 (WHITE, 2004).

A combinação dos derivados da artemisinina com a MQ demonstrou ser rapidamente efetiva em curto período de tempo, em face da potente atividade antimalárica dos primeiros. O artesunato produz resposta inicial rápida, bem como previne as falhas terapêuticas nos pacientes infectados com cepas resistentes a MQ, fato associado à drástica diminuição da biomassa infectante, o que reduz a transmissão da doença e a probabilidade da emergência de mutantes resistentes a MQ no decorrer do tratamento (WHITE, 1992; LOOAREESIJWAN et al., 1992).

Vários estudos que avaliaram a combinação de um derivado da artemisinina e MQ comprovaram a segurança e a eficácia dessa associação no tratamento da malária *falciparum* resistente a outros antimaláricos (PRICE et al., 1997; SIMPSON et al., 1999; ASHLEY et al., 2006; BHATT et al., 2006).

Na Amazônia Legal, o uso de mefloquina/artesunato no tratamento das infecções por *P. falciparum* foi implantado em alguns estados nos últimos anos e vem sendo acompanhado pela Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas, objetivando avaliar a manutenção da eficácia e a segurança dessa associação (BRASIL/MS/SVS, 2007).

A disseminação dessa associação nos países da Amazônia Legal associada à ausência de estudos referentes à monitorização dos níveis sanguíneos de MQ na presença de artesunato nos pacientes com malária *falciparum* oriundos desta região, levou a realização deste estudo, que objetivou a determinação das concentrações plasmáticas e eritrocitárias de MQ e CMQ em pacientes com malária *falciparum* residentes no estado do Amapá, de modo a

fornecer parâmetros que auxiliem na otimização dos esquemas terapêuticos adotados atualmente.

Na determinação das concentrações sanguíneas de antimaláricos objetivando a monitorização terapêutica, várias metodologias têm sido empregadas, e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é, sem dúvida, a ferramenta mais utilizada nos estudos farmacocinéticos, devido a alta sensibilidade e especificidade (KARBWANG; WHITE, 1990).

O primeiro método para quantificação de MQ em amostras de sangue total, plasma e urina por HPLC, após extração com acetato de etila, foi desenvolvido por Grindel, Tilton e Shaffer (1977). Posteriormente, Bergqvist et al. (1988) validaram um procedimento de análise simultânea de MQ e CMQ em amostras de plasma e sangue total por HPLC, empregando sulfato de zinco e acetonitrila para desproteinização e éter metil terc butílico para extração líquido-líquido. Já Green et al. (1999) realizaram a análise do fármaco e de seu principal metabólito em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro utilizando extração em fase sólida e HPLC em fase reversa.

O método validado neste estudo permitiu a análise cromatográfica simultânea de MQ e CMQ em amostras de plasma e eritrócitos, após extração líquido-líquido, apresentando consumo reduzido de solventes orgânicos, adequada pré-concentração dos analitos, excelente separação dos componentes endógenos e boa recuperação. Vale ressaltar ainda, a vantagem da utilização de coluna tradicional de fase reversa (C18) e a detecção por ultravioleta, bastante empregadas nos laboratórios analíticos (Figura 10).

Para garantir a confiabilidade e segurança dos resultados obtidos, foi realizada a validação do procedimento nas condições do Laboratório de Toxicologia da UFPA, através da determinação dos seguintes parâmetros: tempo de retenção, limite de detecção e

quantificação, linearidade, curva de calibração, recuperação, precisão, interferentes, estabilidade e robustez (SHAH et al., 2000; ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

De acordo com as condições cromatográficas padronizadas, a MQ, CMQ e Quinidina (padrão interno) demonstraram boa separação, eluindo em 5,8; 3,3 e 2,6 minutos, respectivamente (Tabela 01 e Figura 11).

Os limites de detecção e quantificação foram 20 ng/mL e 25 ng/mL respectivamente, utilizando detector UV com comprimento de onda de 222 nm, apresentando, portanto, ótima sensibilidade para monitorização terapêutica destes analitos e corroborando com o estudo de Oliveira et al. (2008) que demonstraram que MQ e CMQ apresentam absorção máxima próximo a 222 nm.

Na avaliação da linearidade do método foram empregadas soluções padrões de MQ e CMQ, no intervalo de 0,25 a 10 µg/mL. Os dados apresentados nas Tabelas 2 e 3 evidenciaram linearidade satisfatória no intervalo das concentrações analisadas, com coeficientes de correlação de Pearson superior a 0,996 para ambos analitos (Figuras 12 e 13).

As curvas de calibração no plasma obtidas conforme 3.6.4, apresentadas nas Tabelas 4 e 5, indicam que a correlação entre as concentrações de MQ e CMQ e as respectivas relações das áreas dos analitos e do padrão interno (MQ/PI e CMQ/PI) foram lineares no intervalo das concentrações analisadas (0,5 a 10 µg/mL). Os coeficientes de correlação de Pearson foram superiores a $r=0,995$ para ambos os analitos (Figuras 14 e 15).

O mesmo foi observado para as curvas de calibração de MQ e CMQ nos eritrócitos, apresentados nas Tabelas 6 e 7. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99 para ambos analitos (Figura 16 e 17).

A recuperação da MQ nas diversas concentrações estudadas (Tabela 8) variou de 92,66% a 97,62%, e a da CMQ de 92,44% a 109,2%, valores de acordo com os limites aceitáveis pela legislação vigente (ANVISA, 2003).

Os valores da precisão intraensaio e da interensaio para MQ e CMQ apresentados nas Tabelas 09 e 10, demonstraram que o método validado apresenta elevada precisão, visto que os coeficientes de variação se mantiveram igual ou abaixo de 15%, aceitáveis, portanto, para análise de fármacos em fluídos biológicos (ANVISA, 2003).

Os dados da Tabela 11 demonstram que o método apresentou boa seletividade frente aos outros antimaláricos, devido à ausência de interferentes nos tempos de retenção dos analitos estudados (ANVISA, 2003).

A MQ e a CMQ foram estáveis quando estocadas à temperatura ambiente ou expostas a ciclos de congelamento, não havendo diferença estatística significativa entre as médias das áreas dos analitos em diferentes condições ($p > 0.05$), conforme apresentado na Tabela 12. Estes dados estão de acordo com o estudo de Tonnesen (2001) que não observaram degradação do fármaco em fluidos biológicos quando as amostras foram submetidas a diversos ciclos de congelamento ou mantidas à temperatura ambiente.

O método validado mostrou-se sensível a variação da composição de solventes da fase móvel, com significativo aumento nos tempos de retenção dos fármacos de interesse, conforme apresentado na Tabela 13.

As amostras de sangue foram coletadas em D3 e D42. A primeira reflete o pico de concentração plasmática segundo o esquema proposto e, D42 refere-se ao fato da MQ ser eliminada lentamente do organismo e vários estudos indicarem que o acompanhamento do paciente após o tratamento deveria ser estendido até este dia ou mais, a fim de avaliar o

sucesso terapêutico e identificar casos de recrudescência (TER KUILE et al, 1995; WHO, 2002; FRYAUFF et al., 2007).

Todos os participantes do estudo apresentaram evolução clínica favorável e foram curados segundo critérios oficiais, bem como não foi observado casos de recrudescência da infecção após 42 dias.

A ausência de MQ em D0 demonstra que os mesmos não fizeram uso prévio da mesma, confirmando informações obtidas na avaliação clínica inicial.

Ressalta-se que o uso não supervisionado de antimaláricos na Amazônia é comum em virtude da política de distribuição dos medicamentos na região, refletindo-se na exacerbação de reações adversas ou no tratamento incorreto, o que propicia o surgimento de cepas resistentes.

Os teores médios de MQ e CMQ nas amostras de plasma dos indivíduos adultos obtidos neste estudo em D3, conforme Tabela 16, foram $2,43 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$ e $1,10 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, corroborando os achados de Ashley et al. (2006) em cinquenta pacientes tailandeses com malária *falciparum* que utilizaram esquema terapêutico semelhante ao deste trabalho, nos quais a concentração plasmática máxima de MQ em D3 foi $2,202 \mu\text{g/mL}$, com intervalo de 0,915 a $3,730 \mu\text{g/mL}$. Já Nosten et al. (1991) obtiveram, em 360 pacientes que receberam 4,0 mg/kg de artesunato e 15 mg/kg de MQ após 24 horas, concentração plasmática média de MQ de $2,509 \mu\text{g/mL}$, variando de 0,871 a $6,04 \mu\text{g/mL}$. Em relação à CMQ nos indivíduos adultos, Franssen et al. (1989) analisaram 10 voluntários caucasianos saudáveis que receberam 500 ou 750 mg de MQ seguida por 500 mg após 8 horas. Os níveis sanguíneos médios de CMQ foi de $1,340 \pm 0,208 \mu\text{g/mL}$.

Em D42 a presença de MQ foi caracterizada em 36,6% dos pacientes adultos, com concentração média de $0,54 \pm 0,15$ $\mu\text{g/mL}$. Já a CMQ foi observada em 53,3% dos pacientes com teor médio de $0,58 \pm 0,93$ $\mu\text{g/mL}$.

Os teores plasmáticos médios de MQ e CMQ de crianças obtidos em D3 foram de $1,84 \pm 0,83$ $\mu\text{g/mL}$ e $1,44 \pm 0,70$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabela 14). Dados semelhantes foram obtidos por Slutsker et al. (1990) em crianças na Malásia avaliando a cinética da MQ em monoterapia de 15 ou 25 mg/Kg do medicamento. As concentrações plasmáticas médias de MQ no segundo dia de tratamento foram 1,04 e 1,42 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. No sétimo dia de tratamento tais valores médios reduziram para 0,67 e 0,71 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (SLUTSKER et al., 1990).

Nosten et al. (1991), analisaram MQ no sangue total de doze crianças tailandesas, com idade entre cinco e dez anos, recebendo dose única de 15 mg/Kg do medicamento em monoterapia. A concentração plasmática média em D2 foi $2,03 \pm 0,83$ $\mu\text{g/mL}$, variando de 0,99 a 3,77 $\mu\text{g/mL}$. Já Price et al. (1999) analisando MQ em amostras de plasma de 120 crianças, com idade de 4 a 15 anos, fazendo uso de artesunato 4mg/kg durante três dias e 25 mg/kg de MQ, encontraram teor plasmático médio de 1,75 $\mu\text{g/mL}$ com variação de 0,42 a 3,05 $\mu\text{g/mL}$.

Em relação a CMQ, Hatin et al. (1992) observaram que crianças senegalesas menores de um ano de idade tratadas com dose oral de 12,5 mg/Kg, alcançaram níveis plasmáticos médios de 0,407 $\mu\text{g/mL}$. Já no estudo de Fryauff et al. (2007), crianças com idade entre 6 e 24 meses fazendo uso de MQ 20 mg/kg no Gana, apresentaram níveis plasmáticos de 0,229 $\mu\text{g/mL}$. Para justificar os baixos valores encontrados o autor considera a possibilidade da formulação de MQ desenvolvida naquele país ter alterado a química da droga e/ou subsequentemente a sua biodisponibilidade.

Em D42 a MQ foi detectada em 33,3% das crianças, com concentração média de $0,45 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ e a CMQ em 44,4% dos pacientes com teor médio de $0,51 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$.

Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os teores médios de MQ nos dias D3 e D42 e de CMQ nos mesmos dias, tanto em crianças como em adultos, o que caracteriza o perfeito seguimento do esquema terapêutico proposto, corroborado pela ausência de outros antimaláricos nas amostras dos pacientes e pela presença de CMQ em maior proporção nas amostras em D42. Ressalta-se que, apesar da ausência de ação esquizotocida sanguínea, a determinação dos níveis plasmáticos de CMQ é importante para a avaliação da aderência do paciente ao tratamento ou a profilaxia proposta (TODD et al., 1997).

Este perfil obtido em D3 e D42 apresentou comportamento similar àqueles encontrados anteriormente (KARBWANG; WHITE, 1990; FRYAUFF et al., 2007), nos quais a concentração de MQ e CMQ foi significativamente maior nos primeiros dias, diminuindo ao longo do tempo, com aumento das concentrações de CMQ em relação a MQ.

Todos os pacientes, adultos e crianças, apresentaram níveis terapêuticos de MQ em D3 superiores a concentração inibitória mínima para cepas de parasitas sensíveis, cujo valor é 500 ng/mL (WHITE, 1997). Ressalta-se que em D42, 11,1 % das crianças e 16,6% dos adultos apresentaram concentração plasmática superior à inibitória mínima. Sabe-se que a concentração sanguínea de MQ é um fator determinante para a resposta terapêutica, uma vez que a eliminação dos parasitas depende da exposição destes a concentrações acima daquela considerada concentração inibitória mínima (SIMPSON et al., 1999; HUNG et al. 2004).

Analisando a cinética da MQ associada ao artesunato em 360 pacientes no Vietnã, Hung et al. (2004) demonstraram que a concentração plasmática de MQ em D28 foi superior a 500 ng/mL em 28% dos pacientes com cura completa, 45% com recrudescência tardia e em

10% naqueles com recrudescência precoce. O tempo médio de recrudescência foi 42 ± 11 dias, com intervalo de 20 a 64 dias (SIMPSON et al., 2000).

A média das relações entre as concentrações plasmáticas de MQ e CMQ em D3 foi de $2,3 \pm 1,07$ e $1,55 \pm 0,89$ nos adultos e nas crianças, respectivamente. Esta relação se inverte em D42, predominando CMQ com relação de 0,85 e 0,89 para adultos e crianças, respectivamente. Dados semelhantes foram obtidos por Fryauff et al. (2007) ao analisarem os teores de MQ e CMQ em crianças africanas com idade de 6 a 24 meses, perceberam que os níveis de CMQ foram inferiores aos de MQ em D2, e associaram este fato ao pico de concentração plasmática da MQ neste período. Por outro lado, quando o estado de equilíbrio é alcançado, tal relação muda e a CMQ passa a ter concentração superior ao da MQ (ASHLEY et al., 2006).

Tal achado justifica-se tanto pela meia vida de eliminação da CMQ ser superior ao da MQ sendo, portanto, excretada mais lentamente, quanto pelo fato da concentração plasmática máxima de CMQ ser alcançada após cerca de duas semanas do início do tratamento (ASHLEY et al., 2006). Ressalta-se que a meia vida terminal da MQ é dose independente nas concentrações terapêuticas normalmente utilizadas (SIMPSON et al., 2000).

A concentração média de MQ nos eritrócitos em D3, nas crianças com malária *falciparum* não complicada foi $5,26 \pm 1,46$ $\mu\text{g/mL}$ e a média das relações entre as concentrações eritrocitárias e plasmáticas correspondentes foi $2,86 \pm 1,27$ (Tabela 15). Nos pacientes adultos a concentração eritrocitária média de MQ foi $5,5 \pm 1,92$ $\mu\text{g/mL}$, e a média das relações entre as duas frações sanguíneas foi $3,03 \pm 1,56$ (Tabela 17).

Tais dados corroboram o estudo realizado por Mu et al. (1975), que demonstraram em experimentos conduzidos *in vitro*, empregando sangue humano adicionado de MQ em concentrações de 50 a 1000 mg/mL , uma relação entre as concentrações eritrocitárias e plasmáticas de cerca de 2 para 1.

O acúmulo da MQ nos eritrócitos também foi relatado por Rozman et al (1978) após administração via oral de hidrocloreto de mefloquina marcado com C14 em ratas, nas quais a concentração eritrocitária foi aproximadamente cinco vezes superior a plasmática.

No eritrócito, a MQ se concentra principalmente no parasita e, em menor proporção no citosol e na membrana da célula hospedeira. Ressalta-se que, apesar dos baixos teores, a presença de MQ na membrana e no citoplasma do eritrócito infectado desempenha um papel importante na disponibilidade do fármaco ao parasita (ADOVELANDE et al., 1994).

Este acúmulo é de particular interesse uma vez que, o fármaco exerce sua ação contra as formas assexuadas do parasita presentes no interior do eritrócito (ROZMAN et al., 1978; TAJERZADEH; CUTLER, 1993; VIDREQUIN et al., 1996), além de explicar o uso profilático e os efeitos a longo prazo da terapia (ADOVELANDE et al., 1994).

Sabe-se que a MQ tem alta afinidade por componentes do plasma, ligando-se as proteínas plasmáticas em aproximadamente 98%, principalmente a albumina e o polipeptídeo apo-A da lipoproteína de alta densidade (HDL) (DESNEVES et al., 1996). Por outro lado, por ser um fármaco extremamente lipofílico, apresenta alta afinidade pelos fosfolipídios presentes na membrana eritrocitária, podendo se acumular nessa região (GINSBURG; KRUGLIAK, 1988).

Para seu crescimento e reprodução, o *P. falciparum* necessita de suprimento externo de nutrientes essenciais, visto que os eritrócitos maduros são células desnucleadas e inativas sob o ponto de vista metabólico. Para isso, o parasita modifica radicalmente as propriedades da membrana plasmática eritrocitária, através da inserção de proteínas que criam uma via de maior permeabilidade para absorção de nutrientes essenciais, como os lipídios das partículas de HDL circulante (DESNEVE et al., 1996; FOLEY; TILLEY, 1997; LANZER et al., 2006).

A ligação específica da MQ ao HDL é importante para a passagem do fármaco pela membrana dos eritrócitos infectados, facilitando sua transferência pela mesma via de entrada dos fosfolipídeos endógenos (DESNEVE et al., 1996; FOLEY; TILLEY, 1997; LANZER et al., 2006).

Além disso, o parasita no eritrócito infectado promove o aumento na composição dos fosfolipídeos da célula, associado, provavelmente, ao seu metabolismo lipídico, aumentando a exposição do *P. falciparum* a MQ, uma vez que a mesma se intercala na bicamada lipídica, resultando no maior acúmulo do fármaco nesta região (ZIDOVETZKI et al., 1990; SHALMIEV; GINSBURG, 1993).

A CMQ não apresentou acúmulo considerável nos eritrócitos, uma vez que a média das relações entre as concentrações eritrocitárias e plasmáticas correspondentes foi $0,75 \pm 0,26$ e $1,12 \pm 0,29$ nas crianças e nos adultos respectivamente.

A CMQ, por ser um produto de biotransformação, perde a sua característica lipofílica, reduzindo seu acúmulo nos lipídios presentes na membrana plasmática do eritrócito, justificando assim, a baixa relação entre os teores de CMQ entre plasma e eritrócito nos dois grupos estudados.

Tais achados são corroborados tanto pela média da relação entre as concentrações eritrocitárias e plasmáticas de MQ e CMQ, que nos indivíduos adultos foi $3,03 \pm 1,56$ e $1,12 \pm 0,29$ e nas crianças foi $2,86 \pm 1,27$ e $0,75 \pm 0,26$ respectivamente, bem como pelo baixo coeficiente de correlação de Pearson entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de MQ nas crianças ($r= 0,0584$) e nos adultos ($r= 0,0436$), o que pode ser creditado ao acúmulo de MQ no eritrócito, impedindo o aumento linear e proporcional nestes compartimentos orgânicos. Por outro lado, os coeficientes de correlação de Pearson entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias da CMQ, foram superiores aos da MQ, tanto nas crianças ($r=$

0,8722), quanto nos adultos ($r= 0,5155$), o que é devido a ausência de acúmulo eritrocitário desse produto de biotransformação.

Neste sentido, pode-se inferir que os mecanismos carreadores de transporte ativo do fármaco (DESNEVES et al., 1996) para o interior do eritrócito desempenham papel secundário, e o principal mecanismo de transporte da MQ através da membrana eritrocitária é passivo não estereoespecífico, isto é, por difusão simples, aproveitando-se da elevada lipossolubilidade do fármaco. Ao passo que a passagem da CMQ através da membrana do eritrócito estaria relacionada aos carreadores de transporte ativo.

Estudos prévios demonstraram considerável variabilidade nos parâmetros farmacocinéticos de MQ e CMQ, quando empregada tanto no tratamento quanto na prevenção da malária (NOSTEN et al., 1991; SIMPSON et al., 1999; FRYAUFF et al., 2007). Tal fato também foi observado neste trabalho uma vez que, os coeficientes de variação das concentrações plasmáticas de MQ no D3 foram 45,59% e 46,69%, e de CMQ de 49,02% e 34,23% para crianças e adultos, respectivamente.

Em D42, a variabilidade das concentrações de MQ em D3 foram 25,84% e 28,63%, enquanto que os valores de CMQ variaram 20,85% e 16,06% em crianças e adultos, respectivamente.

De acordo com Simpson et al. (1999), a farmacocinética da MQ é influenciada por fatores tipicamente observados na malária *falciparum* aguda, como: motilidade gastrintestinal alterada, reduzida perfusão visceral, absorção prejudicada, baixa biodisponibilidade, mudanças no volume de distribuição, dentre outros, os quais contribuem para a variabilidade plasmática observada nestes pacientes.

Por outro lado, na fase terminal de excreção do medicamento, tal variabilidade está diminuída, visto que os fatores relacionados à doença deixam de existir uma vez que, a

parasitemia tende a se tornar negativa e os pacientes se recuperam dos sinais e sintomas da doença em um período de 4 a 5 dias.

A considerável variação interindividual tem importantes conseqüências terapêuticas, pela possibilidade da ocorrência de concentrações sanguíneas inadequadas do fármaco, resultante da interferência dos fatores cinéticos, conduzindo a falha no tratamento, fornecendo assim, poderosa pressão seletiva para o desenvolvimento da resistência. Esta característica reforça, portanto, a necessidade da monitorização terapêutica nos pacientes com *malária falciparum* tratados com MQ (PRICE et al., 1999).

6. CONCLUSÃO

- A técnica validada mostrou-se apropriada para determinação de MQ e CMQ no plasma visto que, os dados referentes à validação do método estão em conformidade com os parâmetros recomendados pelos órgãos internacionais e pela legislação sanitária vigente no país.
- As concentrações plasmáticas médias de mefloquina e carboximefloquina nas crianças em D3 foram $1,84 \pm 0,83 \mu\text{g/mL}$ e $1,44 \pm 0,70 \mu\text{g/mL}$. Já em D42 tais valores foram de $0,45 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ e $0,51 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.
- As concentrações plasmáticas médias de mefloquina e carboximefloquina nos adultos em D3 foram $2,43 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$ e $1,10 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$. Em D42 os valores foram $0,54 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ e $0,58 \pm 0,93 \mu\text{g/mL}$.
- Em D3 todos os pacientes apresentaram concentrações plasmáticas superiores aquela considerada a concentração inibitória mínima. Em D42 11,1% das crianças e 16,6% dos adultos apresentaram concentrações superiores a inibitória mínima.
- A média das relações entre as concentrações plasmáticas de mefloquina e de carboximefloquina das crianças em D3 foi $1,55 \pm 0,89$ e adultos foi $2,3 \pm 1,07$. Já em D42 foram $0,83 \pm 0,20$ e $0,85 \pm 0,37$, respectivamente.
- A média das relações entre as concentrações eritrocitárias e plasmáticas de mefloquina foi de $2,86 \pm 1,27$ nas crianças. Já nos adultos foi $3,03 \pm 1,56$.

- A média das relações entre as concentrações eritrocitárias e plasmáticas de carboximefloquina nas crianças foi $0,75 \pm 0,26$ e nos adultos $1,12 \pm 0,29$.

- O coeficiente de correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de mefloquina nas crianças foi 0,0584 e nos adultos 0,0436.

- O coeficiente de correlação entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de carboximefloquina nas crianças foi 0,8722 e nos adultos 0,5155.

- Observou-se nas crianças e adultos, elevada variabilidade nas concentrações de mefloquina em D3, que foi reduzida em D42.

- Estudos complementares são necessários para confirmação dos mecanismos de transporte da mefloquina e carboximefloquina através da membrana do eritrócito.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADOVELANDE, J. BOULARD, Y; BERRY, J. P; GALLE, P; SLODZIAN, G; SCHREVEL, J. Detection and cartography of the fluorinated antimalarial drug mefloquine in normal and *Plasmodium falciparum* infected red blood cells by scanning ion microscopy and mass spectrometry. **Biology of the Cell**, v. 81, n. 2, p. 185-192, 1994.

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

ASHLEY, E. A; STEPNIEWSKA, K; LINDEGARDH, N; MCGREADY, R; HUTAGALUNG, R; HAE, R; SINGHASIVANON, P; WHITE, N. J; NOSTEN, F. Population pharmacokinetic assessment of a new regimen of mefloquine used in treatment of uncomplicated *falciparum* malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2281-2285, 2006.

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

BARZAGO, M. M; OMARINI, D; BORTOLOTTI, A; STELLARI, F. F; LUCCHINI G; EFRATI, S; BONATI, M. Mefloquine transfer during *in vitro* human placenta perfusion. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 269, n. 1, p. 28-31, 1994.


BAUDRY S; PHAM, Y. T; BAUNE, B; VIDREQUIN, S; CREVOISIER, C; GIMENEZ, F; FARINOTTI, R. Stereoselective passage of mefloquine through the blood-brain barrier in the rat. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 11, p. 1086-1090, 1997.

BERGQVIST, Y; HELLGREN, U; CHURCHILL, F. C. High performance liquid chromatography assay for the simultaneous monitoring of mefloquine and its acid metabolite in biological samples using protein precipitation and ion-pair extraction. **Journal of Chromatography B**. v. 18, p. 253-263, 1988.

BERMAN, A; SHEARING, L. N; NG, K. F; JINSART, W; FOLEY, M; TILLEY, L. Photoaffinity labelling of *Plasmodium falciparum* proteins involved in phospholipid transport. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 67, p. 235-243, 1994.

BHATT, K. M; SAMIA, B. M; BHATT, S. M; WASUNNA, K. M. Efficacy and safety of an artesunate/mefloquine combination, (artequin) in the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria in Kenya. **East African Medical Journal**, v. 83, n. 5, p. 236-242, 2006.

BOULOS, M. Malária: Tratamento. In: VERONESE: **Tratado de infectologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 1623.

BOURAHLA. A; MARTIN, C; GIMENEZ, F; SINGHASIVANON, V; ATTANATH, P; SABCHEARON, A; CHONGSUPHAJAISIDDHI, T; FARINOTTI, R. Stereoselective pharmacokinetics of mefloquine in young children. **European of Journal Clinical Pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 241-244, 1996. 

BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE/ FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Terapêutica da Malária**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE/ FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico da Malária** nº02-2003, Brasil, 2003.

BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Programa Nacional de Controle da Malária**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE/ FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Situação epidemiológica da Malária no Brasil 2004**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE/ FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Situação epidemiológica da Malária no Brasil 2006**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de situação: Amapá**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b.

BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Situação epidemiológica da Malária no Brasil 2007**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007a.

BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.
Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de situação: Amapá. 3 ed. Brasília:
Ministério da Saúde, 2007b.

BRITO, N. M; AMARANTE JUNIOR, O. P; POLESE, L; RIBEIRO, M. L. Validação de
Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.
13, 2003.

BUCRE-CHWATT, L. J. **Essential Malariology**. New York, Wiliam Heinimann Medical
Books Ltd, 1985.

CALVOSA, V. S. C. **Resistência e eficácia ao tratamento da malária no Estado do
Amapá, 2001 a 2005.** Tese de Doutorado. Belém, Universidade Federal do Pará, 2005.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVETION. **The Impact of Malaria, a
Leading Cause of Death Worldwide**, 2005. Disponível em:
<<http://www.cdc.gov/malaria/impact/index.htm>>. Acesso em: 27 de setembro de 2006.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVETION. **Schema of the Life Cycle of
Malaria**, 2006a. Disponível em:
< http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm>. Acesso em: 15 de outubro de 2006.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVETION. Malaria - Great Exuma: Bahamas,
May-June 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 55, n. 37, p.1013-1016, 2006b.

CERUTTI, C. JR; DURLACHER, R. R; DE ALENCAR, F. E. C; SEGURADO, A. A. C; PANG, L. W. *In vivo* efficacy of mefloquine for the treatment of falciparum malaria in Brazil. **Journal of Infectious Disease**, v. 180, p. 2077-2080, 1999.

CHITNIS, C. E; BLACKMAN, M. J. Host Cell Invasion by Malaria Parasites. **Parasitology Today**, v. 16, n. 10, p. 411-415, 2000.

CONN, J. E; WILKERSON, R. C; SEGURA, M. N; DE SOUZA, R. T; SCHLICHTING, C. D; WIRTZ, R.A; POVOA, M. M. Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 1, p. 18-22, 2002.

CONN, J. E; VINEIS, J. H; BOLLBACK, J. P; ONYABE, D. Y; WILKERSON, R. C; POVOA, M. M. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern Amazonian Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 74, n. 5, p. 798-806, 2006.

CONN, J. E; PÓVOA M. M. Anophelines from Belém, Pará, Brazil: recent and retrospective study. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, 109-118, 2006.

COURA, J. R; SUÁREZ-MUTIS, M; ANDRADE, S. L. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 229-237, 2006.

CRAIG, C. R; STITZEL, R. E. **Drogas Antimaláricas**. 4 ed. São Paulo: Farmacologia Moderna, 1996.

CRAVO, P; ROSÁRIO, P. Aspectos da genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos. **Biomed Saúde Publica**, v. 73, p. 2-8, 2002.

CREVOISIER, C; HANDSCHIN, J; BARRE, J; ROUMENOV, D; KLEINBLOESEM, C. Food increases the bioavailability of mefloquine. **European of Journal Clinical Pharmacology**, v. 53, n. 2, p 135-139, 1997.

DAO, N. V; QUOC, N. P; NGOA, N. D; THUY, LE. T; THE, N. D; DAI, B; BINH, V. Q; RIECKMANN, K. H; EDSTEIN M. D. Fatty food does not alter blood mefloquine concentrations in the treatment of falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 12, p. 927 – 931, 2005.

DAVIS, T. M. E; ENGLAND, M; DUNLOP, A. M; PAGE-SHARP, M; CAMBON, N; KELLER, T. G; HEIDECKER, J. L; ILETT, K. F. Assessment of the effect of mefloquine on artesunate pharmacokinetics in healthy male volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 1099-1101, 2007.

DEANE, L. M. Malaria Vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 5-14, 1986.

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**, v. 45, n. 3, p. 160-164, 2002.

DESNEVES, J; THRON, G; BERMAN, A; GALATIS, D; LA GRECA, N; SINDING, J; FOLEY, M; DEADY, L. W; COWMAN, A. F; TILLEY, L. Photoaffinity labeling of mefloquine-binding proteins in human serum, uninfected erythrocytes and *Plasmodium falciparum* – infected erythrocytes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82, p. 181-194, 1996.

DUA, K. V; 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 B**, v. 614, p. 87-93, 1993.

EDSTEIN, D. P; VEENENDAAL, J. R; HYSLOP, R. Excretion of mefloquine in human breast milk. **Chemotherapy**, v. 34, p. 165-169, p. 1988.

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

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Cloridrato de Mefloquina**. 2006. Disponível em: <http://www.farmacopeia.org.br/geral/forum_docs/forum02/cloridrato%20de%20mefloquina.pdf>. Acesso em: 21 de agosto de 2006.

FERREIRA, M. S. Malária: Conceito, Etiologia e Ciclo Evolutivo. In: VERONESE: **Tratado de infectologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 1590.

FERREIRA, M. J. G; ALECRIM, W. D. Non-planned urbanization as a contributing factor for malaria incidence in Manaus-Amazonas, Brazil. **Revista de Salud Publica (Bogota)**, v. 6, n. 2, p. 156- 166, 2004.

FOLEY, M; TILLEY, L. Quinoline Antimalarials: Mechanisms of actions and Resistance Prospects for New agents. **Pharmacology and Therapy**, v. 79, n. 1, p. 55-87, 1998.

FONTAINE, F; DE SOUZA, G; BURCHAM, P. C; DUCHENE, P; RAHMANI, R. Role of cytochrome P450 3A in the metabolism of mefloquine in human and animal hepatocytes. **Life Sciences**, v. 66, n. 22, p. 2193-2212, 2000.

FONTEYNE, W; BAUWENS, A; JORDAENS, L. Atrial flutter with 1:1 conduction after administration of the antimalarial drug mefloquine. **Clinical cardiology**, v. 19, n. 12, p. 967-968, 1996.

FRANSSEN, G; ROUVEIX, B; LEBRAS, J; BAUCHET, J; VERDIER, F; MICHON, C; BRICAIRE, F. Divided-dose Kinetics of mefloquine in man. **British Journal Clinical Pharmacology**, v. 28, p. 179-184, 1989.

FRYAUFF, D. J; OWUSU-AGYEI, S; UTZ, G; BAIRD, J. K; KORAM, K. A; BINKA, F; NKRUMAH, F; HOFFMAN, S. L. Mefloquine treatment for uncomplicated falciparum malaria in young children 6-24 months of age in northern Ghana. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 2, p. 224-231, 2007.

GEORGE, R. C. S; NAGEL, R. L; FABRY, M. E. On the mechanism for the red cell accumulation of mefloquine an antimalarial drug. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 23, p. 174-181, 1984.

GINSBURG, H; KRUGLIAK, M. Effects of quinoline-containing antimalarials on the erythrocyte membrane and their significance to drug action on *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 2013-20-18, 1988.

GLAUMANN H; MOTAKEFI, A. M; JANSSON, H. Intracellular distribution and effect of the antimalarial drug mefloquine on lysosomes of rat liver. **Liver**, v. 12, n. 4, p. 183-190, 1992.

GREEN, M., D; BERGQVIST, Y; MOUNT, D. L; CORBETT, S; D'SOUZA, M. J. Improved Validated assay for the determination of mefloquine and its carboxy metabolite in plasma, serum and whole blood using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, n. 727, p. 159-165, 1999.

GREENWOOD, B. M; BOJANG, K; WHITTY, C. J; TARGETT, G. A. Malaria (Review). **The Lancet**, v. 365, n. 9469, p. 1487-1497, 2005.

GRINDEL, J. M; TILTON, P. F; SHAFFER, R. D. Quantification of the antimalarial agent, mefloquine in blood, plasma and urine using high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 6, p. 834-837, 1977.

GUSMAN, V; CARMONA-FONSECA, J. Cytochrome P-450 and the response to antimalarial drugs. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v.19, n.1, p. 9-22, 2006.

GUSTAFSSON, L. L; BEERMAN, B; ABBI, Y. A. **Handbook of drugs for Tropical Parasitic Infaction**. London. New York and Philadelphia, 58-59, p. 122-126, 1987.

HAKANSON, A; LANDBERG- LINDGREN, A; BJORKMAN, A. Comparison of the activity of mefloquine and two metabolites against *Plasmodium falciparum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, p. 503-504, 1990.

HATIN, I; TRAPE, J. F; LEGROS, F; BAUCHET, J; LE BRAS, J. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* strains to mefloquine in an urban area in Senegal, **Bulletin World Health Organ**, v. 70, p. 363-367, 1992.

HAY, S. I; GUERRA, C. A; TATEM, A. J; NOOR, A. M; SNOW, R. W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, p. 327-336, 2004.

HIDERLING, P. H. Red Blood Cells: A Neglected Compartment in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **Pharmacology Reviews**, v. 49, n. 3, p. 279 – 291, 1997.

HUNG, L. Q; DE VRIES, P. J; BINH, T. Q; GIAO, P. T; NAM, N. V; HOLMAN, R; KAGER, P. A. Artesunate with mefloquine at various intervals for non-severe *Plasmodium falciparum* malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 160-166, 2004.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B. Geneve, 1996.

JUMA F. D; OGETO, J.O. Mefloquine disposition in normals and in patients with severe *Plasmodium falciparum* malaria. **European Journal of Drug Metabolism Pharmacokinetics**, v. 14, p. 15-17, 1989.

KAPETANOVIC, I. M; DIGIOVANNI, J. D; BARTOSEVICH, J; MELENDEZ, V; VON BREDOW, J; HEIFFER, M. Analysis of the antimalarial, mefloquine, in blood and plasma using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 227, p. 209-215, 1983.

KARBWANG, J; BUNNAG, D; BRECKENRIDGE, A. M; BACK, D. J. The pharmacokinetics of mefloquine when given alone or in combination with sulphadoxine and pyrimethamine in Thai male and female subjects. **European Journal of Drug Metabolism Pharmacokinetics**, v. 32, p. 173-177, 1987.

KARBWANG, J; WHITE, N. J. Clinical pharmacokinetics of mefloquine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 19, n. 4, p. 264- 279, 1990.

KARBWANG, J; NA-BANGCHANG, K. Clinical application of mefloquine pharmacokinetics in the treatment of *P. falciparum* malaria. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 8, n. 6, p. 491- 502, 1994.

KARBWANG, J; NA BANGCHANG, K; THANAVIBUL, A; BACK, D. J; BUNNAG, D; HARINASUTA, T. Pharmacokinetics of mefloquine alone or in combination with artesunate. **Bull World Health Organ**, v. 72, p. 83-87, 1994.

KOLLARITSCH, H; KARBWANG, J; WIEDERMANN, G; MIKOLASEK, A; NABANGCHANG, K; WERNSDORFER, W. H. Mefloquine concentration profiles during prophylactic dose regimens. **Wien Klin Wochenschr**, v. 112, n. 10, p. 441-447, 2000.

KOROLKOVAS, A; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. 1 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 500-501, 1998.

LAINSON, R. A. Protozoologist in Amazônia: Neglected parasites, with particular reference to members of the Coccidii (Protozoa: Apicomplexa). **Ciência e Cultura: Journal of Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 44, p. 81-93, 1992.

LANZER, M; WICKERT, H; KROHNE, G; VINCENSINI, L; BRAUN BRETON C. Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 23-36, 2006.

LARIAM PRODUCT MONOGRAPH, **mefloquine hydrochloride tablets – Antimalarial Agent**. 2004 . Disponível em:

<<http://www.rochecanada.com/pdf/lariampmE.pdf>>. Acesso em: 20 de agosto de 2006.

LEVINE, N. D. Blood parasites: The malaria and related parasites. In: The Protozoan Phylum Apicomplexa, **CRC Press Inc. Raton Florida**, v. 2, p. 11-21, 1988.

LIMA, R. D. **Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxicologia**. Guanabara Kogan, 1992.

LOOAREESUWAN, S; WHITE, N. J; WARRELE, D. A; FORGO, I; DUBACH, U. G; RANALDER, U. B; SCHWARTZ, D. E. Studies of mefloquine bioavailability and kinetics using a stable isotope technique: a comparison of thai patients with *falciparum* malaria and healthy caucasian volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 37-42, 1982.

LOOAREESUWAN, S; VIRAVAN, C; VANIJANONTA, S; WILAIRATANA, P; SUNTHARASAMAI, P; CHAROENARP, P; ARNOLD, K; KYLE, D; CANFIELD, C; WEBSTER, H. K. A randomized trial of mefloquine, artesunate, and artesunate followed by mefloquine in acute uncomplicated *falciparum* malaria. **Lancet**, v. 339, p. 821-824, 1992.

LOPES, S. P. F. A. Malária. In: BALDY, A. N. **Doenças Transmissíveis**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978, p. 361-386.

MAGILL, A. J; ZEGARRA, J; GARCIA, C; MARQUÍÑO, W; RUEBUSH II, T. K. Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and mefloquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Amazon basin of Peru. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 279-281, 2004.

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

MARTIN, G. J; MALONE, J. L; ROSS, E. V. Exfoliative dermatitis during malarial prophylaxis with mefloquine. **Clinical Infectious Diseases**, v. 16, p. 341-342, 1993.

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

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

MU, J. Y; ISRAILI, Z. H; DAYTON, P. G. Studies of the disposition and metabolism of mefloquine HCl (WR 142,490), a quinolinemethanol antimalarial, in the rat. Limited studies with an analog, WR 30,090. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 3, n. 3, p. 198-210, 1975.

NA BANGCHANG, K; DAVIS, T. M; LOOAREESUWAN, S; WHITE, N. J; BUNNAG, D; KARBWANG, J. Mefloquine pharmacokinetics in pregnant women with acute *falciparum* malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine**, v. 88, n. 3, p. 321-323, 1994.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

NOSTEN, F; TER KUILE, F; CHONGSUPHAJAISIDDHI, T; NA BANGCHANG, K; KARBWANG, J; WHITE, N. J. Mefloquine pharmacokinetics and resistance in children with acute *falciparum* malaria. **British Journal Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 556-559, 1991.

OLIVEIRA, A. R. M; MAGALHAES, I. R. S; SANTANA, F. G. M; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

ORJIH, A. U; RYERSE, J. S; FITCH, C. D. Hemoglobin catabolism and Heme Polymerase Activity and the Stage Specificity of Antimalarial Action of Cloroquine and the Killing of intraerythrocytic *Plamodium falciparum* by cloroquine. **Experientia**, v. 50, p. 34-39, 1994.

PALMER K. J; HOLLIDAY, S. M; BROGDEN, R. N. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 45, n. 3, p. 430-475, 1993.

PANISKO, D. M; KEYSTONE, J. S. Treatment of malaria - 1990. **Drugs.**, v. 39, n. 2, p. 160-189, 1990.

PÓVOA, M. M; WIRTZ, R.; LACERDA, R.; MILES, M.; WARHURST, D. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapa, Amazon Region, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** , v. 96, n. 2, p. 179-84, 2001.

PÓVOA, M. M; DE SOUZA, R.T; LACERDA, R. N; ROSA, E. S; GALIZA, D; DE SOUZA, J. M; WIRTZ, R. A; SCHLICHTING, C. D; CONN, J. E. The importance of *Anopheles albitarsis* and *Anopheles darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista,

state of Roraima, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 163-168, 2006.

PÓVOA, M. M; CONN, J. E; SCHLICHTING, C. D; AMARAL, J. C. O. F; SEGURA, M. N. O; SILVA, A. N. M. Malaria vectors, epidemiology and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belém, Pará, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, p. 379-38, 2003.

PRICE, R. N; NOSTEN, F; LUXEMBURGER, C; VAN VUGT, M; PHAIPUN, L; CHONGSUPHAJASIDDHI, T; WHITE, N. J. Artesunate/mefloquine treatment of multi-drug resistant *falciparum* malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 574-577, 1997.

PRICE, R. I. C; SIMPSON, J. A; TEJA-ISAVATHARM, P; THAN, M. M; LUXEMBURGER, C; HEPPNER, D. G; CHONGSUPHAJASIDDHI, T; NOSTEN, F; WHITE, N. J. Pharmacokinetics of Mefloquine Combined with Artesunate in Children with Acute Falciparum Malaria. **Antibiotic agents and chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 341-346, 1999.

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

RAYNES K; FOLEY M; TILLEY L. Novel bisquinoline antimalarials. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 551.-559, 1996.

REBÊLO, J. M. M. **Manual de Bioecologia dos Vetores da Malária**. São Luís: Lithograf, 2001.

RENDI-WAGNER, P; NOEDL, H; WERNSDORFER, W. H; WIEDERMANN, G; MIKOLASEK, A; KOLLARITSCH. Unexpected frequency, duration and spectrum of adverse events after therapeutic dose of mefloquine in healthy adults. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 167-173, 2002.

RIBANI, M; BOTOLLI, C. B. G; COLLINS, C. H; JARDIM I. C. S. F. Validação em Métodos Cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.

ROZMAN, R. S; MOLEK, N. A; KOPY, R. The absorption, distribution, and excretion in mice of the antimalarial mefloquine, erythro-2,8-bis(trifluoromethyl)-alpha-(2-piperidyl)-4-quinolinemethanol hydrochloride. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 6, n. 6, p. 654-658, 1978.

SALLES, J. M. C; SALLES, M. J. C. **Antimicrobianos (Antibacterianos, Antifúngicos, antivirais, Antiparasitários): Quando Indicar, Como usar**. Belém: Ed. Universitária UFPA, p. 472-473, 2000.

SANJEEV, J. H. A; RAJESH, K; RAJ, K. Mefloquine toxicity presenting with polyneuropathy – a report of two cases in India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 594 – 596, 2006.

SCHLAGENHAUF, P. Mefloquine for malaria chemoprophylaxis 1992-1998: a review. **Journal of Travel Medicine**, v. 6, n. 2, p. 122-133, 1999.

SCHWARTZ D. E; ECKERT G; HARTMANN D; WEBER, B; RICHARD-LENOBLE D; EKUE J. M. K; GENTILINI M. Single dose kinetics of mefloquine in man. **Chemotherapy**, v. 28, p. 70-84, 1982.

SCHWARTZ, D. E; ECKERT, G; EKUE, J. M. Urinary excretion of mefloquine and some of its metabolites in African volunteers at steady state. **Chemotherapy**. v. 33, n. 5, p. 305- 308, 1987.

SCHWARTZ, E; POTASMAN, I; ROTENBERG, M; ALMOG, S; SADETZKI, S. Serious Adverse Events of Mefloquine in Relation to Blood Level and Gender. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene.**, v. 65, n. 3, p. 189-192, 2001.

SHAH, V. P; MIDHA, K. K; FINDLAY, J. W. A; HILL, H. M; HULSE, J. D; MCGILVERAY, I. J; MCKAY, G; MILLER, K. J; PATNAIK, R. N; POWELL, M. L; TONELLI, A; VISWANATHAN, C. T; YACOBI, A. Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 12, p. 1551-1557, 2000.

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. **Biochemical Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 365-374,1993.

SILVA, A. N. M; FRAIHA, H; SANTOS, C. C. B; SEGURA, M. N. O; AMARAL, J. C. O. F; GORAYEB, I. S; LACERDA, R. N. L; ROSA, E. S; CONN, J. E; PÓVOA, M. M. Fauna

anofélica da cidade de Belém, Pará, Brasil: dados atuais e retrospectivos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 8, p. 1575-1585, 2006.

SIMPSON, J. A; PRICE, R; TER KUILE, F; TEJA-ISAVATHARM, P; NOSTEN, F; CHONGSUPHAJASIDDHI, T; LOOAREESUWAN, S; AARONS, L; WHITE, N. J. Population pharmacokinetics of mefloquine in patients with acute *falciparum* malaria. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 66, p. 472-484, 1999.

SIMPSON, J. A; WATKINS, E. R; PRICE, R.N; AARONS, L; KYLE, D. E; WHITE, N. J. Mefloquine pharmacokinetics-pharmacodynamic models: implications for dosing and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3414-3424, 2000.

SKÓRSKA, A; SLIWINSKI, J; ILEKSYN, B. J. Conformation stability and organization of mefloquine molecules in different environments. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 850-853, 2006.

SLATER, A. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. **Pharmaceutical Therapy**, v. 51, p. 203-235, 1993.

SLUTSKER, L. M; KHOROMANA, C. O; PAYNE, D; ALLEN, C. R; WIRIMA, J. J; HEYMANN, D. L; PATCHEN, L; STEKETEE, R. W. Mefloquine therapy for *Plasmodium falciparum* malaria in children under 5 years of age in Malawi: *in vivo/in vitro* efficacy and correlation of drug concentration with parasitological outcome. **Bull World Health Organ**, v. 68, n. 1, p. 53-59, 1990.

SMITH, H. R; CROFT, A. M; BLACK, M. M. Dermatological adverse effects with the antimalarial drug mefloquine: a review of 74 published case reports. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 24, p. 249, 1999.

SOENTJENS, P; DELANOTE, M; VAN GOMPEL, A. Mefloquine-induced pneumonitis. **Journal of Travel Medicine**, v. 13, n. 3, p. 172-174, 2006.

SOUZA, J. M; COUTO, A. A. R. A; SILVA, E. B; ABDON, N. P; SILVA, R. S. V. Malária. In: LEÃO, R. N. Q. **Doenças infecciosas e Parasitárias – Enfoque Amazônico**. Belém: Cejup/UEPA/Instituto Evandro Chagas, 1997.

STEPNIEWSKA, K; WHITE, J. N. The pharmacokinetic determinants of the window of selection for antimalarial drug resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1598-1596, 2008.

SUGIOKA, Y; SUZUKI, M. The chemical basis for the ferriprotoporphyrin IX- cloroquine complex induced lipid peroxidation. **Biochimica at Biophysica Acta**, v. 1074, p. 19-24, 1991.

SULLIVAN, J. D; MATILE, H; RIDLEY, R. G; GOLDBERG, D. E. A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 47, p. 31103-31107, 1998.

SCHWARTZ, M; KRULL, I. Validation of bioanalytical methods – highlight of FDA's Guidance. **LC-GC No. Am.**, New York, v. 21, n. 2, 2003.

TAJERZADEH, H; CUTLER, D. J. Blood to plasma ratio of mefloquine: interpretation and pharmacokinetic implications. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v. 14, n. 1, p. 87-91, 1993.

TALISUMA, A. O; BLOLAND, P; D'ALESSANDRO, U. History, Dynamics and Public Health Importance of Malaria Parasite Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 235-254, 2004.

TAUIL, P. L. Epidemiologia – Malária. In: VERONESE: **Tratado de infectologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 1584-1595.

TAVAREZ, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TER- KUILE, F. O; TEJA-ISAVATHARM, P; EDSTEIN, M. D; KEERATITHAKUL, D; DOLAN, G; NOSTEN, F; PHAIPUN, L; WESTER, H. K; WHITE, N. J. Comparison of capillary whole blood, venous whole blood, and plasma concentrations of mefloquine, halofantrine, and desbutyl-halofantrine measured by High-performance liquid chromatography. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 778-784, 1995.

TODD, G. D; HOPPERUS BUMA A. P. C. C; GREEN, M. D; JASPERS C. A. J. J; LOBEL, H. O. Comparison of whole blood and serum levels of mefloquine and its carboxylic acid metabolic. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, p. 399-402, 1997.

TONNESEN H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **Internacional Journal of Pharmacology**, v. 225, p. 1-14, 2001.

TOSTA, C. E; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. **Imunologia clínica – Malária**. In: VERONESE: **Tratado de infectologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 1598.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation**. Rockville: FDA Center for Drug Evaluation and Research, 2001.

VIDREQUIN, S; GIMENEZ, F; BASCO, L. K; MARTIN, C; LEBRAS, J; FARINOTTI, R. Uptake of Mefloquine enantiomers into uninfected and malaria-infected erythrocytes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 24, n. 6, p. 689-691, 1996.

VITTOR, A. Y; GILMAN, R. H; TIELSCH, J; GLASS, G; SHIELDS, T; LOZANO, W. S; PINEDO-CANCINO, V; PATZ, J. A. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of *falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 74, n.1, p.3-11, 2006.

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**, v. 2, p. 26, 2003.

WATKINS, W. M; MOSOBO, M. Treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with pyrimethamine-sulfadoxine: selective pressure for resistance is a function of long elimination half-life. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 1, p. 75-78, 1993.

WATT-SIMTH, S; MEHTA, K; SCULLY, C. Mefloquine-induced trigeminal sensory neuropathy. **Oral surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 92, n. 2, p. 163-165, 2001.

WHITE, N. J. Clinical pharmacokinetics of antimalarial drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 10, n. 3, p. 187- 215, 1985.

WHITE, N. J. Antimalarial pharmacokinetics and treatment regimens. **British Journal Clinical Pharmacology**, v. 34, p. 1-10, 1992.

WHITE, N. J. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs *in vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 1413-1422, 1997.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance – Review Series. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 1084-1092, 2004.

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

WOOLTORTON, E. Mefloquine: contraindicated in patients with mood, psychotic or seizure disorders. **Canadian Medical Association journal**, v. 12, p. 1147, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monitoring Antimalarial Drug Resistance: Report of WHO consultation**. Geneva: World Health Organization, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**, 2005. Disponível em: <<http://rbm.who.int/wmr2005/>>. Acesso em: 25 de setembro de 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Malaria**, 2006. Disponível em:
<<http://malaria.who.int/images/malariaandtravellers/malaria2006-WHO-Hires.pdf>>. Acesso
em: 01 de junho de 2008.

ZIDOVETZKI, R; SHERMAN, I. W; MAGUIRE, P. A; DE BOECK, H. A nuclear magnetic resonance study of the interactions of the antimalarials chloroquine, quinacrine, quinine and mefloquine with lipids extracted from normal human erythrocytes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 38, n. 1, p. 33-39, 1990

ANEXOS

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Determinação de mefloquina e carboximefloquina em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* no estado do Amapá.

Esclarecimento da pesquisa

Você tem um tipo de doença denominada Malária que foi causada por um protozoário chamado *Plasmodium falciparum*. Para a cura da infecção, você teve que tomar o medicamento Mefloquina durante os dois primeiros dias de tratamento e, por isso, está sendo convidado a participar do estudo “Determinação de mefloquina e carboximefloquina em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* no estado do Amapá”. A proposta consiste na medição de mefloquina e seu metabólito (carboximefloquina) nas suas amostras de sangue, com a finalidade de se verificar se há uma proporção entre a quantidade dessas substâncias no plasma e na hemácia. Para realização do estudo é necessária a sua autorização, a fim de utilizarmos o seu sangue coletado para análise no laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Pará – UFPA, sediado no município de Belém, Pará. Destaca-se que a realização deste estudo não incorrerá em riscos ou prejuízos físicos e morais para os pacientes, já que as informações relatadas serão de uso exclusivamente científico, e as identificações pessoais serão mantidas em segredo.

Os participantes do estudo têm a liberdade de optar pela participação ou retirada desta pesquisa, caso seja necessário, sem o risco de represália.

Em qualquer momento os pacientes estudados poderão ter acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento e tirar dúvidas.

Depois que os resultados da pesquisa estiverem prontos, a pessoa que participar da pesquisa poderá ver estes resultados. Esse sangue não será usado para mais nada.

Projeto: Determinação de Mefloquina e Carboximefloquina em pacientes com Malária por *Plasmodium falciparum* no estado do Amapá. (continuação)

Os pesquisadores utilizarão os dados e o material coletado somente para esta pesquisa e posteriores eventos no âmbito científico, tais como publicações e congressos.

Os principais pesquisadores são a farmacêutica Larissa Maria Guimarães Borges, e o professor Dr. José Luiz Fernandes Vieira, orientador desta pesquisa.

Assinatura do Pesquisador Responsável
Nome: Larissa Maria Guimarães Borges
End: Rua Augusto Correa nº01
Fone: 3201-7733

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações cima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, compreendendo seus benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa, cooperando com a pesquisa através da utilização da amostra doada.

Macapá, __/__/____.

Assinatura



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Processo Nº: 004/2003/CEP/IEC/SVS/MS

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

Pesquisador Responsável no Centro: Marinete Marins Póvoa

PARECER

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

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

Belém, 24 de julho de 2003.


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