



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

**LUIZ CARLOS DE SOUZA RODRIGUES**

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E CONCENTRAÇÕES DE  
PRIMAQUINA E CARBOXIPRIMAQUINA EM PACIENTES COM MALÁRIA POR  
*Plasmodium vivax*.**

**Belém - Pará**

**2014**

LUIZ CARLOS DE SOUZA RODRIGUES

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E CONCENTRAÇÕES DE  
PRIMAQUINA E CARBOXIPRIMAQUINA EM PACIENTES COM MALÁRIA POR  
*Plasmodium vivax*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.  
Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira

**Belém - Pará  
2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Rodrigues, Luiz Carlos de Souza, 1965-

Marcadores de estresse oxidativo e concentrações de primaquina e carboxiprimaquina em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* / Luiz Carlos de Souza Rodrigues. - 2014.

Orientador: José Luiz Fernandes Vieira.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2014.

1. Malária. 2. Plasmodium Vivax. 3. Stress oxidativo. 4. Primaquina. I. Título.

CDD 22. ed. 616.9362

---

LUIZ CARLOS DE SOUZA RODRIGUES

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E CONCENTRAÇÕES DE  
PRIMAQUINA E CARBOXIPRIMAQUINA EM PACIENTES COM MALÁRIA POR  
*Plasmodium vivax*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira

Aprovada em: 06 / 11 / 2014

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. José Luiz Fernandes Vieira  
Orientador – NMT/UFPA

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Flávio Vasconcelos  
Membro da Banca – ICS/UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Osmarina Pereira da Paixão e Silva  
Membro da Banca – ICS/UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Fani Donabella  
Membro da Banca – ICS/UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luisa Carício Martins  
Membro da Banca – NMT/UFPA

## DEDICATÓRIA

A Deus, sem ele nada seria possível e aos meus pais, Antônio Rodrigues e Regina de Souza Rodrigues (*in memoriam*), que dedicaram parte de sua vida à minha formação.

## AGRADECIMENTOS

Mesmo com vários momentos difíceis, finalizo mais uma etapa da minha vida. O Doutorado em Doenças Tropicais, um sonho, que por certas vezes parecia inalcançável. Diante dessa conquista, agradeço primeiramente a Deus, que me deu o dom da vida presenteando-me com a liberdade e abençoando com inteligência e força para lutar.

À virgem Maria, fonte de fé e espiritualidade.

À Universidade Federal do Pará, ao Instituto de Ciências da Saúde, Núcleo de Medicina Tropical e à faculdade de Farmácia pela oportunidade de crescimento acadêmico e científico.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira, além da função de orientar esta tese, pela amizade, incentivo, dedicação, por acreditar e ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À toda minha querida família: irmãs, sobrinhos, que sempre incentivaram o meu sucesso.

Aos amigos de SEMPRE que nunca duvidaram da minha capacidade me dando força e apoio incondicional: Arthêmio Santos, Fátima Santos, Graça Tuma, Diana Sacramento e Dilma Miranda.

Ao sobrinho Irlan Santos Raiol, que me ajudou de forma ímpar no desenvolvimento deste trabalho.

À Amanda Gabryelle, ontem aluna, hoje uma companheira de pesquisa, sobretudo pela sua amizade e colaboração na parte experimental.

Aos Professores do Curso de Farmácia: em especial ao Prof. Eduardo Almeida pela colaboração durante o doutorado e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Osmarina Pereira da Paixão e Silva, pela amizade e realização dos exames hematológicos.

Aos Professores Doutores do Núcleo de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da UFPA pelos conhecimentos compartilhados.

Ao PECEM/IEC/PA representado pela Dra. Ana Maria Ventura e as Técnicas: Miriam, Sônia e Laura, sem o apoio destas, a pesquisa não seria viável.

À Maria V. Viana Benauim “Preta” e Luiz Farias dos Santos da equipe de saúde do município de Anajás – Pará, pela contribuição na coleta de amostra biológica neste município.

Às amigas que ajudaram no Pré-projeto: Ana Célia Portugal, Diana Sacramento, Ires Michele Rodrigues.

Aos Técnicos do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFGA, em especial Lindalva, Marly Lobato, e Kleyfsom, que me ajudaram nas aulas práticas de graduação e o Arlindo, que guardou amostras biológicas para execução do controle dos estudos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marly Carvalho pela amizade e parceria na disciplina Parasitologia.

Aos funcionários do Curso de Farmácia: Ronaldo, Socorro, Graciléia e Silvana pela colaboração.

Aos colegas do LATOX, pelas ajudas na bancada.

E por último, porém EXTREMAMENTE importante, aos pacientes que se dedicaram a esta pesquisa, oferecendo informações valiosas e quantidades de seu próprio sangue, os quais foram possíveis chegar a conclusões inéditas sobre a patogenia da malária. Sem a dedicação deles, nada poderia ser feito.

## RESUMO

As alterações no ciclo redox eritrocitário tem sido associadas a fisiopatogenia da malária grave em modelos experimentais e em humanos. Entretanto, poucos estudos avaliaram mudanças no equilíbrio redox em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* sem gravidade, que representam a maioria dos casos da doença. Não foram caracterizadas as variações do dano oxidativo e a respectiva resposta antioxidante do hospedeiro humano durante a evolução da doença, quer seja, antes, durante e após a quimioterapia, assim como, não foram identificadas em cada fase, os responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, quer sejam, a degradação do heme, o uso de antimaláricos ou a explosão respiratória de macrófagos. Este estudo objetivou estimar marcadores de dano oxidativo e as defesas antioxidantes assim como, os níveis de primaquina e carboxiprimaquina na malária por *P. vivax*. Para tanto, foram incluídos 38 pacientes de ambos os sexos, com diagnóstico positivo para malária por *P. vivax* acompanhados durante 28 dias, nos quais foram realizadas coletas seriais de amostras de sangue antes do tratamento (D0) e após 2 (D2), sete (D7) e quatorze dias (D14). O dano oxidativo e a defesa antioxidante foram avaliados pela medida espectrofotométrica da metemoglobina e dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico e da capacidade antioxidante total e glutatona reduzida, respectivamente. O grupo controle foi composto de 19 voluntários saudáveis pareados em proporção por sexo e idade. A primaquina e seu metabólito foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados indicaram maior incidência da doença em indivíduos do sexo masculino em idade produtiva. Os parâmetros hematológicos mantiveram-se constantes no decorrer do estudo, apesar de monocitose e discreta plaquetopenia. A avaliação bioquímica mostrou redução significativa da fração HDL do colesterol. Os níveis de metemoglobina foram associados ao uso de antimaláricos, pois foram semelhantes ao grupo controle, e aumentaram no decorrer do tratamento. Os compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico foram associados a presença de parasitas, pois foram maiores em comparação ao grupo controle, e não variaram de forma significativa após administração dos fármacos. A capacidade antioxidante total e o índice de estresse oxidativo foram semelhantes durante o estudo, assim como, com o grupo controle. Os teores de glutatona reduzida diminuíram significativamente no decorrer do experimento em relação ao grupo controle e não houve correlação com a parasitemia. A primaquina não se acumulou significativamente no organismo humano no decorrer do estudo e suas concentrações e da carboxiprimaquina não se associaram a metemoglobinemia e aos níveis de compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico.

Palavras-chave: malária; *Plasmodium vivax*; estresse oxidativo; primaquina;

## ABSTRACT

The changes in redox cycle has been associated with the physiopathology of severity of malaria in experimental models and in humans. However, a few studies evaluated the changes in redox equilibrium of patients with no severe malaria by *P. vivax*, which comprise the majority of the cases of disease. The variations of oxidative damage and the respective antioxidant response of human host were not compared before, during and after chemotherapy. Also, the mechanisms responsible by the generation of free radical in each phase that is, the heme degradation, respiratory burst of macrophages or antimalarials uses, were not determined. The objective of this study was to estimate the levels of biomarkers of oxidative damage and the respective antioxidant response, as well as primaquine and carboxyprimaquine whole blood levels in malaria by *P. vivax*. Therefore, were enrolled 38 patients with slide confirmed infection by *P. vivax* followed by 28 days. Serial blood samples were collected on pre-doses samples (D0) and on D2, D7 and D14. The oxidative damage and the antioxidant defense were estimated by the spectrophotometric measures of thiobarbituric acid reatives substances and methemoglobinemia, and by total antioxidant capacity and reduced glutathione, respectively. The control group consisted of 19 healthy volunteers matched for age and gender ratio. Primaquine and its major metabolite were determined by high performance liquid chromatography. The results revealed that the disease occurred in male patients of working age. Haematological parameters remained constant during the study. Biochemical evaluation showed a significant decrease in HDL-cholesterol levels during the study. Methemoglobinemia was associated with antimalarials uses, because the levels were similar to control group and increased significantly during the treatment. The levels of thiobarbituric acid reatives substances were associated with plasmodium and probably respiratory burst of macrophages, because they were higher than control group on D0, and no significant changes were observed after antimalarials usage. Total antioxidant capacity and oxidative stress levels were similar during the study as well as in the control group. The levels of reduced glutathione decreased significantly during the study and doesn't be associated with both parasitaemia. Primaquine does not show a significant accumulation, and the concentrations of parent drug and its carboxyl metabolite were not associated with methemoglobinemia and thiobarbituric acid reatives substances levels.

Key-words: malaria, *Plasmodium vivax*, oxidative stress, primaquine.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-HPQ	5-hidroxiprimaquina
ABTS <sup>o+</sup>	Cátion 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
ABTS	2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
ATB	Ácido tiobarbitúrico
ATC	Ácido tricloroacético
CAT	Catalase
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
CO	Monóxido de carbono
CPQ	Carboxiprimaquina
CQ	Cloroquina
Cu <sup>2+</sup>	Cátion cuproso
Cu/Zn SOD	Superóxido dismutase-cobre-zinco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
EC-SOD	Superóxido dismutase extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies reativas do oxigênio
ERON's	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
FDA	Food and Drug Administration
Fe <sup>2+</sup>	Cátion Ferroso
Fe III	Quelato de ferro III
FNS	Fundação Nacional de Saúde
Fe [III]PPIX	Ferro [III] Protoporfirina IX
Fp – Fe II	Ferroprotoporfirina ferro II
G6PD	Glicose-6-fosfato Desidrogenase
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase

GSH-Rd	Glutathiona redutase
GSSG	Glutathiona oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HbO	Oxiemoglobina
HETES <sup>12,15</sup>	Hidroxi-ácido-aracônico
IPA	Índice Parasitário Anual
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Persulfato de potássio
μL	Microlitro
μM	Micromolar
M	Molar
MAO	Monoamina oxidase
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Mn-SOD	Superóxido dismutase- manganês
MS	Ministério da Saúde
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NAOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Íon nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Íon nitrato
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido nitroso
NO	Óxido Nítrico
O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Radical superóxido
HO <sup>•</sup>	Radical hidroxila
OH-PUFAS	Ácidos graxos polienólicos
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO-	Radical peroxinitrito
PQ	Primaquina
QND	Quinidina
r	Coefficiente de Correlação de Pearson

RNA	Ácido Ribonucleico
RO <sup>•</sup>	Alcoxila
ROO <sup>•</sup>	Radical peroxila
rpm	Rotações por minuto
SH	Grupamento tiólico
-SS	Dissulfeto
SOD	Superóxido dismutase
TAC	Avaliação da capacidade antioxidante total
TAH	Transferência de átomos de hidrogênio
TE	Transferência de elétrons
TBARS	Substâncias reativas ao Ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
TNB	Ácido nitrobenzóico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico
UFPA	Universidade Federal do Pará
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	17
2.1	<b>Geral</b> .....	17
2.2	<b>Específicos</b> .....	17
3	<b>REFERENCIALTEÓRICO</b> .....	18
3.1	<b>Malária</b> .....	18
3.1.1	Agente etiológico.....	19
3.1.2	Biologia do parasito.....	19
3.1.3	Transmissão.....	21
3.1.4	Patogenia.....	22
3.1.5	Diagnóstico laboratorial.....	23
3.1.6	Tratamento.....	24
3.2	<b>Primaquina</b> .....	28
3.2.1	Química.....	28
3.2.2	Mecanismo de ação.....	28
3.2.3	Propriedades farmacocinéticas.....	29
3.2.4	Efeitos adversos e contra indicações.....	29
3.2.5	Concentrações de primaquina e carboxiprimaquina em sangue total.....	30
3.3	<b>Estresse oxidativo</b> .....	31
3.3.1	Radicais livres.....	32
3.3.2	Geração de radicais livres.....	32
3.3.3	Antioxidantes.....	34
3.3.3.1	<i>Antioxidantes enzimáticos</i> .....	35
3.3.3.1.1	<i>Glutaciona peroxidase (GSH-Px)</i> .....	35
3.3.3.1.2	<i>Superóxido dismutase (SOD)</i> .....	35
3.3.3.1.3	<i>Catalase intraeritrocitária (CAT)</i> .....	36
3.3.3.2	<i>Antioxidante não-enzimático</i> .....	36
3.3.3.2.1	<i>Glutaciona reduzida (GSH)</i> .....	36
3.3.4	Marcadores de estresse oxidativo.....	38
3.3.4.1	<i>Avaliação da capacidade antioxidante total (TAC)</i> .....	38
3.3.4.2	<i>Peroxidação lipídica</i> .....	38
3.3.5	Estresse oxidativo na malária.....	39

<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>Tipo de estudo, casuística e seleção da amostra.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b>Local da pesquisa e coleta de dados.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3</b>	<b>Crítérios de inclusão e exclusão.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4</b>	<b>Dados demográficos e epidemiológicos.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5</b>	<b>Amostras.....</b>	<b>46</b>
<b>4.6</b>	<b>Procedimentos laboratoriais.....</b>	<b>47</b>
<b>4.6.1</b>	Determinação da parasitemia inicial.....	47
<b>4.6.2</b>	Determinação da peroxidação lipídica (TBARS).....	48
<b>4.6.3</b>	Determinação da capacidade antioxidante não enzimática total (TAC).....	49
<b>4.6.4</b>	Índice de estresse oxidativo (EO).....	50
<b>4.6.5</b>	Determinação de glutatona reduzida (GSH).....	50
<b>4.6.6</b>	Determinação dos teores de metemoglobina.....	51
<b>4.7</b>	<b>Determinação de primaquina e carboxiprimaquina.....</b>	<b>52</b>
<b>4.7.1</b>	Procedimento de extração da primaquina.....	53
<b>4.8</b>	<b>Análise dos dados.....</b>	<b>54</b>
<b>4.9</b>	<b>Parecer da comissão de ética.....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Biomarcadores de estresse oxidativo.....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>90</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa, aguda e febril, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos ao homem pelas fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, que inoculam formas infectantes durante o repasto sanguíneo (BRASIL, 2010). Constitui um dos mais sérios problemas de saúde pública do mundo e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 40% (3,4 bilhões de pessoas) da população mundial residente em 104 países está sob risco de contrair a doença, sobretudo àqueles situados nas regiões tropicais e subtropicais, como: África, Ásia e América Latina. Em 2012, foram notificados 207 milhões de casos da doença, sendo estimados 627.000 óbitos, dos quais, 91% ocorreram na África. Naquele ano, foram estimados 469.000 casos no continente Americano, dos quais 0,1% evoluindo a óbito, principalmente crianças abaixo de 5 anos de idade e primoinfectados (WHO, 2013).

As espécies de plasmódio causadoras da malária em humanos são: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. O *P. vivax* e *P. falciparum* apresentam maior prevalência mundial, sendo a última, mais letal e predominante na África. O *P. malariae* se difunde pela África subsaariana, na maior parte do sudeste da Ásia, Indonésia e nas ilhas do Pacífico Ocidental. Tem sido relatado em áreas da bacia amazônica. O *P. ovale* é restrito ao continente africano, no entanto foram relatadas infecções no Oriente Médio, Papua Nova Guiné e sudeste da Ásia e o *P. knowlesi*, no Sul e Sudeste da Ásia (WHO, 2013).

As medidas de controle propostas pela OMS para erradicação da malária, como o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas de poder residual prolongado e os derivados da artemisinina, contribuíram significativamente para redução da incidência global de *P. falciparum*, contudo, sem efeito significativo sobre o *P. vivax*, que predomina em várias áreas endêmicas (WHO, 2013). Atualmente, esta espécie é responsável por cerca de 65% dos casos da doença fora do continente africano (África Sub saareana), como no sudeste da Ásia, Índia e nas Américas Central e do Sul (WHO,2013).

O tratamento da malária por *P. vivax* objetiva a cura radical da infecção, isto é, a interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da doença e a erradicação das formas latentes do parasito

nos hepatócitos (hipnozoítos), responsáveis pela recaída tardia da infecção (BRASIL, 2009). Para tanto, o Ministério da Saúde (MS) recomenda a associação cloroquina (CQ) e primaquina (PQ), com dosagens adequadas a idade e peso do paciente (FREITAS *et al.*, 2007). São propostos dois esquemas de tratamento em função da dose de PQ: o longo de 14 dias (0,25mg/Kg por dia) e o curto de sete dias (0,50mg/Kg por dia; BRASIL, 2010).

O *P. vivax* é responsável por 80% dos casos de malária na Amazônia legal. É considerado menos letal que *P. falciparum*, pois geralmente não alcança elevada densidade parasitária, assim como, não sofre sequestro nos capilares e vênulas (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 2000), ocasionando formas clínicas menos graves, entretanto pela elevada morbidade acarreta perdas socioeconômicas significativas em nossa região. Estudos recentes reportam o agravamento de alguns casos de malária por *P. vivax* como: icterícia, comprometimento cerebral, anemia grave, hemoglobinúria, síndrome da angústia respiratória aguda e outras complicações pulmonares, insuficiência renal, hemólise, choque e coma (GARCIA, 2010; LACERDA *et al.*, 2012).

Não foram esclarecidos os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo agravamento do quadro clínico, entretanto alguns autores sugeriram a participação das espécies reativas de oxigênio e do nitrogênio (ERON's; PABÓN *et al.*, 2003; HUBER *et al.*, 2002; DONDORP *et al.*, 2003; OMODEO-SALÉ *et al.*, 2003; BECKER *et al.*, 2004; YAZAR *et al.*, 2004; WILMANSKI *et al.*, 2005; KUMAR e BANDYOPADHYAY, 2005; JARAMILLO *et al.*, 2005; DEY *et al.*, 2009). De fato, foram relatadas alterações no ciclo redox de eritrócitos infectados, resultantes do aumento da geração de radicais livres no metabolismo do plasmódio, da explosão respiratória dos macrófagos com o intuito de debelar a infecção e do uso de antimaláricos (POTTER *et al.*, 2005; KELLER *et al.*, 2004), levando a resposta antioxidante do parasita e do hospedeiro humano no decorrer da infecção para contrapor a ação das ERON's (SOHAIL *et al.*, 2007). Por fim, alterações genéticas das enzimas envolvidas no ciclo redox eritrocitário e a síndrome de isquemia e reperfusão nos casos graves da doença, contribuem para as alterações redox na fase aguda da infecção (BECKER *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Estudos destinados a avaliar as alterações no equilíbrio oxidativo eritrocitário na fase aguda da doença se detiveram nos modelos experimentais e em pacientes com *P. falciparum*, de forma que, há poucos relatos acerca da malária por *P. vivax*

sem sinais e sintomas sugestivos de gravidade, os quais prevalecem em áreas endêmicas (PERCÁRIO *et al.*, 2012). Considerando-se a elevada incidência de malária por *P. vivax* na região amazônica, a repercussão socioeconômica e a possibilidade de agravamento de alguns casos, tornou-se necessária a compreensão da interação parasito-hospedeiro e a repercussão no ciclo redox eritrocitário, nos levaram a realização desta pesquisa, que objetivou determinar índices de estresse oxidativo (EO), antes, no decorrer e após o tratamento da malária por *P. vivax*, fornecendo informações para entendimento de mecanismos responsáveis pelas alterações redox na Infecção, como por exemplo: O dano oxidativo aumenta em pacientes com malária por *P. vivax*? A defesa antioxidante do hospedeiro compensa de forma adequada o aumento da geração de ERON's? As concentrações de PQ se associam ao dano oxidativo eritrocitário, uma vez que, seu mecanismo de ação é devido a metabólitos oxidados?

Para tanto, foi realizado estudo prospectivo de casos não graves de malária por *P. vivax*, os quais foram acompanhados por 28 dias de acordo com recomendações da OMS, e avaliados em três momentos distintos, antes, durante e após tratamento, os compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico e a metamoglobinemia, como marcadores de lipoperoxidação e estado oxidativo eritrocitário, respectivamente, assim como, a capacidade antioxidante total não enzimática e o consumo de glutathione reduzida, como marcadores da defesa antioxidante do hospedeiro. Um grupo controle pareado por sexo e idade foi constituído para comparação dos diferentes marcadores. Por fim, as concentrações de PQ e carboxiprimaquina (CPQ) também foram estimadas e associadas aos referidos compostos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Determinar marcadores de estresse oxidativo associando-os as concentrações sanguíneas de primaquina e carboxiprimaquina em pacientes com malária por *Plasmodium vivax*, antes, durante e após tratamento.

### 2.2 Específicos

- Descrever o perfil epidemiológico dos pacientes incluídos no estudo;
- Estimar parâmetros hematológicos e bioquímicos no decorrer do estudo;
- Determinar as concentrações plasmáticas de primaquina e carboxiprimaquina;
- Quantificar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a metemoglobina para estimar o dano oxidativo;
- Quantificar a capacidade antioxidante não enzimática total e os níveis de glutathione reduzida para estimar as defesas antioxidantes;
- Comparar os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, metemoglobina, glutathione reduzida e a capacidade antioxidante total entre os diferentes dias de estudo e com o grupo controle;
- Correlacionar as concentrações de primaquina e carboxiprimaquina com os níveis de metemoglobina e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Malária

A malária é uma das principais endemias mundiais, pois cerca de 40% da população mundial vive sob risco de contrair a protozoose. Em 2012, foram estimados 207 milhões de casos no mundo, principalmente no continente africano (80%), seguido pela Ásia (13%), Mediterrâneo Oriental e América Latina. Foram registrados cerca de 627 mil óbitos, dos quais, 90% na África, 7% no sudeste asiático e 3% no Mediterrâneo Oriental. Destes, cerca de 482 mil (72%) foram em menores de cinco anos (WHO, 2013).

Nas Américas, a malária é endêmica em 21 Países, nos quais se estima aproximadamente 120 milhões de pessoas sob risco de contrair a doença. Em 2012, foram registrados 469.000 casos no continente americano. Destes, 52% no Brasil, onde o *P. vivax* responsável por cerca de 80% dos casos (WHO, 2013).

No Brasil, o MS (2014), reportou diminuição na média do número de casos em 2013 (181.643 registros), destes 97,54% foram notificados na Amazônia Legal, onde a maioria ocorre na área rural. O risco de contrair malária, que é determinado pelo Índice Parasitário Anual (IPA), não é homogêneo na região, em razão das formas de ocupação do solo resultante da mobilidade populacional associada a exploração econômica dos recursos naturais (Figura 1) (BRASIL, 2010; TAUIL, 2011; BRASIL, 2014). O elevado número de casos compromete a capacidade produtiva do amazônida e o conseqüente desenvolvimento da região.



Figura 1. Distribuição de casos de malária confirmados (por 1000 habitantes) no Brasil. Fonte: WHO, 2013.

### 3.1.1 Agente etiológico

Os causadores da malária são protozoários obrigatórios, pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidiida, ordem Hemosporidiida, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Cinco espécies podem infectar o homem: *P. falciparum* (Welch, 1897), *P. vivax* (Grassi e Feletti, 1890), *P. malariae* (Laveran, 1881), *P. ovale* (Stephens, 1922) e *P. knowlesi* (Knowles e Gupta, 1932; GARCIA, 2010; BRAGA e FONTES, 2011; WHO, 2013).

O *P. falciparum* é responsável pelos casos mais graves, enquanto o *P. vivax* pelas recaídas tardias da doença. Estas espécies são as mais prevalentes, a primeira na África e o *P. vivax* nas demais áreas endêmicas (WHO, 2013). O *P. malariae* é pouco frequente e ocorre na África subsaariana, no sudeste da Ásia, Indonésia, nas ilhas do Pacífico Ocidental e em áreas da bacia amazônica. O *P. knowlesi* tem sido relatado no sul e sudeste da Ásia e o *P. ovale* em algumas regiões da África Ocidental, ilhas do Pacífico Ocidental e sudeste da Ásia (WHO, 2013).

### 3.1.2 Biologia do parasito

O ciclo sexuado do *Plasmodium* ocorre na fêmea do mosquito *Anopheles*, e o assexuado no homem. O *P. vivax* tem ciclo eritrocitário de 48 horas e produz a malária terçã benigna, assim denominada pela menor gravidade, quando comparada à malária ocasionada por *P. falciparum* (CORNEJO e ESCALANTE, 2006).

O ciclo pré-eritrocítico se inicia quando a fêmea do mosquito *Anopheles* durante o repasto sanguíneo em um indivíduo, inocula os esporozoítos, que migram para os hepatócitos iniciando o processo de desenvolvimento e multiplicação, se diferenciando em criptozoítos, que crescem e iniciam a reprodução assexuada (esquizogonia tecidual) formando os esquizontes, que dão origem a milhares de merozoítos. Nas infecções pelo *P. vivax* e *P. ovale*, o vetor inocula populações geneticamente distintas de esporozoítos. Algumas se desenvolvem rapidamente, enquanto outras ficam latentes nos hepatócitos, conhecidas como hipnozoítos,

responsáveis pelas recaídas da doença após meses ou anos. (BRAGA e FONTES, 2011).

Ao final do ciclo tecidual, os merozoítos liberados invadirão os eritrócitos, diferenciando-se em trofozoítos, que irão se multiplicar por divisão nuclear (esquizogonia sanguínea) formando esquizontes que liberam os merozoítos na circulação sanguínea, os quais invadirão novos eritrócitos. Após algumas gerações, alguns merozoítos se diferenciam para formas sexuadas (ALECRIM e ALECRIM, 2005).

O hospedeiro invertebrado após ingerir sangue humano contendo as formas sexuadas (gametócitos) inicia então o ciclo vital (esporogônico) em seu aparelho digestivo. No estômago do anofelino, os microgametas fecundam os macrogametas, gerando os zigotos, que se transformam em oocinetos (forma móvel) que migram até a parede do intestino médio, formando os oocistos, que crescem, rompem e liberam os esporozoítos na hemolinfa, que se dirigem às glândulas salivares, e são transferidos para o sangue do hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo, iniciando novo ciclo de vida do *Plasmodium* (Figura 2) (RICHIE e SAUL, 2002 ; CDC,2014).

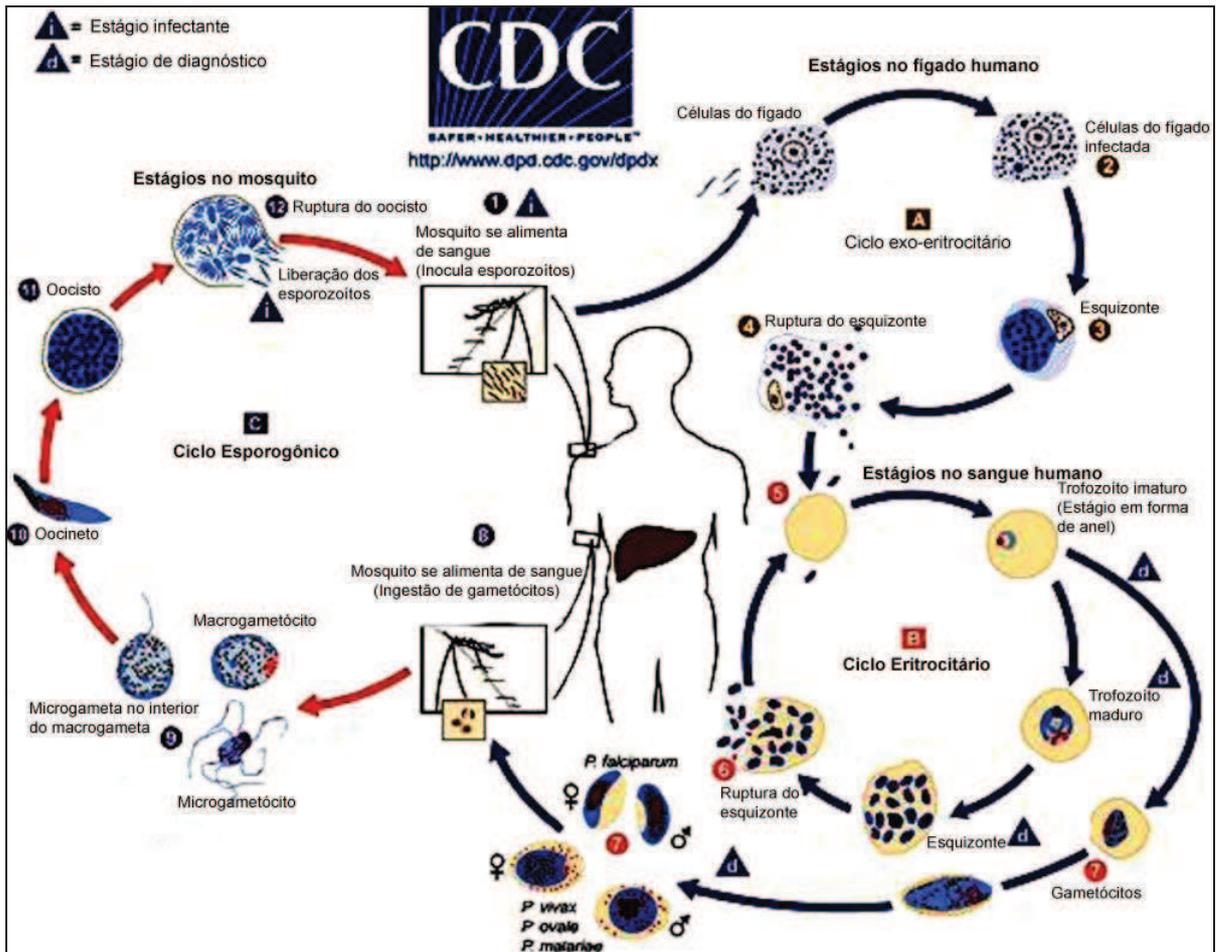


Figura 2. Esquema adaptado do Ciclo Biológico da Malária Humana. FONTE: CDC, 2014.

O ciclo de vida do *P. vivax* subsiste a temperatura de até 15°C, abaixo da qual, fica comprometido. Por outro lado, em locais quentes é encurtado, aumentando assim a possibilidade de transmissão. O período de incubação varia de 12 a 17 dias, entretanto, nos climas temperados e subtropicais, poderá ser prolongado em algumas cepas (ANDRADE, 2005; CDC, 2014).

### 3.1.3 Transmissão

Depende da presença dos portadores de gametócitos (humanos) e dos vetores. Estes são insetos da ordem Díptera, família Culicidae e gênero *Anopheles*, compreendendo cerca de 400 espécies. Poucas espécies têm importância para transmissão da malária humana (BRASIL, 2009). No Brasil, cerca de cinco espécies são importantes: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *A. (N.) aquasalis*, *A. (N.) albivittatus*, *A. (Kerteszia) cruzii* e *A. (K.) bellator* (BRASIL, 2010).

Também pode ser transmitida acidentalmente por transfusão de sangue infectado, pelo compartilhamento de seringas (em usuários de drogas ilícitas) ou por acidentes com agulhas e/ou lancetas contaminadas. Há possibilidade de transmissão congênita (BRASIL, 2009).

### 3.1.4 Patogenia

O ciclo eritrocítico assexuado é responsável pelas manifestações clínicas da doença, uma vez que a destruição dos eritrócitos infectados e consequente liberação de compostos resultante da degradação do heme na circulação estimulam macrófagos e outras células a produzirem citocinas responsáveis pelo quadro clínico característico da infecção, com febre alta acompanhada de calafrio, sudorese intensa e cefaleia, que ocorrem em padrões cíclicos, dependendo da espécie de plasmódio infectante, que é de 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax* e 72 horas para *P. malariae*. Em alguns pacientes, ocorrem sintomas prodrômicos, como náuseas, vômitos, astenia, fadiga e anorexia (PIMENTEL *et al.*, 2007; BRASIL, 2009). Nos indivíduos imunes alguns destes sinais e sintomas podem ser brandos ou ausentes (BRASIL, 2009). Ressalta-se que a infecção também pode resultar das recaídas ocasionadas pelas formas tissulares latentes (PIMENTEL *et al.*, 2007).

Cada espécie de *Plasmodium* produz um padrão característico de manifestações clínicas que podem ser leve, moderada ou grave. (BRASIL, 2010). Na maioria dos casos, a malária pelo *P. vivax* é benigna, com sinais e sintomas típicos do acesso malárico, contudo, pode evoluir para forma grave, que é caracterizada por hipoglicemia, vômitos repetidos, comprometimento cerebral, insuficiência renal, complicações pulmonares, icterícia, anemia grave, distúrbios hidroeletrolíticos e do equilíbrio ácido-base, distúrbios hemorrágicos e da coagulação e coma, que geralmente cursa com hiperparasitismo (mais de 5% dos eritrócitos infectados). Ressalta-se que continuam desconhecidos os mecanismos patogênicos responsáveis pelos casos graves de malária por *P. vivax* (MYOUNG-DON *et al.*, 2001; MOHAPATRA *et al.*, 2002; WHO, 2010; ANSTEY *et al.*, 2012).

O *P. vivax* tem maior capacidade de induzir resposta inflamatória, resultando em menor limiar pirogênico, quando comparado ao *P. falciparum*. Por outro lado, a aderência das células endoteliais é menos frequente na infecção pelo *P. vivax*.

Porém o risco de anemia grave é semelhante nas duas espécies (ANSTEY *et al.*, 2012).

### 3.1.5 Diagnóstico laboratorial

Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para o diagnóstico da infecção, como a pesquisa direta do *Plasmodium* por microscopia ótica; indireta por detecção de anticorpos (Imunofluorescência indireta), *Enzyme – linked Immunosorbent Assays*; demonstração de antígenos por imunocromatografia e por reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação gênica dos plasmódios (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2007).

O diagnóstico tradicional é realizado através da visualização microscópica do plasmódio na gota espessa de sangue, corada pela técnica de Giemsa ou de Walker. Esta técnica é considerada o padrão-ouro para diagnóstico e monitoramento do tratamento da doença, contudo exige pessoal treinado para o exame das distensões sanguíneas (BRASIL, 2009).

### 3.1.6 Tratamento

O tratamento é complexo e composto por medicamentos pertencentes a várias classes químicas, usados sob regime terapêutico variado, cuja ação ocorre em diferentes sítios do ciclo biológico do plasmódio (NORONHA *et al.*, 2000; BRASIL, 2010). Uma vez confirmado o diagnóstico, a terapêutica deve ser logo iniciada, observando os seguintes critérios: espécie do plasmódio, pela especificidade dos esquemas terapêuticos; idade do paciente, pela maior toxicidade dos antimaláricos às crianças e idosos; histórico anterior de malária, pela possibilidade de resistência; gravidez e comorbidades, condições de maior risco para a forma grave da doença e a capacidade operacional dos serviços de saúde. Nos casos graves há necessidade de hospitalização e utilização de formas farmacêuticas injetáveis com ação mais rápida sobre os parasitos, visando reduzir a letalidade (BRASIL, 2010).

De acordo com a ação no ciclo de vida do plasmódio (Figura 3), os quimioterápicos podem ser classificados como esquizonticida sanguíneo, os quais inibem o desenvolvimento dos esquizontes eritrocitários, como a CQ, quinina, amodiaquina, mefloquina, halofantrina, artemisinina e derivados, tetraciclina, proguanil, pirimetamina, sulfas, e sulfonas; esquizonticida tecidual, que agem contra os esquizontes do estágio exoeritrocitário, como a PQ; gametocitocidas que bloqueiam a transmissão, como a PQ, CQ e quinina; e esporonticida, que impedem a infecção pelos esporozoítos, entretanto, não existe fármaco deste grupo disponível para uso em humanos (BAIRD, 2009; BRAGA e FONTES, 2011).

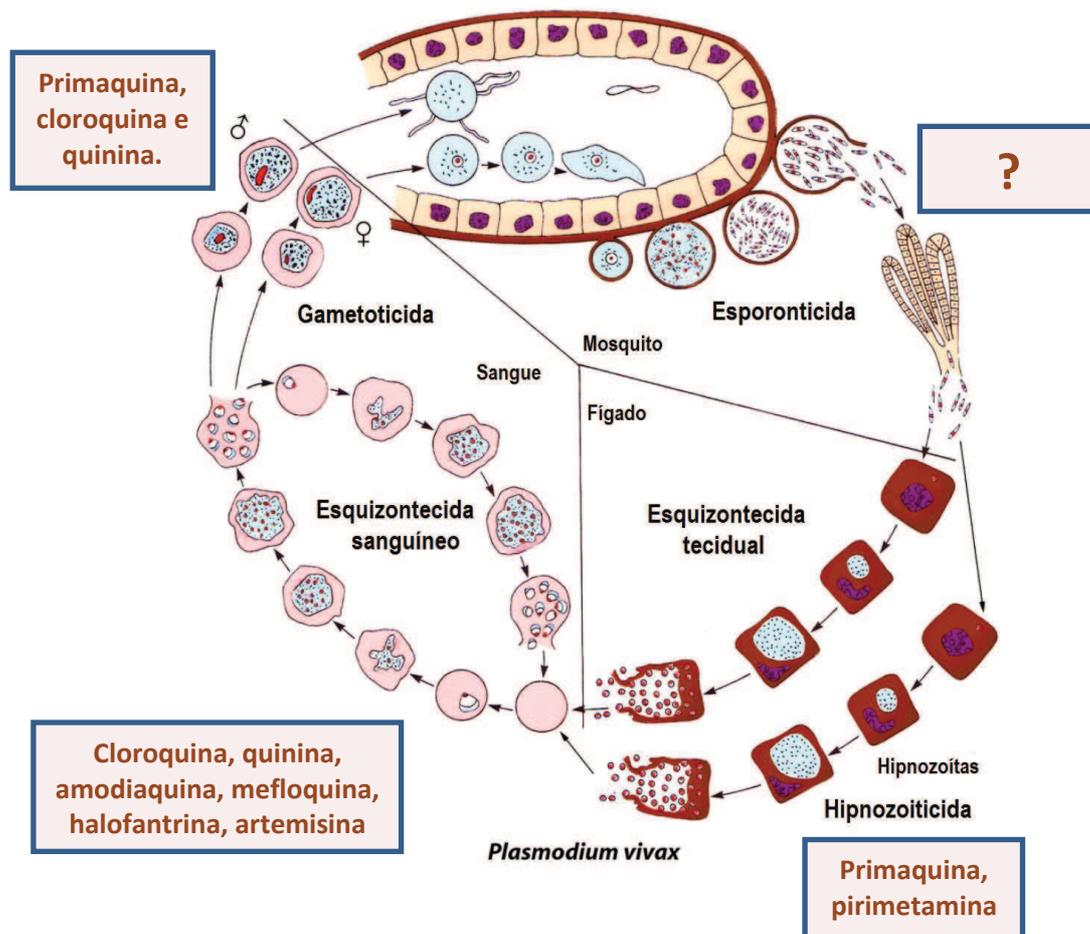


Figura 3. Local de ação dos Quimioterápicos nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium vivax*. Fonte: adaptada de BAIRD, (2009).

Outra classificação comumente utilizada se baseia nos grupos químicos constituintes principais das moléculas destes fármacos (Quadro 1; WHO,2010).

Quadro 1. Antimaláricos classificados de acordo com as classes químicas.

FAMÍLIA QUÍMICA	ANTIMALÁRICOS
4-Aminoquinolinas	Cloroquina, Amodiaquina, Piperaquina
Amino-alcoois	Quinina, Quinidina, Mefloquina, Halofantrina, Lumefantrina
Sulfonamidas e sulfonas	Sulfadoxina, Sulfalena, Dapsona
Biguanidas	Proguanil, Clorproguanil
Diaminopirimidina	Pirimetamina
8-Aminoquinolina	Primaquina
Lactonas sesquiterpênicas	Artemisinina, Arteter, Artemeter, Artesunato, Dihidroartemisinina
Naftoquinona	Atovaquona

Fonte: WHO, 2010.

Para cura radical da infecção pelo *P. vivax* é necessário associar um esquizotocida sanguíneo, como a CQ, a um hipnozoitocida, como a PQ. São propostos dois esquemas de tratamento em função da dose de PQ: longo de 14 dias (0,25mg/Kg por dia) e curto de sete dias (0,50mg/Kg por dia; BRASIL, 2010). Os esquemas recomendados pelo MS para tratamento da malária por *P. vivax* estão apresentados no quadro 2 (BRASIL, 2010). Quando a PQ é utilizada como gametocitocida, a dose varia de 0,50 a 0,75 mg/Kg, administrada em única tomada (BRASIL, 2001; FDA, 2001; PAREDES *et al.*, 2002). A ação hipnozoitocida é alcançada, geralmente, após dose total de 3,0 a 35 mg/kg. Estudos clínicos demonstraram que a dose total é a principal determinante da eficácia terapêutica, pois o risco de recaída diminui proporcionalmente ao aumento da dose administrada de PQ (JOHN *et al.*, 2012). Sendo assim, a OMS recomenda o ajuste da dose e tempo de administração para pacientes com peso igual ou superior a 70kg, objetivando alcançar dose total de 7,2 mg/kg. O ajuste de peso para as doses de PQ está apresentado no Quadro 3.

Quadro 2 - Tratamento das infecções pelo *P. vivax* ou *P. ovale* com cloroquina em 3 dias e primaquina em 7 dias (esquema curto).

Idade/peso	Número de comprimidos de medicamento por dia						
	1º dia		2º dia		3º dia		4º ao 7º dias
	Cloroquina	Primaquina infantil	Cloroquina	Primaquina infantil	Cloroquina	Primaquina infantil	Primaquina infantil
6-11 meses (5-9kg)	1/2	1	1/4	1	1/4	1	1/2
1-3 anos (10-14kg)	1	2	1/2	1	1/2	1	1
4-8 anos (15-24kg)	1	2	1	2	1	2	2
Idade/peso	Cloroquina	Primaquina adulto	Cloroquina	Primaquina adulto	Cloroquina	Primaquina adulto	Primaquina adulto
9-11 anos (25-34kg)	2	1	2	1	2	1	1
12-14 anos (35-49kg)	3	2	2	2	2	2	1
≥15 anos (≥50kg)	4	2	3	2	3	2	2

- Cloroquina: comprimidos de 150mg, primaquina infantil: comprimidos de 5mg e primaquina adulto: comprimidos de 15mg.
- Sempre dar preferência ao peso para a escolha da dose.
- Todos os medicamentos devem ser administrados em dose única diária.
- Administrar os medicamentos preferencialmente às refeições.
- Não administrar primaquina para gestantes ou crianças menores de 6 meses.

Fonte: BRASIL, 2010

Quadro 3 - Ajuste da dose e tempo de administração da primaquina para pacientes com peso igual ou superior a 70 Kg.

Faixa de peso (kg)	Dose total de primaquina (mg)	Tempo de administração (30 mg/dia)
70-79	240	8
80-89	272	9
90-99	304	10
100-109	336	11
110-120	368	12

Fonte: BRASIL, 2010.

## 3.2 Primaquina

### 3.2.1 Química

A PQ (Figura 4) é uma 8-aminoquinolina, de nome químico difosfato de N4-(6-metoxi-8-quinolinil)-1,4-pentanodiamina, a fórmula molecular é  $C_{15}H_{21}N_3O \cdot 2H_3PO_4$  e a massa molar de 455,34 g/mol. O difosfato de primaquina apresenta-se como cristais amarelos, com ponto de fusão entre 197 e 198 °C, sendo de alta solubilidade (1: 10 a 30 partes) em água (THE MERCK, 2006) e alta permeabilidade, considerado como Classe I pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (WHO, 2005).

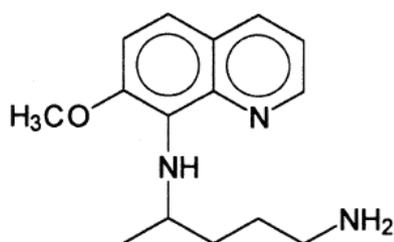


Figura 4. Estrutura química da primaquina. Fonte: PALIWAL e GUPTA (1998).

Foi desenvolvida nos Estados Unidos em 1946 a partir da pamaquina e aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1952, para a cura radical da infecção por *P. vivax* e *P. ovale*, devido sua ação hipnozoitocida, entretanto deve ser associada a um esquizontocida sanguíneo. Apresenta também ação gametocitocida contra o *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* (VALE *et al.*, 2005; THE MERCK, 2006; DEEN *et al.*, 2008 e VALE, 2009 b; BRASIL, 2010).

### 3.2.2 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado, mas acredita-se que se intercale entre os pares de bases do DNA (ácido desoxirribonucleico) do parasito, impedindo que as enzimas DNA e RNA (ácido ribonucleico) polimerase repliquem o material genético. Alguns autores sugeriram a participação de mecanismos de oxirredução do parasito e do hospedeiro, tanto através da produção de ERO, quanto pela interferência no transporte de elétrons da cadeia respiratória,

comprometendo as funções da mitocôndria (ANTUÑANO, 1999; BRASIL 2001; VALE *et al.*, 2009a)

### 3.2.3 Propriedades farmacocinéticas

A PQ é completamente absorvida pelo trato gastrointestinal após administração oral, alcançando níveis plasmáticos máximos entre uma a três horas, com concentração média de pico de  $153 \pm 25$  ng/mL (131-180 ng/mL). Distribui-se rapidamente pelos tecidos, e pequena quantidade se liga a alfa-1-glicoproteína. O volume de distribuição varia de 200 a 300 L e a meia vida biológica em torno de cinco horas em indivíduos saudáveis, sugerindo ausência de acumulação significativa no organismo (LAWPOOLSRI *et al.*, 2008).

É rapidamente biotransformada no fígado e pequena fração é excretada inalterada na urina em 24 horas. Duas vias metabólicas foram descritas para PQ. Uma delas envolve enzimas do citocromo P-450 (CYP2C19, 3A4 e 2D6) originando produtos de biotransformação oxidados como: 5-hidroxiprimaquina, 5-hidroxidimetilprimaquina e 6-metoxi-8-hidroxilaminoquinolina. A outra leva a formação da CPQ, via monoamino oxidase A, que foi o primeiro metabólito identificado em ratos, macacos e humanos. É formada em maior quantidade em comparação aos derivados hidroxilados, assim como, apresenta meia vida superior a PQ, entretanto é desprovida de ação antimalárica, que tem sido associada aos metabólitos oxidados (CONSTANTINO *et al.*, 1999; HILL *et al.*, 2006; VALE *et al.*, 2009b).

### 3.2.4 Efeitos adversos e contra indicações

Os efeitos adversos nas doses terapêuticas empregadas são náuseas, vômitos, dor epigástrica, cólicas abdominais e alteração da acomodação visual, no entanto, podem ocorrer reações hematológicas graves nos indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) ou metemoglobina redutase, com consequente anemia hemolítica metemoglobinemia, respectivamente. Raramente pode ocasionar leucopenia, agranulocitose, leucocitose e arritmia cardíaca (BRASIL, 2001; HILL *et al.*, 2006).

A PQ não deve ser associada à mepacrina, mielossuppressores e agentes hemolíticos, os quais podem potencializar as reações adversas. É contraindicada nas grávidas, pelo risco de hemólise nos fetos, na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), nos menores de seis meses, pois pode causar hipoplasia e aplasia medular e nos pacientes com granulocitopenia, artrite reumatóide e lúpus eritematoso (BRASIL, 2001; HILL *et al.*, 2006).

### 3.2.5 Concentrações de primaquina e carboxiprimaquina em sangue total

A avaliação da eficácia terapêutica na malária por *P. vivax* se fundamenta nas respostas clínica e parasitológica. A OMS recomenda que sejam feitas avaliações em diferentes dias de seguimento clínico e laboratorial (D0, antes da primeira dose do medicamento, D3, D7, D14, D21 e D28). Os determinantes da resposta terapêutica são multifatoriais e várias ferramentas de avaliação tem sido empregadas, dentre estas, a monitorização das concentrações de antimaláricos, que permite correlacionar a resposta parasitológica às concentrações sanguíneas dos fármacos, auxiliando na interpretação das falhas terapêuticas e na caracterização da resistência do plasmódio, bem como, no estabelecimento de esquemas terapêuticos adequados para as diferentes áreas endêmicas, uma vez que, concentrações subterapêuticas de antimaláricos nos fluídos biológicos exercem forte pressão seletiva ao parasita, elevando o risco de resistência; por outro lado, altas concentrações podem acarretar efeitos tóxicos (DUARTE e GYORKOS, 2003; WHO, 2011).

Elevada variabilidade intra e inter individual dos parâmetros cinéticos são comumente reportadas, gerando dados inconsistentes para estabelecimento do esquema terapêutico ideal. De fato, a dose do antimalárico deve ser adequada para determinadas populações-alvo, tais como crianças, grávidas e nas comorbidades (especialmente HIV/AIDS e desnutrição), objetivando assegurar a eficácia terapêutica, quer seja, prover níveis sanguíneos que excedam a concentração inibitória mínima ao parasito, assegurando desta forma a cura (WHO, 2011). Diversos fatores influenciam nas concentrações de antimaláricos nos fluídos biológicos e, como conseqüência, a resposta terapêutica, os quais são inerentes ao fármaco, como suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e prováveis

mecanismos de ação; as características intrínsecas do organismo humano, como o histórico de episódios anteriores de malária, estado imune, comorbidades, obesidade e as condições de exposição, como dose e duração do tratamento (WHO, 2011).

A monitorização terapêutica das concentrações de PQ e de CPQ, apresenta inúmeros desafios, como a reduzida meia vida biológica do fármaco original, pois mais de 90% é excretado em até 24 horas após administração via oral, indicando a ausência de acúmulo; as diversas teorias acerca da ação antimalárica da PQ, se devida ao próprio fármaco ou a produtos de biotransformação oxidados, formados em pequena quantidade e de meia vida extremamente reduzida. Por outro lado, a CPQ apresenta meia vida superior a PQ e pode se acumular no organismo humano, contudo, é desprovida de atividade biológica, e sua determinação em fluidos biológicos tem sido recomendada para confirmar adesão ao regime terapêutico proposto (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 2014).

Os níveis de PQ e CPQ podem ser estimados em diferentes matrizes, como sangue total, urina, plasma ou soro. O emprego de sangue total permite obter concentrações maiores dada a reduzida meia vida biológica do fármaco (WHO, 2011). A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica analítica de escolha, dada a sensibilidade, especificidade, limite de detecção e de quantificação. Na etapa de extração da matriz biológica tanto a técnica líquido-líquido, quanto a sólido-líquido asseguram boa precisão e recuperação dos analitos. Contudo a última demanda cartuchos sólidos não reutilizáveis que encarecem as análises. Neste estudo, foi usada a extração líquido-líquido que preenche os requisitos de validação de métodos bioanalíticos (WHO, 2011).

### **3.3 Estresse oxidativo**

O EO decorre do desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a ação dos sistemas de defesa antioxidante acarretando danos a macromoléculas, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Resulta tanto da produção excessiva de radicais livres, quanto da diminuição da defesa antioxidante do organismo (BARBOSA, *et al.*, 2010; PERCÁRIO *et al.*, 2012).

### 3.3.1 Radicais livres:

São átomos ou moléculas contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Isto determina uma atração para um campo magnético, tornando-os altamente reativos com qualquer composto próximo para obter estabilidade (BARREIROS *et al.*, 2006). Uma molécula qualquer pode se tornar radical livre tanto ganhando, quanto cedendo elétrons em uma reação química, ou quando ocorre fissão homolítica de uma ligação química (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Entretanto, algumas moléculas não se encaixam nesta definição química de radical livre, pois não apresentam elétrons não pareados na última camada, mas são importantes para o metabolismo oxidativo, sendo classificadas de maneira genérica, como ERON's (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). As ERON's derivadas do oxigênio são representadas pelo radical hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ) peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcóxila ( $\text{RO}^\bullet$ ) e aquelas sem características radicalares, como o oxigênio, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso (CIRCU e AW, 2010). Dentre as ERON's derivadas do nitrogênio, incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) óxido nítrico ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ; CIRCU e AW, 2010).

### 3.3.2 Geração de radicais livres

A abstração de elétrons de compostos não radicalares ou a fissão homolítica de ligações químicas ocorrem em inúmeros sítios biológicos, como na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial microssomal, peroxissomas, citoplasma, membrana celular, retículo endoplasmático, lisossomas, reações do citocromo P450 na presença de metais de transição como ferro e cobre, e outras reações enzimáticas (xantina oxidase, indoleamina, dioxigenase, triptofano, desidrogenase, cicloxigenase, lipoxigenase, monoamino oxidase), na fagocitose e nas reações de auto-oxidação. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

No organismo humano, as ERON's estão envolvidas na produção de energia, regulação do crescimento, sinalização intercelular, defesa e síntese de diversas substâncias (PERCÁRIO *et al.*, 2000; JONES, 2006). A exemplo, a fosforilação

oxidativa mitocondrial é reconhecida como fonte de ERON's, e em condições fisiológicas normais mantém níveis basais do radical superóxido, assim como, a explosão respiratória dos fagócitos (macrófagos e neutrófilos) no combate a microorganismos patogênicos, quando o consumo de oxigênio é aumentando em até 100 vezes ao valor basal. O oxigênio é convertido a superóxido pela proteína NADPH oxidase (ABREU *et al.*, 2009).

Por outro lado, a produção excessiva de ERON's acarreta danos as estruturas celulares, com destaque para oxidação dos lipídios da membrana, que leva a alterações funcionais e estruturais, e consequente morte celular (PERCÁRIO, 2000; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007). A magnitude do dano é amplificada em uma cascata autossustentada, que se inicia pela reação com um ácido graxo insaturado e posterior propagação pelos radicais peroxila. Esta cadeia de reações forma vários hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído (MDA; FELLIPE e PERCÁRIO., 1991; MAFRA *et al.*, 1999)

Dentre as ERON's, se destaca o radical hidroxila (HO<sup>•</sup>), formado pela dismutação do ânion superóxido pela enzima superóxido dismutase com produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que na presença de metais de transição, como cobre e ferro, pode levar à produção deste radical via reações de Fenton e Haber Weiss (BARREIROS *et al.*, 2006). A radiação ultravioleta e os raios  $\gamma$  e X também levam a produção do radical OH<sup>•</sup>- nas células epiteliais. É uma espécie radicalar altamente reativa e tóxica, promovendo mutação no DNA, e consequente carcinogenicidade em humanos (GARCEZ *et al.*, 2004). Também inativa proteínas, ao oxidar o radical sulfidrila (-SH) a ponte dissulfeto (-SS), além de oxidar ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, dando início à peroxidação lipídica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é produzido tanto na matriz mitocondrial durante a redução do oxigênio, quanto pela dismutação do radical ânion superóxido pela enzima superóxido dismutase (FRIDOVICH, 1997). Sua importância reside na capacidade de migrar pela célula alcançando alvos distantes do local de formação e de formar radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) na presença de metais de transição, através da reação de Fenton (Figura 6; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os metais de transição mais importantes nesta reação são o Cu<sup>2+</sup> e o Fe<sup>2+</sup>, o qual se destaca pela maior biodisponibilidade no organismo, onde se encontra complexado a proteína de transporte (transferrina) ou armazenado como ferritina e

hemosiderina (BARREIROS *et al.*, 2006). Em pH fisiológico, o íon ferro complexado não participa da geração do radical hidroxila, porém quando mobilizado se ioniza, tornando-se catalisador daquela reação (GARCEZ *et al.*, 2004).

O radical ânion superóxido possui habilidade de liberar  $\text{Fe}^{2+}$  das proteínas de armazenamento e das ferro-sulfoproteínas, como ferritina e aconitase, respectivamente. Também reage com o radical hidroxila, produzindo oxigênio singlet e com o óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ) produzindo peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ; BARREIROS *et al.*, 2006). Em alguns casos, atua como antioxidante, reduzindo semiquinonas, objetivando o retorno das suas atividades metabólicas na célula, como por exemplo, a redução da ubiquinona a ubiquinol, na mitocôndria (BABIOR, 1997), que funciona como sinalizador molecular pela sua capacidade de oxidar grupos-SH (tiólicos) nas ligações dissulfeto, podendo ativar ou inativar enzimas contendo metionina (BARREIROS *et al.*, 2006). Este radical é abundante no organismo (BOVERIS, 1998). É formado na cadeia de transporte de elétrons ou nas células fagocitárias através da NADPH oxidase (DIAZ *et al.*, 1998). Também se origina das reações de autooxidação de alguns compostos endógenos (hemoglobina, mioglobina e catecolaminas) e das reações enzimáticas em diversas organelas celulares (GARCEZ *et al.*, 2004).

### 3.3.3 Antioxidantes

Os antioxidantes protegem o organismo da ação danosa dos radicais livres. São classificados em enzimáticos e não-enzimáticos. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Os primeiros são representados por enzimas como glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Já os não-enzimáticos são representados pela glutathione reduzida (GSH), vitaminas “C” e “E”, beta caroteno, flavonóides, ácido úrico e pelas proteínas queladoras de metais (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

### 3.3.3.1 Antioxidantes enzimáticos

#### 3.3.3.1.1 Glutathione peroxidase (GSH-Px)

Participa da oxidação da glutathione (GSH) a sua forma oxidada (GSSG; Figura 5), a qual é posteriormente reduzida a duas moléculas de GSH pela glutathione redutase (GSH-Rd; AMORES-SANCHEZ e MEDINA, 1999; NORDBERG e ARNÉR, 2001).

#### 3.3.3.1.2 Superóxido dismutase (SOD)

Foi a primeira enzima associada aos mecanismos de oxirredução. Tem como função catalisar a dismutação do ânion superóxido em  $O_2$  e  $H_2O_2$  representando assim, a primeira linha de defesa contra danos causados por ERO's (KUPPUSAMY *et al.*, 2005). Em humanos, existem três formas de SOD. A SOD-cobre-zinco (Cu/Zn-SOD) presente no citosol, a SOD-manganês (Mn-SOD) localizada primariamente na mitocôndria e a forma extracelular EC-SOD (KUPPUSAMY *et al.*, 2005). Todas as isoformas se ligam a ânions de carga simples, como fluoreto, convertendo o  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  por repetidas oxirreduções do metal de transição (MEIER *et al.*, 1998). Alguns protozoários, como aqueles pertencentes ao filo Apicomplexa, apresentam também a SOD-dependente de Fe (SOD-Fe) (MÜLLER, 2004).

A SOD-Mn/Fe, presente nas mitocôndrias, possui atividade antioxidante resultante da doação de elétrons originários da mudança do estado de oxidação do Mn e Fe. A SOD-Mn em humanos difere da SOD-Fe dos eucariotos pelo acoplamento em um tetrâmero resultante da ligação de dois dímeros que gera duas ligações simétricas de quatro hélices. O peso molecular é de 96 kDa, e a atividade modulada pelas citocinas e moderadamente influenciada pelos agentes oxidantes (STRALIN e MARKLUND, 1994; PERRY *et al.*, 2010).

A Cu-Zn-SOD, presente no citosol das hemácias, possui duas subunidades idênticas com peso molecular de 32kDa, as quais possuem sítio ativo (RAHMAN, 2007). Catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (RAHMAN, 2007). Recentemente foi descrita a SOD-extracelular (EC-SOD), que é uma glicoproteína tetramérica composta de íons Cu e Zn e catalisa

as mesmas reações da Cu-Zn-SOD. Possui alta afinidade por alguns glicosaminoglicanos, como heparina. Esta presente nos espaços intersticiais dos tecidos e nos fluídos extracelulares, sendo responsável pela maior parte da atividade da SOD no plasma, linfa e fluido sinovial (FRIDOVICH, 1997). Entretanto sua regulação nos tecidos de mamíferos ocorre, principalmente, através da liberação das citocinas nos processos inflamatórios (RAHMAN, 2007; PERRY *et al.*, 2010).

#### **3.3.3.1.3 Catalase intraeritrocitária (CAT)**

A Catalase tem como função catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio. É composta por quatro subunidades de proteínas, na qual cada uma contém um grupamento heme e uma molécula de NADPH. Encontra-se amplamente distribuída nos peroxissomos, os quais contém grande parte de enzimas capazes de gerar peróxido de hidrogênio. Apresenta elevada atividade no fígado e eritrócitos. (YOUNG e WOODSIDE, 2001).

#### **3.3.3.2 Antioxidante não-enzimático**

##### **3.3.3.2.1 Glutathiona reduzida (GSH)**

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo (*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-cisteinilglicina) considerado a primeira linha de defesa contra as ERON's nas hemácias. Possui diversas funções, como por exemplo, é cofator de diversas enzimas, como glutathiona peroxidase, glutathiona-S-transferase, glutaredoxinas e glioxalases. É oxidada a glutathiona dissulfeto (GSSG) pela glutathiona peroxidase. É considerada um tampão redox sulfidrílico, pois mantém os resíduos cisteinil da hemoglobina e de outras proteínas no estado reduzido (PANDEY e RIZVI, 2011).

Quando os teores de GSH estão reduzidos, como por exemplo, na deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase, não há doação do NADPH, que atua como cofator da glutathiona redutase na redução da GSSG a GSH, reduzindo a inativação das ERONs, com consequente dano oxidativo ao eritrócito, promovendo hemólise e formação de metemoglobina. Ocorrem também alterações na morfologia

eritrocitária com perda da flexibilidade da membrana impedindo sua passagem para órgãos vitais e a formação de corpúsculos de Heinz, os quais conjuntamente favorecem a fagocitose do eritrócito pelo sistema retículo-endotelial (ALVES *et al.*, 2003).

No ciclo catalítico da GSH (Figura 5), podem ser identificadas três enzimas: a glutationa oxidase (GO), a GSH-Px e a glutationa redutase (GR). As duas primeiras catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a última é responsável pela regeneração de GSSG a sua forma reduzida na presença de NADPH (HUBER *et al.*, 2008).

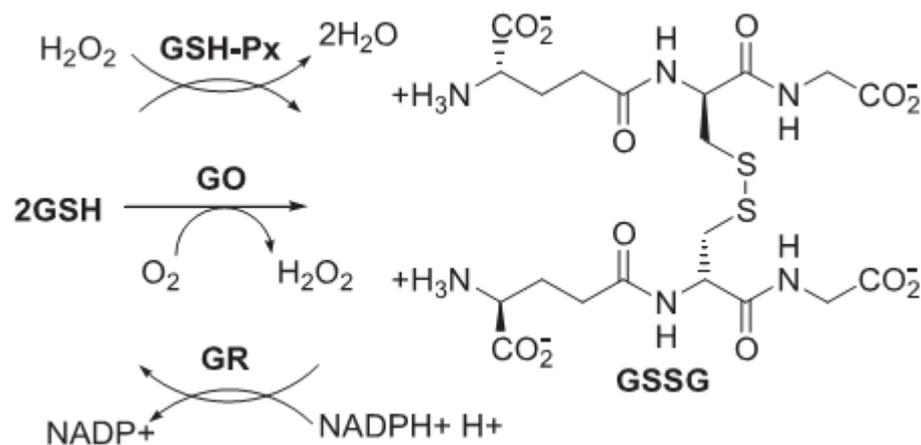


Figura 5. Representação esquemática do ciclo catalítico da glutatona. Fonte: HUBER *et al.*, 2008.

O organismo humano utiliza outras moléculas pequenas para contrapor a ação deletéria das ERON's, como a vitamina C, que se encontra na forma de ascorbato e atua na redução de metais como o Fe e Cu, e a vitamina E que doa elétrons a radicais hidroxila impedindo, portanto, a peroxidação lipídica, assim como, o  $\beta$ -caroteno que é o principal carotenóide fonte de vitamina A com ação antioxidante (BARREIROS *et al.*, 2006). Por fim, as proteínas queladoras de metais promovem o sequestro de ferro e cobre, impedindo que eles atuem como cofatores das reações de Fenton e Haber-Weiss (BIANCHI e ANTUNES, 1999; YOUNG e WOODSIDE, 2001).

### 3.3.4 Marcadores de estresse oxidativo

#### 3.3.4.1 Avaliação da capacidade antioxidante total (TAC)

Os antioxidantes presentes nas células, membranas e fluídos extracelulares podem ser recrutados e atuar de forma conjunta para contrapor o excesso de ERON's. Deste modo, a TAC é capaz de fornecer informações concisas acerca do *status* antioxidante, pois não mensura especificamente concentrações de cada antioxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Vários métodos para avaliar a TAC foram propostos e aplicados em produtos naturais e fluídos biológicos (SERAFINI *et al.*, 2004; DEL RIO *et al.*, 2005), utilizando técnicas que se fundamentam na transferência de átomos de hidrogênio (TAH) ou de elétrons (TE). Geralmente, as análises de TAH se baseiam na competição entre os antioxidantes e o substrato gerando o radical peroxila através da decomposição de composto AZO. Já as análises de TE avaliam a capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras de reduzir um composto oxidado, cuja coloração é alterada após redução de maneira proporcional à concentração dos antioxidantes (ZULUETA *et al.*, 2009).

Neste sentido, a redução do 2,2-azinobis, ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) ao radical ABTS<sup>•</sup> é uma das análises de TE mais utilizadas. Esta técnica foi empregada inicialmente para determinar o conteúdo de hemoglobina em amostras de tecidos (MARKLUND, 1979), e foi adaptada para usar o ânion radical ABTS<sup>•</sup> pré-formado como biomarcador da capacidade antioxidante não-enzimática total em diferentes matrizes biológicas. Os resultados são expressos em valores relativos ao ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), um análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E (NIKI, 2010).

#### 3.3.4.2 Peroxidação lipídica

Durante a peroxidação lipídica são gerados inúmeros aldeídos eletrofilicos, os quais forma aductos de proteínas, como o malondialdeído (MDA, C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), considerado o principal produto da peroxidação lipídica. O MDA é um dos biomarcadores mais utilizados para avaliar danos oxidativos (KOPITZ *et al.*, 2004). Dentre as técnicas utilizadas para determinar a produção de aldeídos resultantes da

peroxidação lipídica, se destaca a determinação dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico ou TBARS, introduzida por Yagi (1976) e amplamente utilizada por ser considerada simples para avaliar a peroxidação dos lipídeos. Usando condição ácida extrema e elevada temperatura, são formados aductos entre o ácido tiobarbitúrico e moléculas resultantes da peroxidação dos lipídeos, em especial o MDA, que são coloridos e mensurados por espectrofotometria (STEGHENS *et al.*, 2001). A desvantagem deste procedimento é que outros compostos reagem com o TBARS contribuindo para o aumento da absorbância (ANTUNES *et al.*, 2008).

### 3.3.5 Estresse oxidativo na malária

Vários autores relataram a participação de ERON's na fisiopatologia da malária (PABÓN *et al.*, 2003; HUBER *et al.*, 2002; DONDORP *et al.*, 2003; OMODEO-SALÉ *et al.*, 2003; BECKER *et al.*, 2004; YAZAR *et al.*, 2004; WILMANSKI *et al.*, 2005; KUMAR & BANDYOPADHYAY *et al.*, 2005; JARAMILLO *et al.*, 2005; DEY *et al.*, 2009). O balanço redox durante a fase aguda da infecção deve ser cuidadosamente interpretado, pois se por um lado as ERON's auxiliam a debelar a parasitemia, por outro, podem acarretar danos oxidativos no hospedeiro humano. De modo semelhante, os antioxidantes protegem tanto o hospedeiro humano, quanto o plasmódio dos danos oxidativos. Neste sentido, alterações no ciclo redox eritrocitário durante a infecção constituem aspecto central da resposta do hospedeiro à doença; alguns autores sugerem papel protetor, entretanto, outros apontam relação direta das ERON's com a fisiopatogenia da malária (POTTER *et al.*, 2005).

Estudos em humanos e animais de experimentação associaram o aumento da produção de ERON's às complicações sistêmicas da malária. Por exemplo, a infecção por *Plasmodium* induz a geração de radicais hidroxila (OH<sup>•</sup>) no fígado que provavelmente acarreta apoptose celular (SOHAIL *et al.*, 2007), assim como, foram evidenciados teores elevados de produtos da peroxidação de lípidios no líquido-espinhal em casos fatais de malária cerebral (JAYSHEREE *et al.*, 1992). Pino *et al.* (2003) demonstraram que a apoptose induzida pelas hemácias parasitadas nas células endoteliais das vênulas pulmonares é mediada pelo EO, assim como, se discute a participação das ERON's nos danos estruturais e funcionais às plaquetas (EREL *et al.*, 2001).

O aumento dos polimorfonucleares no edema pulmonar relacionado a doença foi associado a produção de ERON's (CLARK *et al.*, 1989). Hermsen *et al.* (1997), demonstraram que as ERON's possuem papel importante na malária cerebral em camundongos infectados por *P. berghei*. Atamna *et al.* (1993) reportaram que eritrócitos infectados com *P. falciparum* produzem radical OH<sup>•</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em concentrações aproximadamente duas vezes superiores aos normais. De fato, marcadores de EO em ratos e humanos infectados pelo plasmódio encontraram-se elevados, quando comparados a controles não parasitados (SOHAIL *et al.*, 2007), como por exemplo, altos níveis de produtos da peroxidação lipídica, como TBARS, foram demonstrados em eritrócitos parasitados por *P. falciparum*, *P. vinckei*, *P. berguei* e *P. chabaudi* (DAS e NANDA, 1999), assim como, em crianças com malária, em especial aquelas com deficiência de riboflavina (DAS *et al.*, 1990). Também foi relatado aumento da geração de ERON's nos casos não graves de malária pelo *P. vivax*. (PABÓN *et al.*, 2003). ARAÚJO *et al.*, (2008), demonstraram que níveis plasmáticos de MDA foram mais elevados nos pacientes trombocitopênicos e sugeriram que o MDA e a glutathione peroxidase são importantes marcadores dos danos oxidativos nas plaquetas de pacientes com malária por *P. vivax*.

Por outro lado, estudos apontaram a ação das ERON's em debelar a parasitemia. A incubação de *Plasmodium yoelii* na presença de glicose e glicose oxidase gerou peróxido de hidrogênio, que eliminou o plasmódio. Da mesma forma, quando incubados na presença de xantina e xantina oxidase, ocorreu a geração do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, além de outros produtos com atividade oxidante, os quais levaram a destruição dos parasitos (DOCKRELL e PLAYFAIR, 1984).

Ressalte-se que para se proteger da ação das ERON's, o parasita possui o apicoplasto que produz ácido alfa lipóico, dotado de ação antioxidante. Provavelmente tal organela foi incorporada ao parasita como adaptação evolutiva, estando presente nos simbiote como as algas vermelhas (TOLER, 2005). O sistema antioxidante do plasmódio também é composto por glutathione que é o mais abundante, vitamina B6, bem como enzimas antioxidantes como a SOD, GSH-Px, CAT e tioredoxinas (BECKER *et al.*, 2004).

As ERON's são oriundas de diversas fontes no decorrer da fase aguda da infecção, como: a partir da degradação do heme pelo parasita, objetivando

suprimento de aminoácidos para seu metabolismo; a explosão respiratória das células de defesa imune do hospedeiro vertebrado, assim como, a síndrome de isquemia e reperfusão nos casos graves da doença. Por fim, o mecanismo de ação de alguns antimaláricos, como a PQ e a artemisinina envolve, provavelmente, a formação destes compostos. Entretanto, para contrapor a ação deletéria de ERON's formadas durante a fase aguda da doença, o hospedeiro humano mobiliza antioxidantes não enzimáticos, assim como, aumenta a atividade de enzimas envolvidas no ciclo redox (POTTER *et al.*, 2005; KELLER *et al.*, 2004; SOHAIL *et al.*, 2007; BECKER *et al.*, 2004).

A hemoglobina é a principal fonte de aminoácidos para o plasmódio durante a fase eritrocítica do ciclo biológico e sua degradação no vacúolo digestivo ácido que é favorecido pela sua elevada taxa metabólica e rápido crescimento, resulta na liberação do heme livre tóxico (ferro/ferroprotoporfirina IX) (TILLEY *et al.*, 2001; BECKER *et al.*, 2004). Para impedir a ação tóxica deste composto, o parasito promove sua polimerização, levando à produção de um composto inerte, insolúvel e não tóxico, denominado hemozoína (pigmento malárico). Esta reação é considerada um dos alvos dos antimaláricos quinolínicos (PABÓN *et al.*, 2003). Assim, o *Plasmodium* pode contribuir para a formação de ERON's como o ânion radical hidroxila, via reação de Fenton, empregando como cofator o  $Fe^{+2}$ , causando danos oxidativos nos lipídios e proteínas do vacúolo digestivo (EGAN *et al.*, 2002; MÜLLER, 2004).

As hemácias parasitadas apresentam grande quantidade de derivados monohidroxi dos ácidos graxos polienólicos (OH-PUFAS) em seus ésteres de lipídios, sugerindo a ocorrência da peroxidação lipídica. Dentre os OH-PUFAS mais encontrados e descritos como tóxicos estão o 12 e o 15-hidroxi-ácido araquidônico (HETES 12,15). As concentrações de OH-PUFAS aumentam de acordo com o estágio evolutivo do parasita. No entanto baixos teores foram encontrados após fagocitose das hemácias parasitadas, sugerindo que outros produtos da peroxidação lipídica desempenham papel chave neste processo (SCHWARZER *et al.*, 2003).

Montia *et al.* (2002) cultivaram parasitos em ambiente com 2% de monóxido de carbono (CO), cuja afinidade é 240 vezes superior a hemoglobina quando comparado ao oxigênio. O parasito cresceu normalmente, entretanto, a hemozoína não foi formada e conseqüentemente não houve acúmulo de FP, indicando que o plasmódio não necessitou de cadeia de transportes de elétrons funcional. É provável

que a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) tenha sido reduzida, pois após a degradação da globina, a FP-Fe II, íon ferro não foi oxidado, permanecendo em grande parte na forma reduzida.

Outra fonte de ERO's é a ativação da resposta imune do hospedeiro resultante da infecção dos plasmódios com envolvimento de fagócitos (macrófagos ativados e neutrófilos) (BECKER *et al.*, 2004) que geram elevada quantidade de radicais livres durante a explosão respiratória, ocasionando desequilíbrio entre formação de espécies oxidantes e quantidade de antioxidantes, levando ao EO, que é considerado importante mecanismo de resposta do hospedeiro humano às infecções microbianas (BRINKMANN *et al.*, 1984). Soma-se na fase aguda da infecção, o aumento da atividade de monócitos e macrófagos circulantes resultante da ruptura dos eritrócitos e liberação da hemozoína na circulação sanguínea (KELLER *et al.*, 2004). Adicionalmente, a hemozoína promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tal como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e citocinas anti-inflamatórias (IL-10), que de acordo com Wilmanski *et al.* (2005) apresentam papel importante na geração de ERO's.

A síndrome de isquemia e reperfusão também foi associada a geração de ERO's em pacientes com malária *falciparum*, especialmente nas formas graves, representando a principal causa de danos neurológicos na malária cerebral (SERIROM *et al.*, 2003). Os eritrócitos infectados por trofozoítos maduros e esquizontes de *P. falciparum* são sequestrados pelos capilares de vários órgãos o que impede sua remoção pelo baço. A aderência destas células ao endotélio vascular (fenômeno de citoaderência), ocasiona hipóxia e recrutamento de citocinas pró-inflamatórias, levando a formação de ERO's (SERIROM *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2004). Objetivando manter o tônus vascular, o óxido nítrico (NO) é gerado pelas células endoteliais, promovendo a homeostase vascular por regular a agregação plaquetária e adesão ao endotélio, restringindo a extensão do processo inflamatório (SERIROM *et al.*, 2003). Adicionalmente, as alterações oxidativas nos eritrócitos infectados pelo *P. falciparum* parecem estar associadas ao envelhecimento acelerado destas células, contribuindo para a anemia nestes indivíduos (OMODEO-SALÉ *et al.*, 2003), alterando a fisiologia circulatória, levando a momentos alternados de hipóxia com manutenção da oxigenação tecidual em níveis basais, o que colabora para síndrome de isquemia e reperfusão (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Alguns antimaláricos contribuem para geração de ERON's, uma vez que o mecanismo de ação envolve a participação de espécies radicalares. De fato, a ação dos antimaláricos se baseia na sensibilidade do plasmódio as ERON's, bem como, na interferência ou inibição de alguma via de síntese metabólica de uma molécula essencial para o parasito (GRAHAME-SMITH e ARONSON, 2004).

Neste sentido, os metabólitos da PQ oxidam, de maneira dose dependente, a hemoglobina. De acordo com Ganesan *et al.* (2009), a intensidade e a duração da ação da PQ são controladas por enzimas do CYP-450 envolvidas na ativação de espécies intermediárias do fármaco. Acredita-se que o mecanismo de ação seja mediado por metabólitos redox-ativos, como a 5-hidroxiprimaquina (5-HPQ), a qual foi associada aos efeitos terapêutico e tóxico, a exemplo, a hemólise em eritrócitos com teores normais de GSH foi relatada após aumento das concentrações de 5-HPQ, que forma um par redox com suas formas quinolinas, cujo ciclo contínuo de oxi-redução produz ERON's e aumenta o consumo de GSH (SHANKS *et al.*, 2001).

Outro efeito adverso reportado é a metemoglobinemia, resultante da oxidação do ferro da hemoglobina (Figura 11) a  $Fe^{+3}$  que não transporta oxigênio aos tecidos (CAMARGO *et al.*, 2007). Os eritrócitos mantêm taxa normal de metemoglobina (1-2%) por mecanismos redutores fisiológicos representado por enzimas como: NADH-diaforase, glicose-6-fosfato desidrogenase e metemoglobina redutase (CAMARGO *et al.*, 2007).

A metemoglobinemia pode ser congênita ou adquirida. A primeira se manifesta sob duas formas distintas, a saber: tipo I, na qual há deficiência do gene responsável pela expressão da NADH citocromo b5 redutase (NADHb5R) apenas nos eritrócitos e tipo II, na qual a deficiência desta enzima se distribui por vários tecidos. Já a forma adquirida resulta da exposição a agentes oxidantes como quinolinas (PQ), nitritos, cloratos, fenacetina, acetanilida, sulfanilamida, nitrobenzeno, anilina, nitratos, nitritos e óxido nítrico (FERREIRA *et al.*, 2011). Portanto, pacientes tratados com fármacos oxidantes, como PQ, apresentam teores aumentados de metemoglobina (CARMONA-FONSECA *et al.*, 2009). Ressalta-se que os teores de metemoglobina tem sido usados como indicadores do estado oxidativo no interior dos eritrócitos.

Para contrapor a ação deléteria das ERON's, o organismo humano mobiliza compostos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, e em conseqüência, os níveis de GSH, tocoferol, dentre outros, podem estar reduzidos nos pacientes com

malária (DAS e NANDA, 1999). Erel *et al.* (1997) ao investigarem níveis plasmáticos e eritrocitários de marcadores de EO e das defesas antioxidantes em 50 pacientes com malária por *P. vivax* e 50 voluntários saudáveis, demonstraram aumento dos marcadores de EO e redução das defesas antioxidantes nos pacientes com *P. vivax*. Corroborando este estudo, Pabón *et al.*, (2003), compararam marcadores da peroxidação lipídica, como o MDA, e a capacidade antioxidante total (TAS) entre pacientes com malária não-complicada e indivíduos saudáveis. O EO foi estimado pela relação MDA/TAS. O valor foi 3,5 vezes superior nos pacientes com malária quando comparado ao grupo controle.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de estudo, casuística e seleção da amostra**

Trata-se de um estudo de casos constituído por 38 pacientes, com idade superior a 18 anos, ambos os gêneros, portadores de malária por *P. vivax*, com confirmação laboratorial pelo exame da gota espessa. O grupo controle foi composto por 19 voluntários saudáveis pareados em proporção por sexo e idade, que foram selecionados no Curso de Farmácia da Universidade Federal do Pará. O protocolo seguiu recomendação da OMS para avaliação da eficácia terapêutica de portadores de malária por *P. vivax*. Foram realizadas avaliações clínicas e laboratoriais antes da instituição da terapia (D0), durante o segundo e sétimo dia de tratamento (D2 e D7) e após tratamento, quatorze (D14) e vinte e oito dias (D28).

### **4.2 Local da pesquisa e coleta de dados**

Foram selecionados pacientes que procuram por demanda espontânea o Ambulatório/Laboratório do Programa de Ensaio Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas (PECEM/IEC) localizado no município de Ananindeua, Pará. Nesta Unidade de Saúde são atendidos pacientes provenientes da região metropolitana de Belém e entorno. As análises laboratoriais foram realizadas no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará.

### **4.3 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos pacientes com diagnóstico positivo pelo exame da gota espessa para *P. vivax*, os quais foram tratados com o esquema terapêutico preconizado pelo MS (BRASIL, MS 2009), constituído pela associação CQ (150mg/comprimido- 1,5g em três dias de tratamento) e PQ (30mg/Kg ao dia durante sete dias). Os pacientes foram convidados a participar do referido estudo, ao concordarem, estes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento

(TCLE; Anexo A), bem como responderam ao questionário padrão aplicado pelo PECEM/IEC (Anexo B).

Foram excluídos pacientes que apresentarem síndrome febril que não seja oriunda da malária, aqueles que fizeram uso de antimaláricos ou antibióticos em até quatro semanas anteriores, que apresentaram evolução clínica desfavorável, malária mista, comorbidades, tabagistas, alcoolistas, usuários de drogas de abuso ou de suplementos antioxidantes ou vitaminas, anticoncepcional, grávidas e aqueles que não concordaram em assinar o TCLE ou não responderam ao questionário.

#### **4.4 Dados demográficos e epidemiológicos**

Foram anotados os seguintes dados demográficos e epidemiológicos: gênero, idade, local de residência (rural/urbano), histórico de malária durante a vida (sim/não), se positivo, relatou-se o número de episódios de malária, a parasitemia, as manifestações clínicas, a severidade os sinais e sintomas e o tempo decorrido entre a sintomatologia inicial e o diagnóstico e início do tratamento (Anexo B).

#### **4.5 Amostras**

Foram coletadas de cada paciente com malária por *P. vivax* amostras de sangue por punção venosa periférica em volume de 15mL antes da introdução dos antimaláricos (D0), durante tratamento: D2, após 1º dia de tratamento, D7, após 6º dia de tratamento e após tratamento, quatorze (D14) dias. Utilizados dois tubos (5 mL cada) tipo *Vacutainer*® devidamente identificados, um contendo EDTA como anticoagulante, e outro, para obtenção do soro. Cerca de 2 mL de cada tubo foram separados por centrifugação para obtenção do plasma ou de soro, a 2.000 rpm/10 min/28-30°C. A seguir, os eritrócitos foram lavados com solução salina a 0,85% por três vezes e centrifugados a 2.000 rpm/5min/20°C. O sangue total, assim como as frações, foram imediatamente refrigeradas a 4°C e transportadas ao Laboratório de Toxicologia (LATOX – UFPA), onde foram analisadas.

No sangue total (tubo com EDTA) foram determinados os parâmetros hematológicos (leucócitos, plaquetas, hemácias, hemoglobina e hematócritos) através do sistema automatizado pelo aparelho *PENTRA 120*®, fabricado pelo *ABX Diagnostics*. Parte do soro (5mL) foi utilizado para realização das provas

bioquímicas como: glicemia, bilirrubina total e frações, colesterol total e frações, ácido úrico e triglicerídeos em sistemas automatizados, fabricado pelo *DADE Behring*. Tanto os exames hematológicos, quanto os bioquímicos, foram processados no Laboratório de Análises Clínicas do IEC, seguindo recomendação de uso pelo fabricante dos equipamentos. No grupo controle foi coletada apenas uma amostra de sangue e seguido os mesmos procedimentos dos pacientes com malária por *P. vivax*.

A metemoglobinemia e os teores de PQ e CPQ foram determinados no sangue total. A glutatona reduzida nos eritrócitos lavados. A capacidade antioxidante total (TAC) e os níveis de compostos reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBAR) foram determinados no plasma.

O tempo decorrido entre a coleta das amostras e determinação de PQ e CPQ foi inferior a 30 dias e as análises hematológicas e bioquímicas, a metemoglobinemia e os marcadores de EO foram analisados imediatamente após coleta do material biológico.

## **4.6 Procedimentos laboratoriais**

### **4.6.1 Determinação da parasitemia inicial**

As lâminas para diagnóstico e contagem dos parasitas foram coletadas por punção da polpa digital do dedo indicador, previamente higienizado com álcool iodado, com lancetas descartáveis. A seguir, aplicadas em lâminas de vidro para confecção da gota espessa nos diversos dias de estudo. A gota espessa foi corada pelo GIEMSA, segundo a técnica de Walker e, examinada em microscópio ótico (OPAS, 2004).

A parasitemia foi determinada pela contagem de parasitos assexuados em 100 campos microscópicos (correspondente a 0,2 mm<sup>3</sup> de sangue), sendo o valor obtido multiplicado pela constante 5 e o resultado expresso em parasitos/mm<sup>3</sup> de sangue. Foi considerada negativa quando, ao examinar no mínimo 200 campos da gota, não se visualizaram formas assexuadas do *P. vivax*.

A parasitemia foi classificada em: baixa, até 15.000 parasitos por mm<sup>3</sup> de sangue; média, de 15.001 a 60.000 parasitos por mm<sup>3</sup> de sangue; e alta com resultado igual ou superior a 60.001 parasitos por mm<sup>3</sup> de sangue (ALECRIM, 1981).

O tempo de clareamento da parasitemia (TCP) dos pacientes nas lâminas de gota espessa foi verificada a cada 24 horas nos dias de seguimento dos pacientes e expresso em horas.

#### **4.6.2** Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da estimativa das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As lipoproteínas foram precipitadas nas amostras pela adição do ácido tricloroacético (ATC) a 10% e 0,67% de ácido tiobarbitúrico (ATB) em seguida 2 M de sulfato de sódio foram adicionados ao precipitado. A união do peróxido lipídico com ATB foi realizada pelo aquecimento em banho-maria a 90°C por 60 minutos. Os cromógenos formados foram extraídos em n-butanol, os quais foram lidos a 535 nm (Figura 6). As absorbâncias obtidas foram plotadas em uma curva de calibração previamente elaborada, contendo concentrações conhecidas de tetraetoxipropano (MDA), as quais foram processadas de modo semelhante às amostras biológicas. A seguir, foram obtidos o coeficiente de correlação e a equação da reta através do método dos mínimos quadrados. A peroxidação lipídica foi expressa em nMols de MDA/L de plasma (DOTAN *et al.*, 2004; ISAKSSON *et al.*, 2009). As análises das amostras foram realizadas em triplicata.

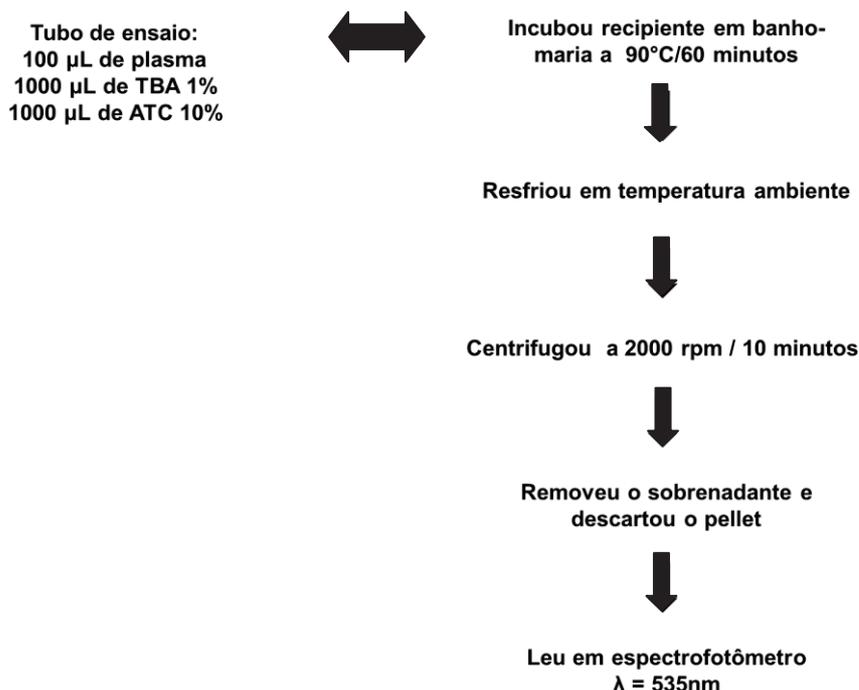


Figura 6. Procedimento para determinação do TBARS.

#### 4.6.3 Determinação da capacidade antioxidante não enzimática total (TAC)

A capacidade antioxidante não enzimática total foi determinada segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico; Aldrich Chemical Co 23881-3), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Seguindo-se o método proposto por Miller *et al.* (1993), modificado por Re *et al.*, (1999), em condições adaptadas de temperatura, proporções relativas dos reagentes e tempo de mensuração. Trata-se de uma técnica colorimétrica, baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), produzindo diretamente o radical cátion ABTS<sup>•+</sup>, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815 nm (MILLER *et al.*, 1993; RE *et al.*, 1999).

A adição de antioxidantes ao radical ABTS<sup>•+</sup> pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo, dependente da capacidade antioxidante, concentração e duração da reação. A mudança da coloração em detrermindao intervalo de tempo é mensurada por espectrofotometria a 734 nm. Assim, a extensão da descoloração é proporcional a redução do radical cátion ABTS<sup>•+</sup>. As

absorbâncias foram plotadas em curva de calibração previamente elaborada contendo concentrações conhecidas de trolox, e a seguir, obtidos o coeficiente de correlação e a equação da reta. A atividade antioxidante total da amostra (TAC) foi expressa em micromoles por litro ( $\mu\text{M/L}$ ) em relação ao trolox.

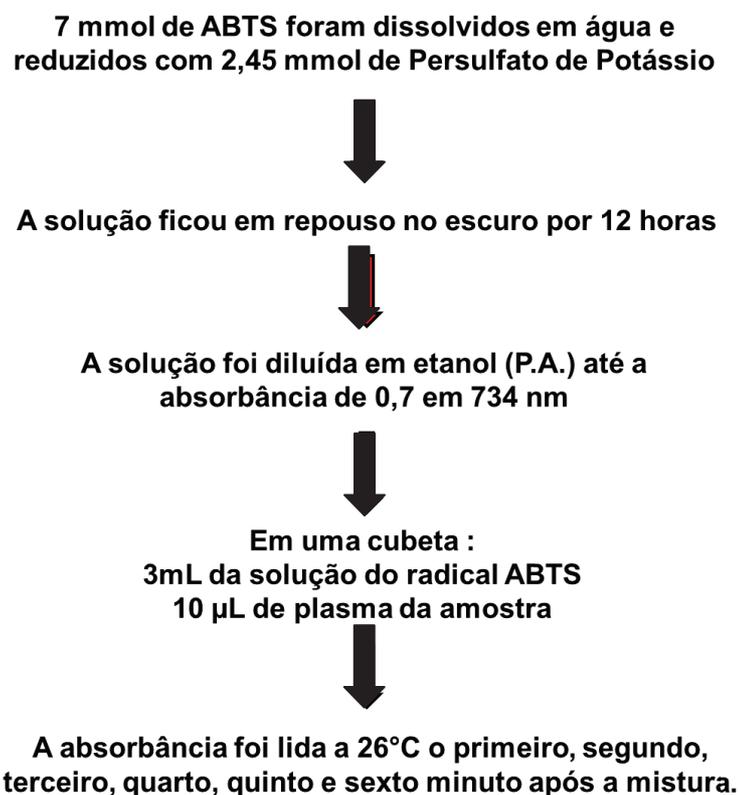


Figura 7. Procedimento para determinação da TAC.

#### 4.6.4 Índice de estresse oxidativo (EO)

O EO foi considerado como a razão entre o TBARS e TAC (COHEN e MCGRAW, 2009). Esta razão foi aferida pela resposta antioxidante do organismo a produção de agentes pró-oxidantes, no qual os maiores valores correspondem a níveis elevados de EO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

#### 4.6.5 Determinação de glutathiona reduzida (GSH)

A técnica utilizada fundamenta-se na capacidade da GSH em reduzir o ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para ácido nitrobenzóico (TNB), cuja absorbância máxima por espectrofotometria é 412 nm (Figura 13). As absorbâncias

foram plotadas em curva de calibração previamente elaborada, contendo concentrações conhecidas de glutathiona, e a seguir, obtidos o coeficiente de correlação e a equação da reta (ANDERSON, 1969).

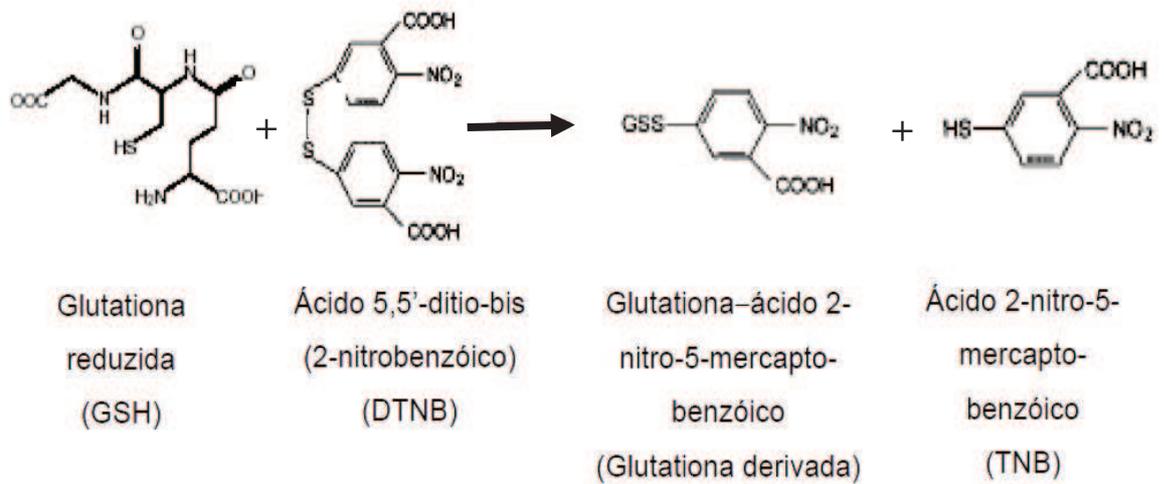


Figura 8. Reação de derivação da GSH com o DTNB. Fonte: ROVER JUNIOR *et al.*, 2001.

#### 4.6.6 Determinação dos teores de metemoglobina

Para determinação de metemoglobina foi utilizada a metodologia proposta por Hegesh *et al.* (1970) (figura 9), baseada na leitura da absorvância diferencial a 632nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de metemoglobina em relação a porcentagem total de hemoglobina da amostra. As análises foram realizadas em triplicata.

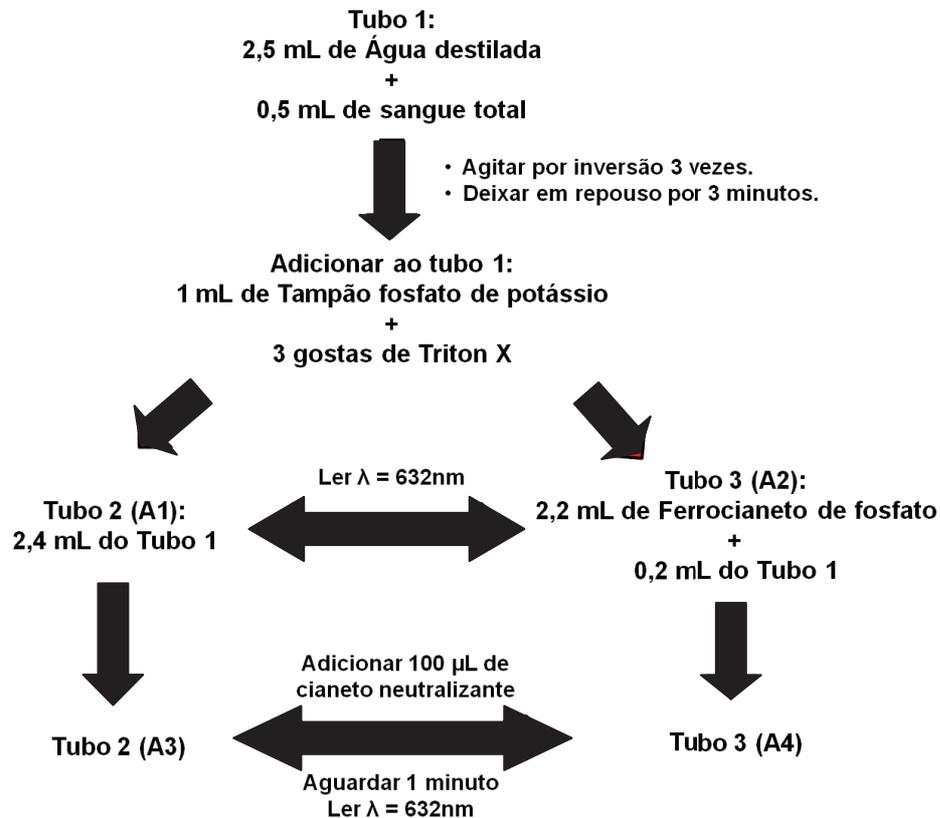


Figura 9. Procedimento para determinação de metemoglobina.

Para o cálculo do percentual de metemoglobina nas amostras foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ MeHb} = \frac{(A1 - A3)}{12 \times (A2 - A4)} \times 100$$

Onde: 12 = Fator de Diluição

A1 – A3 = Porcentagem de metemoglobina na amostra;

A2 – A4 = 100% de metemoglobina

#### 4.7 Determinação de primaquina e carboxiprimaquina

As concentrações sanguíneas de PQ e CPQ foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, com detecção no ultravioleta. Foram utilizados procedimentos previamente validados no laboratório de Toxicologia da UFPA seguindo procedimento de Dua et. al., (1996), com pequenas modificações. O cromatógrafo líquido de alta eficiência (VARIAN, USA) foi composto por uma bomba isocrática (PROSTART 300), injetor manual rheodyne (Modelo 772i),

com loop de 50 $\mu$ L, coluna de fase reversa (X-Terra): RP-8, 15cm, 5 $\mu$ m e 4,6 mm de diâmetro interno (Waters, Saint Quentin-en-Yvelines, France); pré-coluna: 2.1x 10mm; detector duplo canal ultravioleta (Modelo 320) e visível (PROSTAR 220), com detecção em comprimento de onda de 254nm. A fase móvel foi composta por uma mistura isocrática de acetonitrila a 30% em solução aquosa de tretilamina 0,01M com pH de 3.5 ajustado com solução de ácido fosfórico a 50%. O fluxo foi 1 mL/min.

#### 4.7.1 Procedimento de extração da primaquina

A extração de PQ procedeu-se conforme procedimentos propostos por Dua *et al.* (1996) e Ferreira (2010) com modificações na quantidade de sangue total, composição do líquido extrator, padrão interno e na solução de alcalinização. Adicionou-se em um microtubo alíquota de 100  $\mu$ L da amostra de sangue total, 100  $\mu$ L de padrão interno (quinidina em concentração de 2 $\mu$ g/mL) e 100  $\mu$ L de hidróxido de sódio 2M. Seguido de agitação em vortex por 30 segundos. A seguir, foi adicionado 1mL de éter metil terc butílico e procedeu-se a homogeneização em agitador mecânico por 20 min e posterior centrifugação a 2000 rpm por 10 min. A fase orgânica foi separada e transferida para outro microtubo de polietileno, e posteriormente evaporada à temperatura de 60°C por 20 min. O resíduo foi recomposto com 100  $\mu$ L da fase móvel, e agitado por 30 segundos no vórtex e aplicado, em volume de 50  $\mu$ L, no cromatógrafo líquido (Figura 10).

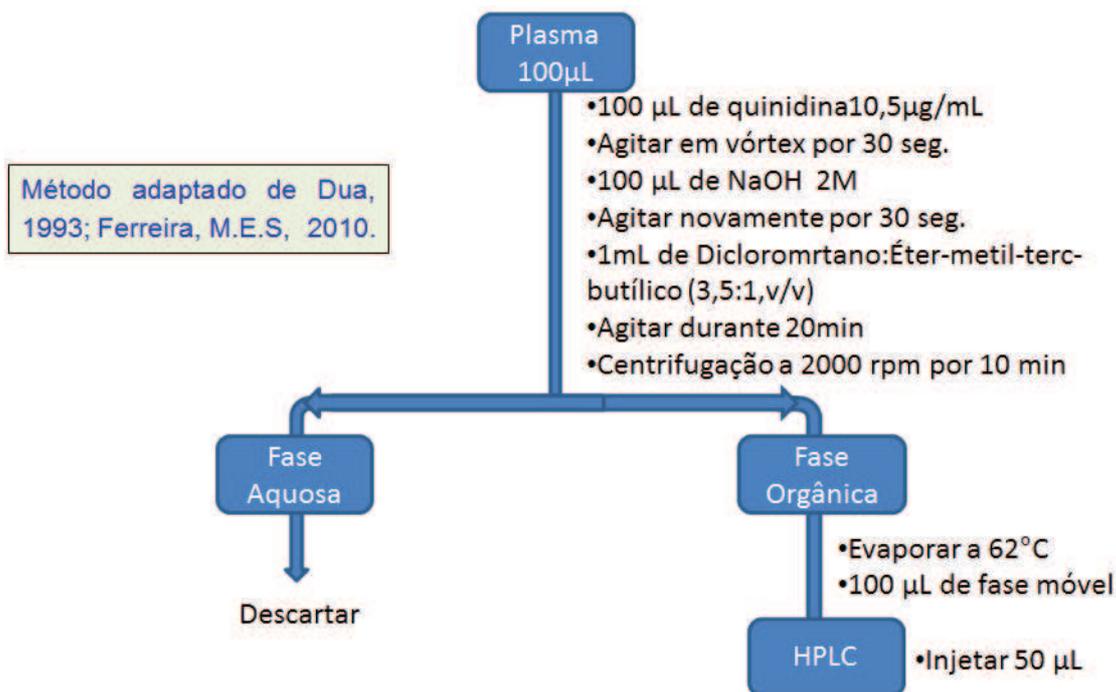


Figura 10. Procedimento de extração da Primaquina. Método adaptado de Dua (1996); Ferreira, M. E. S., 2010.

#### 4.8 Análise dos dados

Os resultados quantitativos e qualitativos obtidos durante o estudo foram armazenados em planilhas eletrônicas utilizando os programas EXCEL® e INSTANT®, e analisados usando o software BioEstat® 5.0, estabelecendo em 0,05 (5%) o nível para rejeição da hipótese de nulidade. De acordo com o nível de mensuração das variáveis foram empregados testes não paramétricos (qui-quadrado e/ou exato de Fisher) e paramétricos (ANOVA, teste t de *student*, teste t pareado). Para as correlações foram utilizados os coeficientes de correlação de Pearson (r) e Spearman.

#### 4.9 Parecer da comissão de ética

O estudo está vinculado ao projeto “Malária por *Plasmodium vivax*: análise da possível influência da composição corporal na resposta terapêutica à primaquina”, o qual foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas, sendo aprovado sob o número 0028/2010. Todos os

participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nenhum incentivo financeiro foi oferecido aos pacientes (Anexo B).

## 5 RESULTADOS

Foram incluídos 38 pacientes com diagnóstico positivo para *P. vivax* pelo exame da gota espessa. A parasitemia média à admissão foi considerada baixa, e nenhum paciente apresentou agravamento da condição clínica. O sexo masculino prevaleceu na casuística ( $X=16,81$ ;  $p<0,0001$ ). Após período de seguimento clínico laboratorial da infecção pelo *P. vivax* recomendado pela OMS de 28 dias foi observada recorrência parasitária em nove pacientes (23,7%). As características dos pacientes incluídos no estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil Bio-social dos pacientes incluídos no estudo.

Variável	Dados ( $\pm$ )
N	38
Parasitemia no D0, $\text{mm}^3$	3.755 (3.49)
Tempo de Clareamento da Parasitemia, horas	48
Idade, anos	35(10)
Masculino, %	71*
Primoinfectados, %	50
Recorrência, %	23,7**

Teste do qui-quadrado (\* $X=16,81$ ;  $p<0,0001$  \*\* $X=27,04$ ;  $p<0,0001$ )

Na figura 11 esta apresentado o relato de episódios prévios de malária dos pacientes incluídos no estudo. Depois dos primoinfectados, prevaleceu o relato de mais de cinco episódios da doença ( $X^2= 21,23$ ;  $p=0,0023$ ).

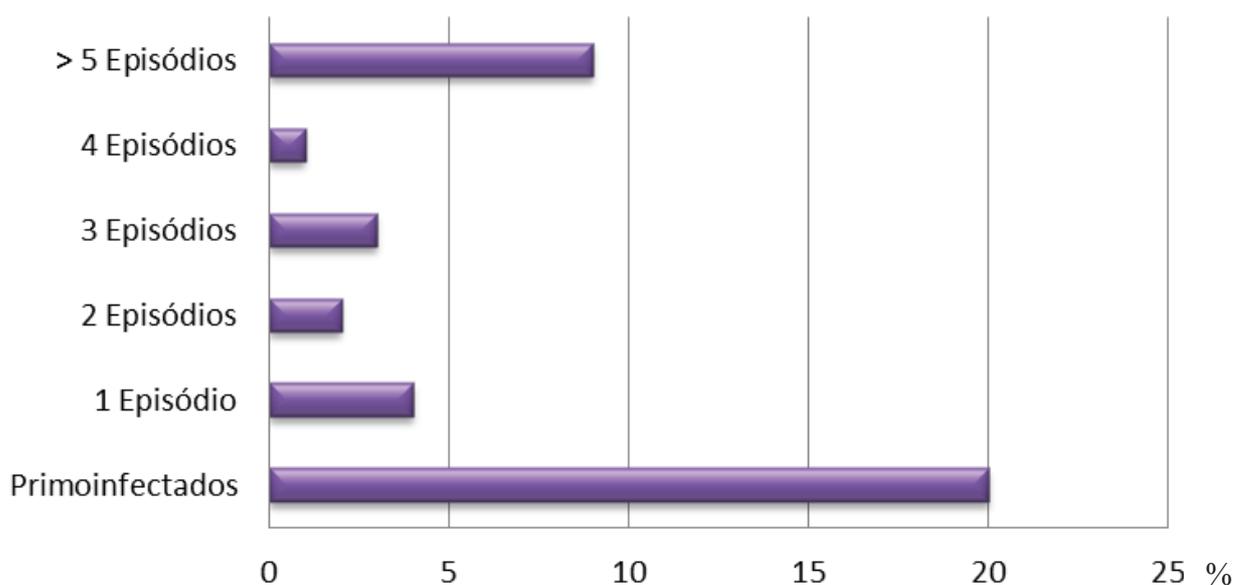


Figura 11. Distribuição dos pacientes quanto ao número de episódios de malária.

Os parâmetros hematológicos dos pacientes na inclusão no estudo, em diferentes dias, estão apresentados na Tabela 2. A Análise de variância não apontou diferença significativa nos índices hematimétricos no decorrer do estudo, apesar de discreta plaquetopenia. Em relação aos monócitos estavam aumentados significativamente no decorrer do tratamento ( $F=1,1821$ ,  $p=0,0021$ ).

Tabela 2. Parâmetros hematológicos dos pacientes incluídos no estudo.

Parâmetro	N	D0 (±)	D2 (±)	D7 (±)	D14 (±)
<b>Hematócrito, %</b>	38	37.4 (5.45)	34.8 (5.2)	36.6 (5.5)	37.65 (4.7)
<b>Hemoglobina, g/dL</b>	38	12.6 (1.9)	12 (1.7)	11.9 (2.8)	12.52 (1.7)
<b>Hemácias, milhões/mm<sup>3</sup></b>	38	4.5 (0.7)	4.2 (0.7)	4.4 (0.7)	4.46 (0.6)
<b>VCM fL</b>	38	83.1 (3.9)	81.4 (10.7)	82.7 (9.1)	84.8 (5)
<b>HCM pg</b>	38	27.9 (1.4)	27.9 (1.5)	27.9 (1.5)	28.18 (1.9)
<b>CHCM g/dL</b>	38	33.7 (0.6)	33.6 (1.1)	33.2 (1.3)	33.23 (0.9)
<b>Plaquetas mil/ mm<sup>3</sup></b>	38	101.9 (43)	109.9 (59.9)	132.1 (135)	140.04 (±86.8)
<b>Leucócitos mm<sup>3</sup></b>	38	5347.7 (1574.3)	4448.7 (1016.1)	5532.4 (1344)	4820.9 (1149.4)
<b>Basófilo mm<sup>3</sup></b>	38	40.3 (2.84)	51.6 (16.8)	47.1 (15.8)	44.7 (14.7)
<b>Eosinófilos mm<sup>3</sup></b>	38	125.3 (74.4)	151.43 (91.78)	317.3 (168.6)	270.3 (139.1)
<b>Segmentados mm<sup>3</sup></b>	38	2887.6 (950.7)	2085.8 (692.6)	3236.8 (1258.4)	2383.8 (847.2)
<b>Linfócitos mm<sup>3</sup></b>	38	1603.7 (563.6)	1696.1 (442.1)	1896.5 (664.8)	1808.9 (505.3)
<b>Monócitos mm<sup>3</sup></b>	38	576.2 (212.9)	515.8 (230.6)	444.1 (165.9)	400.9 (116.5)

Os parâmetros bioquímicos no decorrer do experimento estão apresentados na Tabela 3. As taxas de glicose e de ácido úrico mantiveram-se semelhantes no decorrer do estudo. Entretanto, a análise de variância indicou redução significativa do colesterol total em D2 ( $F=2,1914$ ,  $p=0,001$ ), assim como, da fração de HDL em D0 e D2 ( $F=1,1321$ ,  $p<0,0001$ ). Por outro lado, foi observado aumento significativo dos teores de triglicerídeos em D2 ( $F=4,2134$ ,  $p=0,0013$ ).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos dos pacientes incluídos no estudo em diferentes dias.

Parâmetro	N (±)	D0 (±)	D2 (±)	D7 (±)	D14 (±)
<b>Glicose (mg/dL)</b>	38	100.3 (26.4)	97.7 (13.6)	82.8 (7.1)	83.6 (9.5)
<b>Colesterol Total (mg/dL)</b>	38	106.8 (27.01)	93.7 (20.4)	141.4 (32.5)	149.5 (23.4)
<b>HDL (mg/dL)</b>	38	9.3 (9.8)	5.4 (3.5)	23.9 (11.9)	34 (7.8)
<b>LDL (mg/dL)</b>	38	57.2 (26.6)	66.9 (41.3)	79.4 (16.7)	81.3 (18.1)
<b>VLDL (mg/dL)</b>	38	39 (20.1)	45.7 (13.9)	28.4 (12.5)	24.1 (11.4)
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	38	202.7 (95.5)	267.9 (122.1)	116.5 (50.1)	123.9 (36.4)
<b>Ác. Úrico (mg/dL)</b>	38	4.5 (1.3)	4.5 (1.2)	5.01 (1.4)	4.9 (1.3)

Os teores de metemoglobina estão apresentados na Tabela 4. A análise da variância indicou diferença estatística significativa entre os diversos dias de estudo ( $F= 11,14$ ;  $p<0,001$ ). O emprego de teste *a posteriori* (Tukey) apontou que os teores de metemoglobina após uso de PQ em D7 e D14 foram significativamente superiores a D0 ( $p<0,001$ ). Assim como, os valores em D7 foram significativamente superiores a D2 e D14 ( $P<0,001$ ). Por outro lado, o emprego do teste t de *student*

não indicou diferença significativa dos níveis de metemoglobina entre o grupo controle e D0 ( $T= 0.40$ ;  $p = 0,343$ ).

Tabela 4. Valores médios de metemoglobina em pacientes com malária por *P. vivax* e grupo controle durante o período de estudo (D0, D2, D7 e D14).

<b>Dias de estudo</b>	<b>n</b>	<b>MetHb (% Hb/mg amostra) X±d.p.</b>
<b>D0</b>	38	1,48(1,6)
<b>D2</b>	38	2,46(2,3)
<b>D7</b>	38	4.92(2,7)
<b>D14</b>	38	2,89(2,0)
<b>Grupo controle</b>	19	1,02(0,4)

n= número de pacientes

### 5.1 Biomarcadores de estresse oxidativo

Os valores médios das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) empregados para estimar a peroxidação lipídica estão apresentados na Tabela 5. A análise de variância não indicou diferença estatística significativa dos níveis de TBARS entre os diferentes dias de estudo ( $F= 1,916$ ;  $p = 0,137$ ). Entretanto, os níveis de TBARS foram significativamente superiores em D0, quando comparado ao grupo controle ( $t=0,795$ ;  $p<0,001$ ).

Tabela 5. Níveis médios das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em pacientes com malária por *P. vivax* e no grupo controle.

<b>Dias de estudo</b>	<b>n</b>	<b>TBARS nmol MDA/L de plasma X± d.p.</b>
<b>D0</b>	38	1,63(0,7)
<b>D2</b>	38	1,68(0,7)
<b>D7</b>	38	1,23(0,4)
<b>D14</b>	38	1,21(0,66)
<b>Grupo controle</b>	19	0,8(1,3)

n= número de pacientes

Já os valores médios da capacidade antioxidante não enzimática em relação ao Trolox (TAC) estão apresentados na Tabela 6. A análise de variância dos teores de TAC nos diferentes dias de estudo não demonstrou diferença estatística significativa ( $F= 0,353$ ;  $p=0,787$ ). Resultados semelhantes foram obtidos quando os níveis médios de TAC foram comparados entre D0 e o grupo controle ( $t=2,1732$ ,  $p=0.78$ ).

Tabela 6. Valores médios da capacidade antioxidante não enzimática total em relação ao Trolox em pacientes com malária vivax e no grupo controle.

<b>Dias de estudo</b>	<b>n</b>	<b>TAC (mmol/L de plasma)* X±d.p.</b>
<b>D0</b>	38	3,4(1,6)
<b>D2</b>	38	3,9(1,1)
<b>D7</b>	38	3,5(1,7)
<b>D14</b>	38	3,5(1,6)
<b>Grupo controle</b>	19	3,9(1,3)

n= número de pacientes

\*Resultados expressos como capacidade equivalente ao TROLOX em nmol/L.

Para determinar o EO foram calculadas as razões entre TBARS e TAC nos diferentes dias de estudo, as quais foram comparadas entre si e a seguir o D0 ao grupo controle. A análise de variância não indicou diferença significativa entre as médias de EO nos diferentes dias de estudo, apesar da diminuição crescente deste valor com a recuperação do paciente ( $F=12,18$ ,  $p=0,121$ ). Resultados semelhantes foram obtidos quando a média de EO em D0 foi comparada ao grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7. Valores médios do índice de estresse oxidativo nos diferentes dias de estudo em pacientes com malária por *P. vivax*

<b>Dias de estudo</b>	<b>N</b>	<b>Índice de Estresse Oxidativo X± d.p.</b>
<b>D0</b>	38	0,48 (0,2)
<b>D2</b>	38	0,44 (0,2)
<b>D7</b>	38	0,35 (0,3)
<b>D14</b>	38	0,33 (0,4)
<b>Grupo Controle</b>	19	0,20(0,10)

n= número de determinações

Avaliou-se os níveis de GSH no eritrócito, a fim de estimar o consumo deste composto na defesa antioxidante eritrocitária. A análise da variância dos teores de GSH nos diversos dias de experimento indicou diminuição significativa dos teores de GSH no decorrer do estudo ( $F=5,335$ ;  $p=0,007$ ). O emprego de teste *a posteriori* de Tukey indicou que os níveis de GSH foram significativamente inferiores em D0 ( $p<0,001$ ), D2 ( $p<0,001$ ) e D7 ( $p<0,001$ ), quando comparados a D14. De forma semelhante, as concentrações de GSH foram significativamente superiores no grupo controle, quando comparadas a D0 (Tabela 8) ( $t= -3,047$ ;  $p=0,004$ ).

Tabela 8. Teores médios de glutathiona reduzida dos pacientes com malária por *P. vivax* e grupo controle.

<b>Dias de estudo</b>	<b>N</b>	<b>GSH (<math>\mu\text{mol/mL}</math> de eritrócito) <b>X<math>\pm</math>D.P.</b></b>
<b>D0</b>	38	2,03(1,4)
<b>D2</b>	38	1,88(1,6)
<b>D7</b>	38	1,21(0,9)
<b>D14</b>	38	3,5(0,9)
<b>Grupo Controle</b>	19	3,42(1,3)

n= número de determinações

Dada a degradação da hemoglobina na fase do ciclo eritrocitário do *P. vivax* associou-se a média geométrica da parasitemia em D0 e os níveis de GSH. Entretanto, a correlação não foi significativa ( $p = 0.7619$ ,  $r = -0,045$ ). Achado semelhante foi observado para a associação entre a parasitemia em D0 e as concentrações de TBARS ( $p=0,5042$ ,  $r=-0,024$ ).

As concentrações plasmáticas de PQ e seu principal metabólito carboxilado, após doses de 0,5mg/Kg ao dia durante sete dias, estão apresentadas na Tabela 9. Dada a reduzida meia vida biológica do fármaco somente foram determinadas as concentrações até D7. As amostras coletadas antes da introdução dos antimaláricos não apresentaram níveis detectáveis do fármaco e do metabólito. As concentrações de PQ foram semelhantes nos diferentes dias de estudo, entretanto os níveis de CPQ foram significativamente superiores em D7, quando comparados a D3 ( $t= 7.898$ ;  $p=0.0283$ ). A média da relação entre as concentrações de PQ e CPQ em D3 foi significativamente superior a D7 ( $t=5.9840$ ;  $p=0,0159$ ).

Tabela 9. Concentrações Médias de Primaquina e Carboxiprimaquina, e as respectivas relações, em diferentes dias de estudos em pacientes com *P. vivax* tratados com dose total de 3,5mg/mg de Primaquina por 7 dias.

Dia	n	PQ (ng/mL)	CPQ (ng/mL)	Relação PQ/CPQ
		X±d.p.	X±d.p.	X±d.p.
D0	38	Nd	Nd	nd
D3	38	144(121)	84.5(60)	2.2(1.2)
D7	38	112(74)	219(133)	0.37(0.8)

X±d.p. (média e desvio padrão)

As concentrações de PQ e CPQ foram associadas a metemoglobinemia e ao TBARS em D3 e D7. Na tabela 10 estão apresentados os coeficientes de correlações entre as variáveis analisadas.

Tabela 10. Correlação entre as concentrações de primaquina e carboxiprimaquina com metemoglobina e TBARS

VARIÁVEL	n	PQ		CPQ	
		D3	D7	D3	D7
Metemoglobina	38	-0,3912	-0,0984	0,324	0,0214
TBARS	38	-0,258	-0,192	0,0132	0,314

\*Coeficiente de correlação de Pearson

## 6 DISCUSSÃO

Considerando os relatos acerca das alterações do equilíbrio redox durante a malária, este trabalho propôs determinar marcadores de dano oxidativo, bem como, estimar a capacidade antioxidante do hospedeiro humano antes, no decorrer e após uso de antimaláricos associando os danos oxidativos as concentrações séricas de PQ e CPQ. Para tanto, foram incluídos 38 pacientes provenientes da demanda espontânea do PECEM/IEC com diagnóstico positivo, pelo exame de gota espessa, para malária por *P. vivax*, sem sinais e sintomas sugestivos de gravidade ou agravamento no decorrer do estudo. Esta casuística se justifica por constituir o perfil de pacientes na região amazônica, que detém mais de 99,0% dos casos da doença do país, dos quais o *P. vivax* é responsável por 80% dos registros.

A alteração na dinâmica de ocupação espacial da região, e conseqüente distribuição dos anofelinos, não influenciou o perfil da doença, que permanece com característica ocupacional, o que torna patente o impacto social e econômico causado pela malária na região, pois predomina nos adultos do sexo masculino em idade produtiva, conforme demonstrado neste estudo, os quais apresentam maior risco de exposição ao vetor, ao se aproximarem dos criadouros, caracterizados por coleções de águas limpas, quentes, sombreadas e de baixo fluxo, necessárias a proliferação da fêmea do anofelino (BRASIL, 2010), os quais são comuns nas áreas de exploração de recursos naturais, como metais nobres e madeira, para onde esses indivíduos se deslocam. (CORDEIRO, FILOMENO e COSTA, 2002; GUERRA, SNOW e HAY, 2006). Estes dados corroboram estudos epidemiológicos realizados por Barbosa *et al.* (2006) que relataram maior incidência no sexo masculino (72,5%), com idade entre 21-40 anos (55%) e por Teixeira (2011) que reportou 67,5% de pacientes do sexo masculino com idade entre 34-42 anos (30%).

Os relatos de falha terapêutica a associação CQ e PQ são antigos, comuns e mundialmente distribuídos, inclusive na Amazônia brasileira, e merecem destaque nas investigações acerca da doença e suas determinantes, assim como, na proposição de novas abordagens de tratamento (CALVOSA, 2005). Neste estudo, a recorrência parasitária registrada durante o período de seguimento clínico laboratorial recomendado pela OMS para estudos de efetividade pode ser devida tanto a falha terapêutica pela resistência das cepas de *P. vivax* ao esquema

terapêutico empregado, quanto a nova infecção, pois os pacientes retornaram a área onde a doença foi adquirida. Dado o intervalo de tempo da recorrência é pouco provável que resulte de relapso dos hipnozoítas, pois os padrões de relapso no Brasil, ocorrem durante os primeiros seis meses após tratamento, mas admite-se a coexistência de hipnozoítos com fenótipos de longo período de latência com aqueles de relapso frequente (BOULOS *et al.*, 1991; ORJUELA-SÁNCHEZ *et al.*, 2009).

A malária por *P. vivax* cursa, via de regra, de forma assintomática nas áreas de IPA elevado, ou com sinais e sintomas clínicos comuns do acesso malárico, como febre, calafrios e sudorese. Em raros casos há agravamento do quadro clínico com evolução a óbito, que geralmente é acompanhado por hemólise e edema pulmonar agudo.

Os pacientes deste estudo não apresentaram manifestações clínicas ou sinais de agravamento no decorrer do tratamento que justificasse sua exclusão, o que pode ser devido tanto ao relato de episódios anteriores da doença, quanto a baixa densidade parasitária ( $n^{\circ}$  parasitos/mm<sup>3</sup> < 15.000) (HARINASUTA e BUNNAG, 1998; WHO, 2010). Repetidos episódios da doença conferem imunidade parcial aos pacientes, inclusive tornando-os assintomáticos, os quais são considerados verdadeiros reservatórios do plasmódio, a exemplo, a metade dos pacientes deste estudo relataram episódios anteriores da doença durante o atendimento clínico inicial, com destaque para o registro de mais de cinco ocorrências de malária. A maioria dos casos de malária por *P. vivax* cursa com parasitemia baixa a média na Amazônia brasileira, conforme relatos de Fernandes *et al.* (2008) e Teixeira (2011). O tempo médio para clareamento da parasitemia em cepas de *P. vivax* circulantes na área de estudo varia entre 24 a 60 horas, o que corrobora os dados deste estudo.

Os parâmetros hematológicos dos pacientes incluídos no estudo corroboram a falta de gravidade da doença, pois a maioria se encontra no intervalo de normalidade, e assim permaneceram, no decorrer do estudo. Destaca-se a monocitose e discreta plaquetopenia.

Contudo, os parâmetros bioquímicos evidenciaram alterações na fração HDL de colesterol a qual foi significativamente inferior na presença de parasitas. Na fase aguda dos processos infecciosos e inflamatórios as concentrações de proteínas plasmáticas específicas se alteram, afim de proteger o hospedeiro, assim como, auxiliar a reparação do organismo, a exemplo, o aumento na síntese das proteínas

de fase aguda, mediadas por citocinas produzidas em resposta a diversos estímulos, alterações no metabolismo das lipoproteínas, com consequente modificação nas concentrações dos lipídeos e lipoproteínas, representados pelo aumento dos triglicerídeos, resultante da elevação do VLDL, assim como, a diminuição do LDL e do HDL. Corroborando os achados deste estudo foram reportadas alterações no perfil lipídico dos pacientes com malária, como diminuição do colesterol total, HDL e LDL, elevação da lactato desidrogenase e aumento moderado dos triglicerídeos, as quais se associaram a espécie de plasmódio, a gravidade da doença, a oxidação das lipoproteínas *in vivo* e a resposta do hospedeiro frente a infecção aguda (FAUCHER *et al.*, 2002; SIBMOOH *et al.*, 2004;). Kim *et al.* (2008) relataram redução do colesterol total, HDL e LDL. Os triglicerídeos permaneceram normais e alguns pacientes apresentaram diminuição significativa.

Compreender as alterações do ciclo redox em pacientes com malária por *P. vivax* sem gravidade antes, durante e após tratamento foi o objetivo central deste estudo. O dano oxidativo no interior do eritrócito infectado pelo plasmódio resulta da explosão respiratória dos fagócitos envolvidos na defesa imune do hospedeiro, da degradação do grupo heme pelo parasita e do uso de antimaláricos, os quais contribuem conjuntamente para aumentar a produção de ERON's. Para tanto, estimou-se a lipoperoxidação a partir do malondialdeído empregando-se técnica espectrofotométrica para estimativa dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Já os níveis de metemoglobina refletiram o meio oxidativo no interior do eritrócito. Para contrapor os efeitos oxidativos deletérios resultantes dos níveis elevados de ERON's o organismo mobiliza antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, a qual foi estimada pela capacidade antioxidante total e pelo consumo de glutathione reduzida.

Os níveis de TBARS não se associaram ao uso de antimaláricos, pois foram semelhantes no decorrer do estudo. Entretanto, foram significativamente superiores quando comparados ao grupo controle, indicando claramente que a peroxidação lipídica se associa ao plasmódio em pacientes com malária não grave. Este achado foi corroborado por Pabón *et al.* (2003), os quais relataram diferença significativa nos níveis de MDA entre paciente com malária por *P. vivax* e *P. falciparum* não complicadas e o grupo controle, assim como, por Sohail *et al.* (2007), os quais reportaram aumento significativo da peroxidação lipídica em pacientes com *P. vivax*,

quando comparado ao grupo controle. Adicionalmente, Narsaria *et al.* (2011) também relataram aumento da peroxidação lipídica em grávidas do sudeste da Nigéria com malária assintomática. Por fim, Fabbri *et al.* (2013) correlacionaram a gravidade da doença com níveis de MDA, e observaram que a peroxidação lipídica foi maior em pacientes com malária grave quando comparados aqueles com a forma não grave, os quais, entretanto, apresentaram valores superiores ao grupo controle.

Após clareamento da parasitemia, os níveis de TBARS reduziram de forma não significativa sugerindo que apesar dos mecanismos de ação da CQ e da PQ, possivelmente, envolverem a geração de ERON's, os danos oxidativos à membrana eritrocitária foram, provavelmente, resultantes do metabolismo do *Plasmodium*, e originários da degradação do heme para obtenção de aminoácidos essenciais e da utilização dos lipídeos da membrana eritrocitária, visto que o parasito não possui via de síntese de triglicerídeos (GUHA *et al.*, 2006; SOHAIL *et al.*, 2007). Adicionalmente, a ativação da resposta imune pode ter contribuído para aumento da geração de ERON's (PABÓN *et al.*, 2003).

A metemoglobinemia foi associada ao uso de antimaláricos, pois foi semelhante entre o grupo controle e os pacientes com malária antes da introdução da quimioterapia, entretanto, no decorrer do tratamento houve aumento significativo dos teores de metemoglobina, corroborando outros achados da literatura, os quais relataram teores médios de 5% a 12% (BAIRD e HOFFMAN, 2004); 5% a 18% (HILL *et al.*, 2006) e inferiores a 20% durante as primeiras 24 horas (CARMONA-FONSECA *et al.*, 2009). Contudo, os níveis de metemoglobina reportados neste estudo não representaram risco a vida dos pacientes, ratificando estudos que indicaram que os teores de metemoglobina após doses terapêuticas de PQ são pequenos e toleráveis, sem sinais e sintomas típicos de metemoglobinemia, como cianose ou insuficiência respiratória, que normalmente são reportadas em níveis superiores a 20% (HALL *et al.*, 1986; RODRÍGUEZ-FERNANDEZ e DEL POZO-HESSING, 2005). Entretanto, Santana *et al.* (2007), descreveram manifestações clínicas de metemoglobinemia em pacientes com malária por *P. vivax* que apresentaram níveis entre 10% a 20%.

Pode-se inferir que o grupo heme livre tóxico Fe III PPIX resultante da degradação da hemoglobina no vacúolo digestivo ácido do plasmódio não eleva de forma significativa os teores de metemoglobina, os quais se associam ao uso de

antimaláricos. De fato, é reconhecido o efeito tóxico da PQ e seus metabólitos sobre o sistema hematopoiético, causando metemoglobinemia e hemólise maciça em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. Ressalta-se que a ingestão de CQ nas doses terapêuticas preconizadas, não promove a elevação dos níveis de metemoglobina, apesar da possibilidade do mecanismo de ação desta 4-aminoquinolina envolver a geração de ERON's (MONTIA *et al.*, 2002; SOLOMON *et al.*, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2010).

Dada as alterações do ciclo redox resultantes da presença do plasmódio nos eritrócitos e do uso de antimaláricos espera-se resposta antioxidante do hospedeiro adequada para contrapor a ação dos ERON's que promoveram aumento da lipoperoxidação nos pacientes com malária, assim como, do estado oxidativo no interior dos eritrócitos. Entretanto, a capacidade antioxidante não enzimática total foi semelhante nos pacientes com malária por *P. vivax* no decorrer do tratamento, assim como, quando comparados ao grupo controle. Dados similares foram relatados por Pabón *et al.* (2003), os quais relataram ausência de diferença significativa da capacidade antioxidante não enzimática entre pacientes infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum* e o grupo controle.

Justifica-se este achado pelo fato das principais defesas antioxidantes eritrocitárias serem constituídas por compostos contendo grupamentos sulfidrilas, como peroxiredoxinas, tioredoxinas e glutathione reduzida. De fato, houve diminuição significativa dos teores de glutathione reduzida no decorrer do tratamento ( $p=0.007$ ), assim como, antes do início do tratamento quando comparados ao grupo controle. Erel *et al.* (1997) estabeleceram correlação negativa significativa entre aumento da peroxidação lipídica e redução dos níveis de glutathione reduzida nos pacientes infectados por *P. vivax* e *P. falciparum*. Vega-Rodríguez *et al.* (2009) relataram redução dos níveis de glutathione reduzida nos eritrócitos de ratos infectados pelo *P. berghei*.

É relevante a atividade da glutathione reduzida na defesa eritrocitária do hospedeiro frente ao *Plasmodium spp.* (HARWALDT *et al.*, 2002; BECKER *et al.*, 2004), como cofator de reações enzimáticas e na redução da Fe [III] PPIX, subproduto tóxico da degradação da hemoglobina (MÜLLER, 2004), desempenhando desta forma funções importante nos eritrócitos infectados, tais

como: proteção contra danos oxidativos, modulação das alterações na membrana, no catabolismo do heme e no crescimento do parasito (SOHAIL *et al.*, 2007).

Os resultados deste estudo permitem inferir que a redução dos níveis de glutathiona reduzida se associou tanto ao uso de antimaláricos, quer seja, como cofator da glutathiona transferase nas reações de conjugação da fase 2 da biotransformação, ou nos mecanismos de redução de ERON's diretos, ou via oxidação pela glutathiona peroxidase, quanto aos ERON's gerados pela interação parasita e hospedeiro antes da introdução da quimioterapia (MÜLLER, 2004).

A ausência de diferença significativa entre o índice de EO entre os diferentes dias de estudo, e em relação ao grupo controle reflete a forma de determinação deste índice, quer seja a relação entre TBARS e TAC. A resposta antioxidante é complexa, envolve diferentes componentes e na maioria das vezes não há boa correlação entre teores de antioxidantes endógenos e exógenos com os biomarcadores de dano oxidativo na maioria das doenças (POLIDORI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010).

A PQ e seu principal metabólito foram determinados neste estudo objetivando correlacionar os teores destes compostos com o biomarcador de lipoperoxidação e de oxidação eritrocitária. De maneira geral, as concentrações de PQ se assemelharam aquelas reportadas em voluntários saudáveis da Tailândia e em pacientes com malária por *P. vivax* na Índia (MIHALY *et al.*, 1985; FLETCHER *et al.*, 1981). Fletcher *et al.* (1981), relataram teores médios de PQ em pacientes tailandeses do sexo masculino de 233ng/mL e nos caucasianos de 162ng/mL, após 2,5h da administração de 45mg de PQ por 5 dias; Por outro lado, Bangchang *et al.* (1994) relataram valores inferiores em pacientes tailandeses do sexo masculino, com concentração máxima de 57,7ng/mL e Kim *et al.* (2004) reportaram valores médios significativamente superiores em Koreanos com malária por *P. vivax*. É reconhecida a variabilidade das concentrações de antimaláricos nos diferentes grupos populacionais, assim como, quanto ao gênero, idade, gravidez e obesidade. Neste estudo, o elevado desvio padrão das médias das concentrações de PQ e CPQ nos diferentes dias caracteriza a elevada variabilidade inter individual nas concentrações do fármaco e do metabólito (KIM *et al.*, 2004).

A ausência de diferença significativa nas concentrações de PQ nos diferentes dias de estudos evidencia sua reduzida meia vida biológica e não se

acumulou significativamente no organismo. De fato, quando coadministrada com CQ, a PQ possui meia vida em torno de 6.6 (5.1-10.3) horas. Por outro lado, as concentrações máximas de CPQ são alcançadas cerca de 8 (4-12) horas após administração de PQ, e sua meia vida biológica é de 33.2 (33.2 -145) horas. A meia vida biológica do metabólito superior ao fármaco original foi evidenciada pelas concentrações significativamente elevadas de CPQ em D7, quando comparadas a D3, que se refletiu na relação entre as concentrações de PQ e CPQ, que foi significativamente superior em D3, quando comparada a D7 (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 2014).

Não foi observada correlação significativa entre os teores de PQ e CPQ em sangue total com as taxas de metemoglobina, apesar destas aumentarem de forma significativa após administração dos antimaláricos, o que se deve ao fato da ação antimalárica e efeitos tóxicos da PQ se associarem aos metabólitos oxidados formados via citocromo P-450, dotados de reduzida meia vida biológica, em especial a 5-HPQ (BANGCHANG *et al.*, 1994; BOWMAN *et al.*, 2005). Vasquez-Vivar e Augusto (1992) demonstraram que a 5-HPQ favorece a geração das ERON's, e sugeriram que este metabólito contribua para hemotoxicidade da PQ. De maneira semelhante, os níveis de TBARS não se correlacionaram as concentrações de primaquina e seu metabólito no sangue total. Por fim, mensuração de CPQ em fluidos corporais se destinaria a estimar a adesão ao tratamento.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo no qual foram incluídos pacientes com malária não grave por *P. vivax* com baixa densidade parasitária residentes na Amazônia oriental brasileira permitem concluir que:

- 1) A maioria dos pacientes foi do sexo masculino em idade produtiva, refletindo a importância ocupacional, social e econômica da doença;
- 2) O seguimento clínico laboratorial não indicou agravamento do quadro clínico, assim como, o hemograma manteve-se no intervalo de normalidade, apesar de monocitose e discreta plaquetopenia no decorrer do estudo;
- 3) Foram observadas alterações significativas na fração HDL do colesterol;
- 4) Os níveis de TBARS não se associaram ao uso de antimaláricos. Entretanto, foram significativamente elevados quando comparados ao grupo controle, indicando claramente que a peroxidação lipídica se associa ao plasmódio em pacientes com malária não grave;
- 5) A metemoglobinemia foi associada ao uso de antimaláricos, pois foi semelhante entre o grupo controle e os pacientes com malária antes da introdução da quimioterapia, entretanto, aumentou significativamente no decorrer do tratamento;
- 6) A capacidade antioxidante não enzimática total não se associou ao uso de antimaláricos e a infecção;
- 7) A diminuição dos níveis de glutatona reduzida se associaram tanto a infecção, quanto ao uso de antimaláricos;
- 8) Foi observada elevada variabilidade inter individual nas concentrações de primaquina e carboxiprimaquina em nosso estudo. A primaquina não se acumulou significativamente nos pacientes no decorrer do estudo, entretanto, foi observada concentrações elevadas de carboxiprimaquina em D7, o que influenciou na relação entre as concentrações do fármaco e seu metabólito;

- 9) Não foi observada correlação significativa entre os teores de primaquina e carboxiprimaquina em sangue total com as taxas de metemoglobina e com os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; URBACZEK, A.C.; FONSECA, L.M.; URBINATI, E.C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, 69 (4): 1133-1139, 2009.

ALECRIM, M.G.C. **Estudo da Resistência do *P. falciparum* in vitro e in vivo na Amazônia brasileira**. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 1981.

ALECRIM, W. D. e ALECRIM, M. G. C. Malária, In: Tavares, W. **Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. São Paulo: Atheneu, p 732-741, 2005

ALVES, A. A.; SILVA, L. P.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Amperometric sensor for glutathione reductase activity determination in erythrocyte hemolysate. **Analytical Biochemistry**, v. 323, n.1, p. 33 – 38, 2003.

AMORES-SÁNCHEZ, M. I.; MEDINA, M. A. Glutamine, as a precursor of glutathione and oxidative stress. **Molecular genetics and metabolism**, Orlando, v.67, p.100-105, 1999.

ANDERSON, M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological sample. **Methods in Enzimology**, New York, v. 113, p. 548-555, 1969.

ANDRADE, S. L. **Aspectos Epidemiológicos da Malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil**. 2005. 130f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

ANSTEY, N. M.; DOUGLAS, N.M.; POESPOPRODJO, J.R.; PRICE, R.N. Plasmodium vivax: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. **Advances in Parasitology**, Oxford, v. 80, p. 151-201, Nov. 2012.

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

ANTUNES, M. V.; LAZZARETTI, C.; GAMARO, G. D. *et al.*, Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 279-287, 2008.

ARAÚJO, C. F.; LACERDA, M. V. G.; ABDALLA, D.; LIMA, E. S. The role of platelet and plasma markers of antioxidante status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 103, n. 6, p. 517-521, 2008.

ATAMNA, H.; GINSBURG, H. Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 1993, 61, 231–234.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 30, n. 2, p.144-155, 1997.

BAIRD, J. K.; HOFFMAN, S. L. Primaquine therapy for malaria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p.1336–1345, 2004.

BAIRD, J. Kevin. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 3, p. 508-534, 2009.

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

BARBOSA, H. H. M.M.; CARVALHO, D. R.; CANTANHEDE G.; SERRATE PEREIRA M. V, BATISTA R. A. S.; RODRIGUES, R. R. Epidemiologia dos pacientes atendidos no programa de malária na unidade de saúde da pedreira, em Belém. **Revista Paraense de Medicina**, vol.20, n°.1, p.58-58, 2006.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, July/Aug, 2010.

BARREIROS. A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Sociedade Brasileira de Química**, São Paulo, n. 29 (1), p.113-23, 2006.

BECKER, K.; TILLEY, L.; JONATHAN, L, V., *et al.* Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, p.163-189, 2004.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12 n. 2, p. 123-130, 1999.

BOULOS, M.; AMATO NETO, V.; DUTRA, A.P.; DI SANTI, S.M.; SHIROMA, M. Análise da frequência de recaídas de malária por *Plasmodium vivax* em região não endêmica (São Paulo, Brasil). **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.**, São Paulo, v. 33, n.2 , p.143-146, Mar.-Abr. 1991.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina**, Buenos Aires, v. 58, p. 350-356, 1998.

BOWMAN, Z. S., MORROW, J. D., JOLLOW, D. J., MCMILLAN, D. C., Primaquine-induced hemolytic anemia: role of membrane lipid peroxidation and cytoskeletal protein alterations in the hemotoxicity of 5-hydroxyprimaquine, **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2005, *314*, 838-845.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. *Plasmodium*, Malária, In: Neves, D.P. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, p.143-161, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Terapêutica da Malária**. 6ª Ed., Brasil, 2001.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. **Situação Epidemiológica no Brasil**. 2008a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose**. 2. Ed. rev. - Brasília: Ministério da Saúde, 2008b. 195 p. : il. - (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica, n. 21).

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial de Malária**, p. 116, 2009.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, 2010. 36 p. (Série A. Normas e manuais técnicos).

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Sistema de informação de Vigilância Epidemiológica – Notificação de Casos – Malária. Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2014. Disponível em: <[http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/default.asp](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp)>. Acesso em: 15 de maio de 2014.

BRINKMANN, V.; KAUFMANN, S. H. E.; SIMON, M. M.; FISHER, H. Role of macrophages in malaria: 2 metabolite production and phagocytosis by splenic macrophages during lethal *Plasmodium berghei* and self-limiting *Plasmodium yoelii* infection in mice. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 44, n. 3, p. 743-746, 1984.

CALVOSA, V.S.C. Resistência e eficácia ao tratamento da malária no Estado do Amapá, 2001 a 2005. **(Tese) Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários**. Belém, Universidade Federal do Pará, 2005. 130p.

CAMARGO, T. M.; ALVEZ, M. I. F.; OLIVEIRA, S. J., *et al.*, Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MeHb). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 95-98, 2007.

CARMONA-FONSECA, J.; ÁLVAREZ, G.; MAESTRE, A. Methemoglobinemia and adverse events in *Plasmodium vivax* malaria patients associated with high doses of

primaquine treatment. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, n.2, p. 188–193, 2009.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Biology**, 2010. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>>. Acesso em: 7 de fevereiro de 2014.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p. 749– 762, 2010.

CLARK, I.A; CHAUDHRI, G; GOWDEN, W.B. Some roles of radicals in malaria. **Free Radicals Biology & Medicine**, New York, v. 6, p. 315-21, 1989.

COHEN, A. A.; MCGRAW, K. J. No simple measures for antioxidant status in birds: complexity in inter and intraspecific correlations among circulating antioxidant types. **Functional Ecology**, Oxford, v. 23, p. 310-320, 2009.

CORDEIRO, C. E. S.; FILOMENO, C. R. M.; COSTA, C. M. A. Perfil epidemiológico da malária no estado do Pará em 1999 com base numa série histórica de dez anos (1989-1999). **Informe Epidemiológico do Sistema Único de Saúde**, v. 11, n. 2, p. 69 – 77, 2002.

COSTANTINI, D.; VERHULST, S. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? **Functional Ecology**, Oxford, v. 23, p. 506–509, 2009.

CONSTANTINO, L., PAIXÃO, P., MOREIRA, R., PORTELA, M. J., ROSÁRIO, V. E., ILEY, J. Metabolism of primaquine by liver homogenate fractions, Evidence for monoamine oxidase and cytochrome P450 involvement in the oxidative deamination of primaquine to carboxyprimaquine, **Experimental and Toxicologic Pathology**, 1999, 51, 299-303.

CORNEJO, O. E.; ESCALANTE, A. A. The origin and age of *Plasmodium vivax*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, p. 558-563, 2006.

DAILY, J. P. Antimalarial drug therapy: the role of parasite biology and drug resistance. **Journal Clinic Pharmacology**, v. 46, p. 1487-1497, 2006.

DAS, B. S.; THURNHAM, D. I.; PATNAIK, J. K., *et al.* Increased plasma lipid peroxidation in riboflavin-deficient, malaria-infected children. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 51, p. 859-863, 1990.

DAS, B. S.; NANDA, N. K. Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 93, 58- 62, 1999.

DEEN, J. L.; SEIDLEIN, L.; DONDORP, A. Therapy of uncomplicated malaria in children: a review of treatment principles, essential drugs and current

recommendations. **Journal Tropical Medicine and International Health**, Tanzania, Korea, London and Thailand, v. 13, n. 9, p. 1111-1130, 2008.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.15, p.316-328, 2005.

DEY, S.; GUHA, M.; ALAM, A.; *et al.* Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidative stress to promote hepatocyte apoptosis. **Free Radical Biological & Medicine**. New York, v. 46, n. 2, p.271-281, 2009.

DIAZ, J; SERRANO, E; ACOSTA, F; CARBONELL, L. F References intervals for four biochemistry analyses in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 44, n. 10, p. 2215-2217, 1998.

DOCKRELL, H. M.; PLAYFAIR, J. H. Killing of *Plasmodium yoelli* by enzyme-Induced products of the oxidative burst. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 43, n.33, p.451-456, 1984.

DONDORP, A. M.; OMODEO-SALÉ, F.; CHOTIVANICH, K., *et al.* Oxidative stress and rheology in severe malaria. **Redox Report: communications in free radical research**, New York, v. 8, n., p. 292-294, 2003.

DOTAN, Y.; Lichtenberg, D.; Pinchuk, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 43, p. 200-227, 2004.

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

DUARTE E.C. & GYÖRKÖS T.W. Self-reported compliance with malaria treatment and occurrence of malaria during follow-up in a Brazilian Amazon population. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, 8: 518-524, 2003.

EGAN, T. J.; COMBRINCK, J. M.; EGAN, J.; *et al.* Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Biochemistry Journal**, California, v. 365, p. 343-347, 2002.

EREL, O.; KOCYIGIT, A.; ANCI, S.; AKTEPE, N.; BULUT, V. Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 30, n. 8, p. 631-9, 1997.

EREL, O.; VURAL, H.; AKSOY,N.; ASLAN,G.; ULUKANLIGIL, M. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 34, p. 341-344, 2001.

FABBRI, C.; MASCARENHAS-NETTO, R. C.; LALWANI, P.; MELO, G. C.; MAGALHÃES, B. M. L.; ALEXANDRE, A. A.; LACERDA, M. V. G.; LIMA, E. S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in *Plasmodium vivax* malaria patients evolving with cholestatic jaundice. **Malaria Journal**, 2013, 12:315

FAUCHER, J.F.; TALLENT, C. The impact of malaria on common lipid parameters, **Parasitology Research**, v. 88, p 1040-1043, 2002.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - Guidance for industry. **Bioanalytical Method Validation**, may 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance>>. Acesso em: setembro de 2014.

FELIPPE, J. R; PERCÁRIO, S. Radicais livres em medicina Intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 66-72, 1991.

FERNANDES, A. A. M.; DE MOURA CARVALHO, L.J.; ZANINI G.M.; VENTURA, A. M. R. S.; DE SOUZA, J.M.; COTIAS, P. M.; SILVA-FILHO I. L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Similar cytokines response and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon Region. **Clinical and Vaccine Immunology**, 2008 April; 650-658.

FERREIRA, M. U.; NUNES M. S.; WUNDERLICH, G. Antigenic diversity and immune evasion by malariaparasites. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 2004, 11, 987–995.

FERREIRA, M.E.S. **Concentrações plasmáticas de primaquina e metemoglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Belém-PA, 2010.

FERREIRA, M.; GOMES, M. S. M.; VIEIRA, J. L. F. Methemoglobinemia in patients with *Plasmodium vivax* receiving oral therapy with primaquine. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n.1, p. 113-115, 2011.

FLETCHER, K. A.; PRICE EVANS, D. A.; GILLES, H. M.; GREAVES, J.; BUNNAG, D.; HARINASUTA, T. Studies on the pharmacokinetics of primaquine. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 59, n. 3, p. 407-412, 1981.

FREITAS, L.F.; CHAVES, G.C.; WANNMACHER, L.; CASTRO, C.G.S.O. Malária não complicada por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* no Brasil: Evidências sobre fármacos isolados e associações medicamentosas empregados em esquemas terapêuticos recomendados pelo protocolo terapêutico oficial. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23 (10), p. 2285-2294, 2007.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), superoxide dismutases, and related matters. **The Journal of Biology Chemistry**. Rockville, v. 272, n. 30, p.18515-19517, 1997.

FRISCHER, H; AHMAD, T. Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. St. Louis, v. 109, p. 583-8, 1987.

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

GARCEZ, M; BORDIN, D; PERES, W; SALVADOR, M. Radicais livres e espécies reativas. In: SALVADOR, M; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: Editora ULBRA, p.15-34, 2004.

GARCIA, L. S. Malaria. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, p. 93-129, 2010.

GRAHAME-SMITH, D.G.; ARONSON, J.K. **Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia**, 3rd ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 2004.

GUERRA, C. A. ; SNOW, R. W. e HAY, S. I. A global assessment of closed forests, deforestation and malaria risk. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 100, n. 3, p. 189–204, Abril, 2006.

GUHA, M.; KUMAR, S.; CHOUBEY, V.; MAITY, P.; BANDYOPADHYAY, U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, p. 1224 – 1226, 2006.

HARINASUTA, T e BUNNAG, D. Clinical features of malaria. **Malaria – Principles and Practice of Malariology**. London: Churchill Livingstone, p. 709-734, 1998.

HALL, A. H.; KULIG, K. W.; RUMACK, B. H. Drug- and chemical-induced methaemoglobinaemia clinical features and management. **Journal of Medical Toxicology**, v. 1, p. 253–260, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology & Medicine**, 3 ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology & Medicine**. 3ed. New York: Oxford University Press, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology & Medicine**. 4a ed. USA: Oxford University Press. p. 851. 2007.

HARWALDT, P.; RAHLFS, S.; BECKER, K. Glutathione S–transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: characterization of a potential drug target. **Journal of Biology Chemistry**, Rockville, n. 383, 821-830, 2002.

HEGESH, E.; GRUENER, R. N.; COHEN S.; BOCHKOVSKF, R.; SHUVAL, H. I. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 30, p. 679-682, 1970.

HERMSEN, C.; BENNICK, E.; SAUERWEIN, F. T.; ELING, W. The role of reactive oxygen intermediates in the development of *Plasmodium berghei* induced cerebral malaria. **Immunology Letters**, 56: 27-28, 1997.

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

HUBER, S. M.; UHLEMANN, A. C.; GAMPER, N. L., *et al.* *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 22-30, 2002.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, n. 5, p. 1170 – 1179, 2008.

ISAKSSON, C.; STURVE, J.; ALMROTH, B. C.; ANDERSSON, S. The impact of urban environment on oxidative damage (TBARS) and antioxidant systems in lungs and liver of great tits, *Parus major*. **Environmental Research**, v. 109, p. 46-50, 2009.

JARAMILLO, M.; GODBOUT, M.; OLIVIER, M. Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and independent mechanisms. **The Journal of immunology: official journal of the American Association of Immunologists**. Baltimore, USA, v.74, n.1, p.475-484, 2005.

JAYSHEREE, R.S; GANGULY, N.K; SHETI, A; MAHAJAN, R.C. Oxidative metabolic response of peripheral blood monocytes of monkeys during primary and chronic *Plasmodium knowlesi* infection. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 99, n.1, p. 245-7, 1992.

JOHN, G. K.; DOUGLAS, N. M; SEIDLEIN, L.; NOSTEN, F.; BAIRD, J. K.; WHITE, N. J.e PRICE, R. N. Primaquine radical cure of *Plasmodium vivax*: a critical review of the literature. **Malaria Journal Reviews**, Londres, v. 11, n. 280, p. 1-11, Ago. 2012.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 8 (9-10): 1865-1879, 2006.

KELLER, C. C.; KREMSNER, P. G.; HITTNER, J. B., *et al.* Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 72, n. 8, p. 4868-4873, 2004.

KIM, JANG SU; SEO OH, JUN; BAE, SOOK YOUNG; NAM, DEOK HWA; LEE, CHANG HWAN; YANG, HYUN JI; LEE, CHANG KYU; LEE, WON JÁ; KIM, HEUNG CHUL; KLEIN, TERRY A.; LIM, CHAE SEUNG; KIM YOUNG KEE. Alteration of platelet counts and lipid profiles after treatment of acute *Plasmodium vivax*. **Acta Tropica**, v 106, p 39-43, 2008.

KIM, Y.; KUH, H.; KIM, M.; KIM, Y.; CHUNG, W.; KIM, S. e KANG, M. Pharmacokinetics of Primaquine and Carboxyprimaquine in Korean Patients with Vivax Malaria. **Archives of Pharmacal Research**, Nova Iorque, v. 27, n. 5, p. 576-580, Fev. 2004.

KOPITZ, J.; HOLZ, F. G.; KAEMMERER, E. *et al.*, Lipids and lipid peroxidation products in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Biochimie**, Paris, v. 86, p. 825-831, 2004.

KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicology letters**, Amsterdam, v.157, n. 3, p. 175-188, 2005.

KUPPUSAMY, U. R.; DHARMANI, M.; KANTHIMATHI, M. S.; INDRAN, M. Antioxidant enzyme activities of human peripheral blood mononuclear cells exposed to trace elements. **Biological Trace Element Research**, v. 106, p. 29–39, 2005.

LACERDA, M. V. G.; MOURÃO, M. P. G.; ALEXANDRE, M. A. A.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. M. L.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E.; FILHO, F. S. S.; BRASIL, P.; VENTURA, A. M. R. S.; TADA, M. S.; COUTO, V. S. C. D.; SILVA, A. R.; SILVA, R. S. U.; ALECRIM, M. G. C. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, Brazil, 11:12, 2012.

LAWPOOLSRI, S., KLEIN, E. Y., SINGHASIVANON, P., YIMSAMRAN, S., THANYAVANICH, N., MANEEBOONYANG, W., HUNGERFORD, L. L., MAGUIRE, J. H., SMITH, D. L., Optimally timing primaquine treatment to reduce Plasmodium falciparum transmission in low endemicity Thai-Myanmar border populations, **Malaria Journal**, 2008, 8, 159.

LI, L.; CHEN, C. O.; ALDINI, G.; JOHNSON, E. J.; RASMUSSEN, H.; YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; BLUMBERG, J. B.; RUSSELL, R. M.; YEUM, K. J. Supplementation with lutein or lutein plus green tea extracts does not change oxidative stress in adequately nourished older adults. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v., 21; n.6, p. 544-549, 2010.

LORIA, P.; MILLER, S.; FOLEY, M.; TILLEY, L. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and the quinoline antimalarials. **Biochemical Journal**, California, USA, v. 339, p. 363-370, 1999.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 3, 1999.

MARKLUND, S.A. Simple specific method for the determination of the hemoglobin content of tissue homogenates. **Clinic Chimica Acta**, v. 92, 229–234, 1979.

MEIER, B; SCHERK, C; SCHIMIDT, M; PARAK, F. pH-dependent inhibition by azide and fluoride of the iron superoxide dismutase from *Prepionibacterium shermanii*. **The Biochemical Journal**, London, v. 331, p. 403-407, 1998.

MIHALY, G. W.; WARD, S. A.; EDWARDS, G.; NICHOLL, D. D.; L'E ORME, M. e BRECKENRIDGE, A. M. Pharmacokinetics of primaquine in man. I. Studies of the absolute bioavailability and effects of dose size. **British Journal of Clinical Pharmacology**., Londres, v. 19, p. 745-750, 1985.

MILLER, N.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, London, v. 84, p. 407-412, 1993.

MOHAPATRA, M. K.; PADHIARY, K. N., MISHAR, D. P. SETHYG. Atypical manifestations of *Plasmodium vivax* malaria. **Indian journal of malariology**, Calcutta, v. 39, p. 18-25, 2002.

MONTIA, D.; BASILICO, N.; PARAPINI, S., *et al.* Does chloroquine really act through oxidative stress. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 522, p. 3-5, 2002.

MÜLLER, S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.53, n.5, p.1291-1305, 2004.

NARSARIA, N.; MOHANTY, C.; DAS, B. K.; MISHRA, S. P.; PRASAD, R. Oxidative stress in children with severe malaria. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.1, p. 1-4, 2011.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical in Biology & Medicine**, New York, v. 49, p. 503–515, 2010.

NOGUEIRA, F.; DIEZ, A.; RADFAR, A.; PÉREZ-BENAVENTE, S.; ROSARIO, V. E.; PUYET, A.; BAUTISTA, J. M. Early transcriptional response to chloroquine of the *Plasmodium falciparum* antioxidant defence in sensitive and resistant clones. **Acta Tropical**, v. 114, p. 109–115, 2010.

NORDBERG, J; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical in Biology & Medicine**, New York, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NORONHA, E.; ALECRIM, M. G.; ADOLFO, G., *et al.* Resistência à mefloquina do tipo RIII em crianças com malária falciparum em Manaus, AM. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 201-205, 2000.

OMODEO-SALÉ, F.; MOTTI, A.; BASILICO, N., *et al.* Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. **Blood**. New York, v. 102, n. 2, p. 705-711, 2003.

ORJUELA-SÁNCHEZ, P.; SILVA, N.S.; SILVA-NUNES, M.; FERREIRA, M.U. Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Estado Unidos da América, v. 81, n. 5, p. 961-968, Nov. 2009.

PABÓN, A.; CARMONA, J.; BURGOS, L.; BLAIR, S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 36, p.71-78, 2003.

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

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Generic protocol for antimalarial drug-efficacy studies in the Américas, 2004**. Efficacy of chloroquine for the treatment of *Plasmodium vivax* malaria. Genebra. Disponível em <http://www.paho.org/english/AD/DPC/CD/mal-antimalarials.htm>. Acesso dezembro de 2010.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 155, n. 2, p. 131–136, 2011.

PAREDES, S. F.; SANT´ANA, P.; MOREIRA, A. B., *et al.* Determinação fluorimétrica de cloroquina em fase sólida: Aplicação em amostras farmacêuticas, **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, 2002.

PERCÁRIO, S. **Alterações oxidativas e da defesa antioxidante no broncoespasmo agudo induzido em cobaias**. São Paulo, Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2000.

PERCÁRIO, S. MOREIRA, D. R.; GOMES, B. A. Q.; FERREIRA, M. E. S.; GONÇALVES, A. C. M.; LAURINDO, P. S. O.; VILHENA, T. C.; DOLABELA, M. F.; GREEN, M. D. Oxidative Stress in Malaria. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v.13, 2012.

PERRY, J. J. P.; SHINA, D. S.; GETZOFFA, E. D.; TAINER, J. A. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, n. 2, p. 245–262, 2010.

PIMENTEL, L.F.; JACOME JUNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V. C. F; MAGALHÃES, N.S.S. Nanotecnologia Farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 503-514, 2007.

PINO, P.; VOULDOUKIS, I.; DUGAS, N., *et al.* Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 10, n. 10, p. 582-586, 2003.

POLIDORI, M. C.; CARRILLO, J. C.; VERDE, P. E.; SIES, H.; SIEGRIST, J.; STAHL, W. Plasma micronutrient status is improved after a 3-month dietary intervention with 5 daily portions of fruits and vegetables: implications for optimal antioxidant levels. **Journal of Nutrition**, v. 8, n.10, 2009.

POTTER, S. M.; MITCHELL, A. J.; COWDEN, W. B., *et al.* Phagocyte derived reactive oxygen species do not influence the progression of murine blood-stage malaria infections. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 73, n. 8, p.4941-4947, 2005.

PUKRITTAYAKAMEE, S; CHANTRA, A; SIMPSON, JA; VANIJANONTA, S; CLEMENS, R; LOOAREESUWAN, S; WHITE, NJ. Therapeutic Responses to Different Antimalarial Drugs in Vivax Malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n. 6, p. 1680-1685. 2000.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; TARNING, J.; JITTAMALA, P.; CHARUNWATTHANA, P.; LAWPOOLSRI, S.; J. L., SUE; HANPITHAKPONG, W.; HANBOONKUNUPAKARN, B., DAY, N. P. J.; ASHLEY, E. A. e WHITE, N. J. Pharmacokinetic Interactions between Primaquine and Chloroquine . **Antimicrob Agents Chemother.**; v. 58, n. 6, p. 3354–3359, Jun 2014.

RAHMAN K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v.2, n. 2, p. 219–236, 2007.

RE, R., PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A., *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorizing assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

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

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, A.; DEL POZO-HESSING, C. Intoxicación por cianuro. **Medisan**, v. 5, p. 103–107, 2005.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, F. N.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

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

SCHWARZER, E.; KUHN, H.; VALENTE, E.; ARESE, P. Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. **Blood**, New York, v. 101, n. 2, p.722-728, 2003.

SERAFINI, M.; DEL RIO, D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? **Redox report: communications in free radical research**, Edinburgh, v. 9, p. 145-152, 2004.

SERIROM, S.; RAHARJO, W. H.; CHOTIVANICH, K.; LOAREESUWAN, S.; KUBES, P.; HO, M. Anti-Adhesive effect of nitric oxide on *Plasmodium falciparum* cytoadherence under flow. **American Journal of Pathology**, v. 162, n. 5, p. 1651 – 1659, 2003.

SHANKS, G. D.; KAIN, K. C; KEYSTONE, J. S. Malaria chemoprophylaxis in the age of drug resistance. II. Drugs that may be available in the future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 381–385, 2001.

SIBMOOH, N.; YAMANONT,P.; KRUDSOOD, S.; LEOWATTANA, W.; BRITTENHAM, G.; LOOAREESUWAN, S.; UDOMSANGPETCH, R.; Increase fluidity and oxidation of malaria lipoproteins: relation with severity and induction of endothelial expression of adhesion molecules, **Lipids Health Disease**, v. 3, p.15, 2004.

SOHAIL, M.; KAUL, A.; RAZIUDDIN, M.; ADAK, T. Decreased glutathione-S-transferase activity: diagnostic and protective role in *vivax* malaria. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 40, p. 377-382, 2007.

SOLOMON, V. R.; LEE, H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 220 – 233, 2009.

STEGHENS, J. P.; KAPPEL, A. L. V.; DENIS, I. *et al.*, Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, n. 2, p. 242-249, 2001.

STRALIN, P; MARKLUND, S. L. Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase in human derma fibroblasts. **Biochemistry Journal**, California, v. 298, p. 347-352, 1994.

TAUIL, P. L. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.106 supl.1, p. 105-106, 2011.

TEIXEIRA, J. R. M. **Avaliação da Terapêutica da Malária Por *Plasmodium vivax*: Perfil Cinético Da Cloroquina E Primaquina**. Tese – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Pará, 2011.

THE MERCK Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14. ed. **Rahway: Merck Co.**, 2006. 2564 p.

TILLEY, L.; LORIA, P.; FOLEY, M. I. N TOTOWA, R. P. J. Chloroquine and other quinoline antimalarials. **Antimalarial chemotherapy, Humana Press, Totowa, NJ**, p. 87-122, 2001.

TOLER, S. The plasmodial apicoplast was retained under evolutionary selective pressure to assuage of blood stage oxidative stress. **Medical Hypotheses**, New York, v. 65, n. 4, p. 683-690, 2005.

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

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

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

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F., *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidants e marcadores de dano oxidativo em saúde humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30. n. 5, 1323-1338, 2007.

VASQUEZ-VIVAR, J.; AUGUSTO, O. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine: oxidation and redox cycling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 6848 – 6854, 1992.

VEGA-RODRÍGUEZ, J.; FRANKE-FAYARD, B.; DINGLASAN, R. R.; JANSE, C. J.; PASTRANA-MENA, R.; WATERS, A. P.; COPPENS, I.; RODRÍGUEZ-ORENGO, J. F.; JACOBS-LORENA, M.; SERRANO, A. E. The glutathione biosynthetic pathway of *Plasmodium* is essential for mosquito transmission. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 2, 1-12, 2009.

WILMANSKI, J.; SIDDIQI, M.; DEITCH, E; A.; SPOLARICS, Z. Augmented IL-10 production and redox-dependent signaling pathways in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mouse peritoneal macrophages. **Journal of leukocyte biology**, New York, v.78, n.1, p. 85-94, 2005.

WONGSRICHANALAI, C.; BARCUS, M. J.; MUTH, S.; SUTAMIHARDJA, A. E WERNSDORFER, W..H. A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Estados Unidos da América., v. 77, n. 6, p. 119-127, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world Malaria Report: 2005**. Geneva: World Health Organization. [http://rbm.who.int/wmr 2005/](http://rbm.who.int/wmr2005/). Acesso em 24 de fevereiro de 2013.

\_\_\_\_\_. **Global report on antimalarial drug efficacy AND DRUG RESISTANCE: 2000–2010**. Geneva, World Health Organization, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241500470/en/>>. Acesso em: 12.09.2014.

\_\_\_\_\_. **World Malaria Report: 2011**. Disponível em: [http://www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html). Acesso em: 15 de janeiro de 2012.

\_\_\_\_\_. **World Malaria Report: 2013**. Disponível em: [http://www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html). Acesso em: 11 de abril de 2014.

YAGI, K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochemical medicine**, New York, v. 15, n. 2, p. 212-216, 1976.

YAZAR, S.; KILLIC, E.; SARAYMEN, R.; OZBILGE, H. Serum malondialdehyde levels in patients infected with *Plasmodium vivax*. **The West Indian medical journal**. Jamaica, v. 53, n. 3, p.147-149, 2004.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p.176–186, 2001.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, p. 310–316, 2009.

## ANEXO A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

**Projeto:** Marcadores de Estresse Oxidativo e concentrações de primaquina e carboxiprimaquina em pacientes com malária por *Plasmodium vivax*.

### DESCRIÇÃO E OBJETIVO DO ESTUDO

Você tem um tipo de doença denominada malária que é causada por um protozoário chamado *Plasmodium vivax*. Este estudo tem o objetivo de estabelecer a medição de primaquina, seu metabólito (carboxiprimaquina) nas suas amostras de sangue, com a finalidade de verificar se há uma proporção entre a quantidade dessas substâncias no plasma e na hemácia. Será determinada também no seu sangue índices de estresse oxidativo como: a capacidade antioxidante total não enzimática, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, bem como os teores de metemoglobina e os níveis de glutathiona reduzida associando-os às concentrações sanguíneas de primaquina e carboxiprimaquina no tratamento da malária.

Esta pesquisa irá ajudar a compreender melhor o envolvimento dos Radicais Livres de Oxigênio e Nitrogênio – ERON's na fisiopatogenia da malária, bem como seus medicamentos utilizados em seu tratamento se associam ao dano oxidativo eritrocitário.

Você ou a pessoa pela qual é responsável será tratada para malária com o medicamento que está sendo usado pelo serviço de saúde de seu município para o tratamento dessa doença.

Com a sua autorização, ou do responsável do paciente será coletado 10 mL de sangue, através da punção da veia do braço, para a pesquisa e pelo método “fura-dedo”, para o diagnóstico de rotina da malária. A coleta de sangue será realizada no 1º dia de diagnóstico e no 2º, 14º e 17º dia de controle da malária.

Nos exames serão utilizados materiais descartáveis e Ihe causará o mínimo de risco, além dos riscos atribuídos à coleta da amostra para realização do exame de rotina.

Depois que os resultados dos exames estiverem prontos, a pessoa que participar da pesquisa poderá ver estes resultados.

O sangue coletado poderá futuramente ser utilizado para possíveis pesquisas relacionadas à malária.

Participando deste estudo você (ou o paciente) receberá cuidados médicos durante todo o seguimento do seu tratamento, e, caso de qualquer complicação decorrente da malária e do uso dos medicamentos estará disponível para qualquer problema. Também você estará contribuindo com essa pesquisa para o conhecimento científico da malária em nosso estado.

Sua participação é VOLUNTÁRIA, isto quer dizer que o paciente tem todo direito de não participar ou se retirar do estudo, em qualquer fase da pesquisa. A amostra de sangue coletada será analisada 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 pesquisadores utilizarão os resultados desta pesquisa posteriormente em eventos de âmbito científico, tais como publicações e congressos.

Os principais pesquisadores são:

1. **Luiz Carlos de Souza Rodrigues**: aluno do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará;
2. **Dr. José Luiz Fernandes Vieira**: orientador desta pesquisa;

A pessoa que aceitar participar da pesquisa guarda uma cópia deste documento que será assinado em duas vias, sendo que uma cópia fica com o pesquisador e outra com o paciente.

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

Nome: Luiz Carlos de Souza Rodrigues

End: Rua Augusto Corrêa, s/n Guamá

Fone: 3201-7733

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, compreendendo seus riscos e benefícios. Declaro ainda, que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa, cooperando com a mesma.

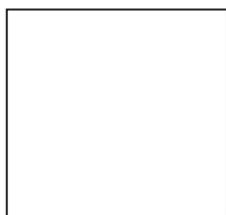
Belém, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 20\_\_.

---

Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal

---

Testemunha (No caso de analfabetismo)



Impressão digital (No caso de analfabetismo).

## ANEXO B



Parecer de Aprovação nº 0028/2010  
Protocolo CEP/IEC - Nº 0015/10  
CAAE: 0015.0.072.000-10

Ananindeua/PA, 13 de outubro de 2010.

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: “Malária por *Plasmodium vivax*: análise da possível influência da composição corporal na resposta terapêutica à primaquina”

Pesquisador Responsável: ROSANA MARIA FEIO LIBONATI

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epigrafe foi considerado **aprovado**.

Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

Atenciosamente,

MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES  
Coordenador do CEP/IEC