



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

**PRISCILA DE NAZARÉ QUARESMA PINHEIRO**

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE  
LUMEFANTRINA EM PLASMA E SANGUE TOTAL ADSORVIDO EM PAPEL DE  
FILTRO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) EM  
PACIENTES COM MALÁRIA POR *PLASMODIUM FALCIPARUM***

**BELÉM**  
**2010**

**PRISCILA DE NAZARÉ QUARESMA PINHEIRO**

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE LUMEFANTRINA EM PLASMA E SANGUE TOTAL ADSORVIDO EM PAPEL DE FILTRO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) EM PACIENTES COM MALÁRIA POR *PLASMODIUM FALCIPARUM***

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

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira.

BELÉM  
2010

PRISCILA DE NAZARÉ QUARESMA PINHEIRO

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE LUMEFANTRINA EM PLASMA E SANGUE TOTAL ADSORVIDO EM PAPEL DE FILTRO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) EM PACIENTES COM MALÁRIA POR *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Aprovado em: 07/10/2010

Conceito: Excelente

---

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira (Orientador)  
Orientador/UFPA

---

Profa. Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro  
Membro/UFPA

---

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira  
Membro/UFPA

---

Prof. Dr. Flávio Vasconcelos  
Membro/UFPA

---

Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva  
Membro/UFPA

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus queridos pais Liduina e Joaquim pela educação que me deram, a qual é a responsável por todas as conquistas que obtive durante a minha vida.

Aos meus irmãos Patrícia e Pablo que sempre estiveram ao meu lado apoiando minhas decisões.

Ao meu querido sobrinho Joaquim pelos sorrisos que me fazem mais feliz

Aos meus tios e tias que torceram pelo meu sucesso profissional.

Ao meu namorado Alexsandro pelos conselhos e apoio durante toda a realização desta dissertação.

Aos meus amigos do Laboratório de Toxicologia, os quais estiveram comigo nos momentos bons e ruins, ajudando no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores José Maria Vieira e Antônia Rodrigues Vieira pela grande ajuda e apoio antes e durante a realização deste sonho.

## **AGRADECIMENTO**

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

Ao prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira, pela confiança, orientação e ensinamento que contribuíram para o meu crescimento científico e pessoal.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Rosivaldo Borges pela síntese do padrão interno utilizado nesta dissertação

“ Não há coisa impossível ao homem arrastado por uma convicção íntima.”

*Chateaubriand*

## RESUMO

Dentre as ferramentas para alcançar o tratamento ótimo para a malária, se destaca a monitorização das concentrações dos antimaláricos nos fluídos biológicos. Ao se considerar que o Coartem<sup>®</sup> é empregado na terapia de primeira linha para o tratamento da malária falciparum, justifica-se a realização deste estudo que objetivou validar metodologia analítica para determinação de lumefantrina em amostras de sangue total, adsorvidas em papel de filtro, e em plasma, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* não complicada, empregando-se extração líquido-líquido. Foram realizados estudos de seletividade, linearidade, curva de calibração, limites de detecção e quantificação, recuperação, precisão intra e inter-ensaio, estabilidade e robustez. As amostras, para o estudo de aplicabilidade do método proposto, foram coletadas de pacientes com malária falciparum utilizando Coartem<sup>®</sup> (arteméter-20mg + lumefantrina- 120mg) no D3. As condições cromatográficas otimizadas foram: comprimento de onda de 335nm, fluxo 1,2mL/min. e fase móvel composta por acetonitrila-água (60:40, v/v) pH=3,5. A extração líquido-líquido demonstrou ser eficiente, pois a recuperação média foi de 101,3% para plasma e 84,3% para sangue total. O método foi seletivo e linear em intervalo de concentração de 160 a 1760ng/mL. Os limites de detecção e de quantificação foram 32ng/mL e 160ng/mL. O coeficiente de variação médio intra-ensaio, do plasma e sangue total, respectivamente, foram 10,88 e 8,38% e inter-ensaio de 13,21 e 11,78%. O analito demonstrou ser estável em sangue total adsorvido em papel de filtro por até 70 dias. Modificações no pH, fluxo e composição da fase móvel não alteraram significativamente a resolução do analito de interesse, sugerindo uma robustez adequada. O método demonstrou ser eficaz na quantificação de lumefantrina em amostras de sangue total de pacientes com malária falciparum bem como os parâmetros de validação estão de acordo com as recomendações dos órgãos regulamentadores no Brasil.

Palavras-chave: Malária. Lumefantrina. Validação. Monitorização Terapêutica.

## ABSTRACT

Among the tools to achieve the optimal treatment for malaria, it highlights the concentration monitoring of antimalarials in biological fluids. Considering that Coartem® is used in first-line therapy for treatment of falciparum malaria, it is appropriate that this study aims to validate an analytical methodology for determination of lumefantrine in whole blood samples, adsorbed on filter paper, and in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) in patients with falciparum malaria uncomplicated, using liquid-liquid extraction. Were carried out studies of selectivity, linearity, calibration curve, limits of detection and quantification, recovery, intra and inter assay precision, stability and robustness. The samples for study of applicability of the proposed method, were collected from patients with falciparum malaria using Coartem® (artemether-20mg + lumefantrine-120mg) on D3. The optimized chromatographic conditions were: wavelength 335nm, flow 1.2 mL / min. and a mobile phase consisting of acetonitrile-water (60:40, v / v) pH = 3,5. The liquid-liquid extraction can be efficient, because the average recovery was 101.3% for plasma and 84.3% for whole blood. The method was selective and linear in the concentration range of 160 to 1760ng/mL. The limits of detection and quantitation was 32ng/mL and 160ng/mL. The average coefficient of variation intra assay, plasma and whole blood, respectively, were 10.88 and 8.38% and inter assay of 13.21 and 11.78%. The compound proved to be stable in whole blood adsorbed onto filter paper for 70 days. Modification of pH, flow and mobile phase composition did not significantly alter the resolution of the analytes, suggesting an adequate strength. The method proved effective in quantifying lumefantrine in whole blood samples from patients with falciparum malaria and the validation parameters are consistent with the recommendations of regulatory agencies in Brazil.

Keywords: Malaria. Lumefantrine. Validation. Monitoring Therapy.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 -	Distribuição da malária no mundo, 2005.....	21
Figura 02 -	Mapa do Risco de Transmissão da Malária. Brasil, 2007.....	22
Figura 03 -	Proporção de malária por <i>P. falciparum</i> na Amazônia, janeiro de 1999 a agosto de 2008.....	23
Figura 04 -	Casos de malária por <i>P. falciparum</i> , Pará. 2000 a 2009.....	25
Figura 05 -	Esquema do ciclo biológico da malária humana.....	28
Quadro 01-	Manifestações clínicas e laboratoriais da malária grave e complicada causada pela infecção por <i>P. falciparum</i> .....	30
Figura 06	Tendência mundial para adoção de ACTs como primeira linha de tratamento para malária falciparum. ....	36
Quadro 02	Esquema terapêutico de Coartem <sup>®</sup> /Riamet <sup>®</sup> indicado para adultos.....	37
Quadro 03	Esquema terapêutico de Coartem <sup>®</sup> /Riamet <sup>®</sup> indicado para crianças.....	37
Figura 07	Estrutura química da Lumefantrina.....	46
Figura 08	Estrutura química da desbutil-lumefantrina.....	48
Figura 09	Estrutura química do Padrão interno.....	65
Figura 10	Fluxograma do procedimento analítico de extração da lumefantrina em amostras de plasma.....	69
Figura 11	Fluxograma do procedimento analítico de extração em papel de filtro da lumefantrina em amostras de sangue total.....	70

Figura 12	Cromatograma das soluções padrões de LF (1µg/mL) (A) e PI (1µg/mL) (B), segundo condições cromatográficas padronizadas.....	78
Figura 13	Representação gráfica da Linearidade da Lumefantrina.....	81
Figura 14	Representação gráfica da curva de calibração da lumefantrina em plasma....	82
Figura 15	Representação gráfica da curva de calibração da lumefantrina em sangue total adsorvido em papel de filtro.....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Internações hospitalares. Amazônia Legal, janeiro à novembro de 2008 e 2009.....	24
Tabela 02	Parâmetros cromatográficos utilizados para validação da metodologia analítica.....	77
Tabela 03	Tempo de retenção das soluções padrões de LF (1µg/mL) e PI (1µg/mL) segundo condições cromatográficas previamente padronizadas.....	78
Tabela 04	Tempo de retenção dos fármacos de interesse, de acordo com as condições cromatográficas padronizadas para determinação de lumefantrina.....	80
Tabela 05	Linearidade da lumefantrina.....	80
Tabela 06	Curva de calibração da lumefantrina em plasma.....	81
Tabela 07	Curva de calibração da lumefantrina em sangue total.....	81
Tabela 08	Recuperação absoluta da Lumefantrina em plasma e sangue total.....	83
Tabela 09	Precisão intraensaio e interensaio da Lumefantrina em amostras de plasma expressa como coeficiente de variação.....	84
Tabela 10	Precisão intraensaio e interensaio da Lumefantrina em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro, expressa como coeficiente de variação.....	84
Tabela 11	Estudo da estabilidade da lumefantrina.....	85
Tabela 12	Avaliação da robustez do método através de alterações no valor de pH, fluxo e na proporção dos solventes da fase móvel, de acordo com as condições cromatográficas previamente padronizadas.....	86
Tabela 13	Concentrações (ng/mL) de lumefantrina em pacientes com malária falciparum.....	87

## LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACTs	Artemisinin-based Combination Therapies
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18	Grupo octadecil
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CENEPI	Centro Nacional de Epidemiologia
CENSIPAM	Centro Gestor e Operacional do Sistema de Proteção da Amazônia
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Ciano
CV	Coefficiente de Variação
DLF	Desbutil-lumefantrina
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
FMTAM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HDL	High-density lipoprotein
HIV	Human immunodeficiency virus
Kda	Kilodáton
KOH	Hidróxido de potássio
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LF	Lumefantrina
LFac	Lumefantrina acetilada
M	Molar

mg	Miligrama
min.	Minutos
mL	Mililitro
mol/L	Mol/Litro
mm	Milimetro
MS	Ministério da Saúde
ng/mL	nanograma/mililitro
nm	Nanômetro
nM	nanomol
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
pH	Potencial de Hidrogênio
PI	Padrão Interno
r	Coefficiente de correlação de Pearson
RAVREDA	Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas
rpm	rotações por minuto
seg.	Segundos
SAS	Secretaria de Atenção à Saúde
SESAU	Secretaria de Saúde do Estado de Tocantins
SESPA	Secretaria de Saúde do Estado do Pará
SIPAM	Sistema De Proteção Da Amazônia
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
SUSAM	Sistema Único de Saúde do Amazonas
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TA	Temperatura ambiente

UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Ultra-violeta
v/v	volume/volume
WHO	World Health Organization
$\mu\text{M}$	Micromol
$\mu\text{g/mL}$	micrograma/mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
®	Marca Registrada
$\lambda$	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1	EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....	20
2.2	VETORES, AGENTES ETIOLÓGICOS E CICLO BIOLÓGICO DA MALÁRIA HUMANA.....	25
2.3	SINAIS E SINTOMAS DA MALÁRIA POR <i>Plasmodium falciparum</i> .....	29
2.4	QUIMIOTERAPIA DA MALÁRIA.....	30
2.5	RESISTÊNCIA DO <i>P. falciparum</i> AOS ANTIMALÁRICOS.....	32
2.6	COARTEM® NO TRATAMENTO DA MALÁRIA FALCIPARUM NÃO COMPLICADA.....	35
2.7	ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA LUMEFANTRINA.....	45
<b>2.7.1</b>	<b>Estrutura química e propriedades físico-químicas da lumefantrina.....</b>	<b>45</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Farmacocinética da lumefantrina.....</b>	<b>46</b>
<b>2.7.3</b>	<b>Mecanismo de ação da lumefantrina.....</b>	<b>49</b>
<b>2.7.4</b>	<b>Efeitos adversos.....</b>	<b>50</b>
<b>2.7.5</b>	<b>Interação Medicamentosa.....</b>	<b>52</b>
2.8	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	53
2.9	ESTUDOS ENVOLVENDO DETERMINAÇÃO DE LUMEFANTRINA POR CLAE EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	56
2.10	JUSTIFICATIVA.....	60
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
3.1	GERAL.....	61
3.2	ESPECÍFICOS.....	61
<b>4.</b>	<b>MÉTODOLOGIA.....</b>	<b>62</b>

4.1	CASUÍSTICA.....	62
<b>4.1.1</b>	<b>Critérios de Inclusão.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Critérios de Exclusão.....</b>	<b>63</b>
4.2	AMOSTRAS.....	63
4.3	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	63
4.4	REAGENTES E SOLVENTES.....	64
4.5	SÍNTESE DO PADRÃO INTERNO (LUMEFANTRINA ACETILADA).....	64
4.6	SOLUÇÕES-PADRÃO.....	65
<b>4.6.1</b>	<b>Soluções estoque.....</b>	<b>65</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Soluções intermediárias.....</b>	<b>66</b>
<b>4.6.3</b>	<b>Soluções de trabalho.....</b>	<b>66</b>
<b>4.6.4</b>	<b>Padrões de calibração.....</b>	<b>66</b>
4.7	EXTRAÇÃO DA LUMEFANTRINA DAS AMOSTRAS DE PLASMA.....	67
4.8	EXTRAÇÃO DA LUMEFANTRINA DAS AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL ADSORVIDAS EM PAPEL DE FILTRO.....	68
4.9	VALIDAÇÃO ANALÍTICA DOS MÉTODOS.....	71
<b>4.9.1</b>	<b>Otimização das condições cromatográficas.....</b>	<b>71</b>
<b>4.9.2</b>	<b>Parâmetros de desempenho analítico.....</b>	<b>71</b>
<b>4.9.2.1</b>	<b>Seletividade.....</b>	<b>71</b>
<b>4.9.2.2</b>	<b>Linearidade.....</b>	<b>72</b>
<b>4.9.2.3</b>	<b>Curva de calibração.....</b>	<b>72</b>
<b>4.9.2.4</b>	<b>Limite de detecção.....</b>	<b>73</b>
<b>4.9.2.5</b>	<b>Limite de quantificação.....</b>	<b>73</b>
<b>4.9.2.6</b>	<b>Recuperação.....</b>	<b>74</b>



<b>4.9.2.7</b>	<b>Precisão</b> .....	74
<b>4.9.2.8</b>	<b>Estabilidade</b> .....	75
<b>4.9.2.9</b>	<b>Robustez</b> .....	75
4.10	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	75
4.11	ASPECTOS ÉTICOS.....	76
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	77
5.1	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	77
5.2	PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO.....	79
5.2.1	<b>Seletividade</b> .....	79
5.2.2	<b>Linearidade</b> .....	79
5.2.3	<b>Curva de calibração</b> .....	79
5.2.4	<b>Limite de detecção</b> .....	83
5.2.5	<b>Limite de quantificação</b> .....	83
5.2.6	<b>Recuperação absoluta</b> .....	83
5.2.7	<b>Precisão dos métodos</b> .....	84
5.2.8	<b>Estabilidade</b> .....	85
5.2.9	<b>Robustez</b> .....	85
5.2.10	<b>Aplicabilidade do método</b> .....	86
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	88
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	97
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	98
	<b>ANEXOS</b> .....	127

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma enfermidade infecciosa com considerável morbidade e mortalidade e significativo impacto econômico e social (ALRAJHI; FRAYHA, 1997). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009), em 2008 foram registrados 243 milhões de casos de malária em todo o mundo, sendo 85% destes no continente africano, seguido de 10% no sudeste asiático e 4% nas regiões do mediterrâneo oriental. No Brasil, a doença é causada principalmente pelo *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, sendo o último responsável pelo maior número de casos, enquanto o primeiro pelos mais graves (WHO, 2008).

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

No intuito de evitar a resistência ao *P. falciparum*, novos fármacos estão sendo testados em todo o mundo, dentre estes o Coartem<sup>®</sup> (Novartis<sup>®</sup> Pharmaceutical), uma combinação que já foi aprovada para uso em mais de 80 países (JORNAL GAZETA MERCANTIL, 2008). Tornou-se em 2006, a associação empregada pelo Ministério da Saúde do Brasil para o tratamento da malária falciparum (BRASIL/SUSAM, 2006). É bem tolerado, de ação rápida e eficaz em crianças e adultos (HATZ et al., 1998), atuando contra os esquizontes sanguíneos, nos casos de malária falciparum não grave, resistente aos outros antimaláricos. Combina elevada e rápida redução da parasitemia devido ao arteméter (derivado

da artemisinina) e subsequente remoção dos parasitas viáveis através da ação lenta da lumefantrina (LF) (NTALE et al., 2008).

A lumefantrina é um aril amino álcool sintetizado em 1970 pela Academia Militar de Ciências Médicas de Beijing. É um composto inodoro, amarelo, pouco solúvel na água, óleos e em muitos solventes orgânicos (MANSOR et al.,1996; COLUSSI et al., 1999; BLESSBORN et al. ,2007; NTALE et al., 2008). Estudos preliminares das propriedades farmacocinéticas da LF foram relacionados aquelas da halofantrina, pela similaridade química estrutural. A absorção do fármaco é variável, sendo amplamente influenciada pela ingestão de alimentos. A meia-vida de absorção é cerca de duas horas. A biodisponibilidade aumenta consideravelmente com o peso do paciente, apresenta elevado volume aparente de distribuição e meia-vida de eliminação estimada entre quatro a cinco dias (COLUSSI et al., 1999).

Com o objetivo de estimar a magnitude e a distribuição da farmacoresistência dos parasitas da malária aos medicamentos atualmente disponíveis, foi criada em 2001 a Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas (RAVREDA), que visa monitorar o tratamento dos pacientes e avaliar a eficácia das drogas utilizadas (BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI, 2005).

Dentre as diversas estratégias de ação propostas pela RAVREDA, se destaca a monitorização das concentrações sanguíneas dos antimaláricos em uso atualmente. E ao se considerar que a malária é característica das áreas rurais, distantes dos laboratórios especializados, torna-se imprescindível a adoção de procedimentos alternativos de acondicionamento das amostras biológicas para monitorização, como a utilização de papel de filtro para adsorção, secagem e transporte aos laboratórios analíticos. Entretanto, o pequeno

volume de material biológico, reflete importante questão metodológica, quer seja a necessidade de técnicas analíticas de elevada sensibilidade, como a cromatografia líquida de alta eficiência empregando detectores de ultravioleta ou fluorescência (PATCHEN et al., 1983; BLESSBORN et al., 2007; NTALE et al., 2008).

Neste sentido, alguns métodos usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para determinação de lumefantrina em plasma e sangue total, têm sido publicados (ZENG et al., 1996 ; MANSOR et al., 1996; ANNERBERG et al., 2005; LINDEGARDH et al., 2005; BLESSBORN et al., 2007; NTALE et al., 2008; HUANG et al., 2010), entretanto os dados são limitados quando as amostras biológicas estão adsorvidas em papel de filtro (NTALE et al., 2008).

O procedimento analítico recomendado atualmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS), para a extração de lumefantrina das amostras biológicas, envolve o uso de colunas extratoras, encarecendo os custos analíticos, indisponibilizando a análise na maioria dos laboratórios dos países nos quais a doença é endêmica (BLESSBORN et al., 2007). Portanto, justifica-se a validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção no ultravioleta, após prévia extração líquido-líquido, reduzindo os custos analíticos, permitindo a difusão da monitorização terapêutica do fármaco, o estabelecimento dos padrões cinéticos em diferentes grupos populacionais e o melhor entendimento das falhas terapêuticas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

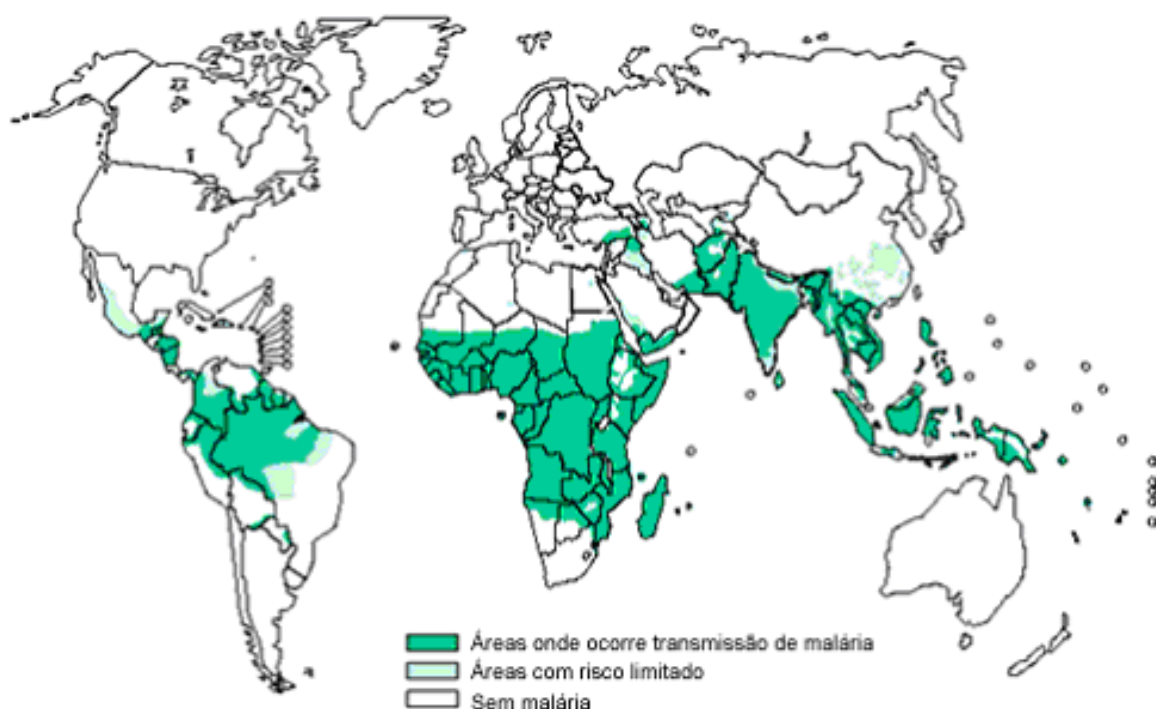
### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

A malária é uma das doenças parasitárias mais severas do mundo, representando grave problema de saúde pública pela alta incidência e elevadas taxas de morbidade e mortalidade (GREENWOOD et al., 2005). Reduz a frequência e produtividade no trabalho, podendo prejudicar o desenvolvimento intelectual das crianças em idade escolar. Acarreta efeito negativo na nutrição e nas infecções presentes na população, tal como naqueles com HIV. Além disso, nas grávidas que moram nas áreas endêmicas, a doença é responsável por um quarto dos casos de anemia materna grave (STEKETEE et al., 2001; FERNANDO et al, 2003; SUH; KAIN; KEYSTONE, 2004).

O termo malária é derivado do italiano “mal’aria”, que significa “mau ar”, esta denominação surgiu a partir da associação da doença com áreas pantanosas (TUTEJA, 2007). Hipócrates relacionou as manifestações clínicas com as estações do ano e os locais onde os doentes habitavam ou freqüentavam. Atualmente sabe-se que alterações climáticas globais podem causar aumento no número de casos da doença, haja vista que é uma enfermidade transmitida por mosquitos, nos quais a temperatura e umidade do ambiente favorecem o desenvolvimento dos plasmódios (BRUCE-CHWATT, 1980; GREENWOOD et al., 2005).

A doença está presente nas regiões tropical e subtropical do planeta (figura 01). Em 2008 a malária foi endêmica em 108 países, dos quais 43 localizados na África, ocorrendo 863.000 mortes, sendo que 89% destas no continente africano, seguido de 6% no mediterrâneo oriental e 5% no sudeste asiático (WHO, 2008; WHO, 2009).

Foram confirmados 306.908 casos de malária no Brasil no ano de 2009, sendo que a região Sul apresentou o menor número (95), ficando o Centro-oeste em terceiro lugar (3.365), o Nordeste em segundo (5.800) e em primeiro, o Norte (297.384), o qual concentra 99,9% dos casos da doença no país (figura 02) (BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2009).

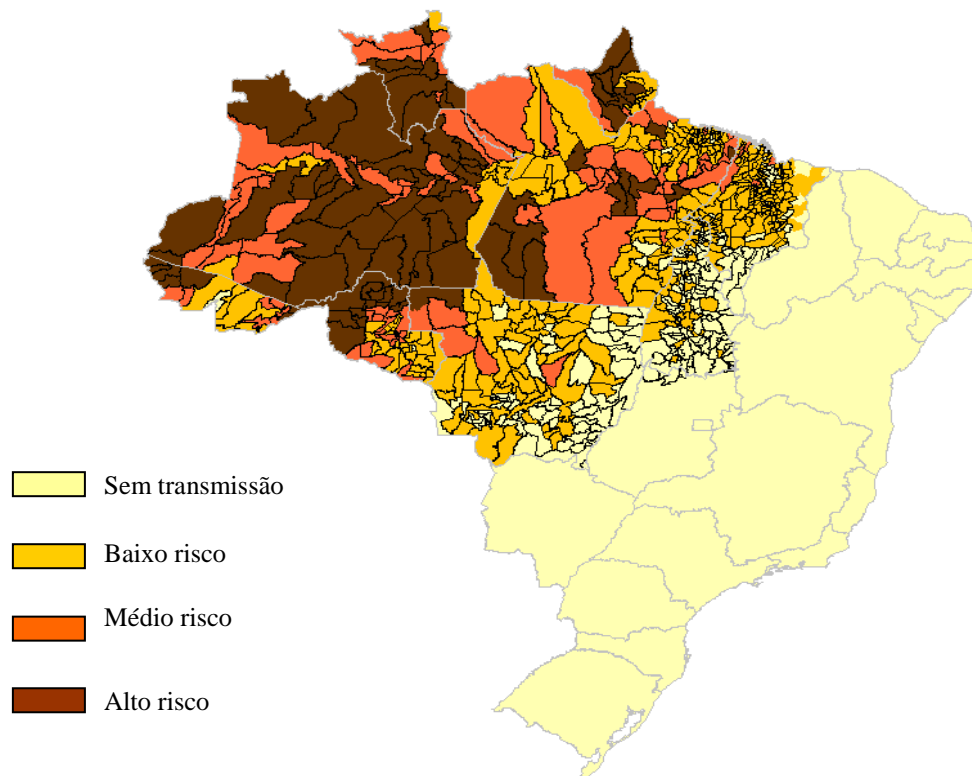


**Figura 01:** Distribuição da malária no mundo, 2005.

Fonte: WHO, 2006a

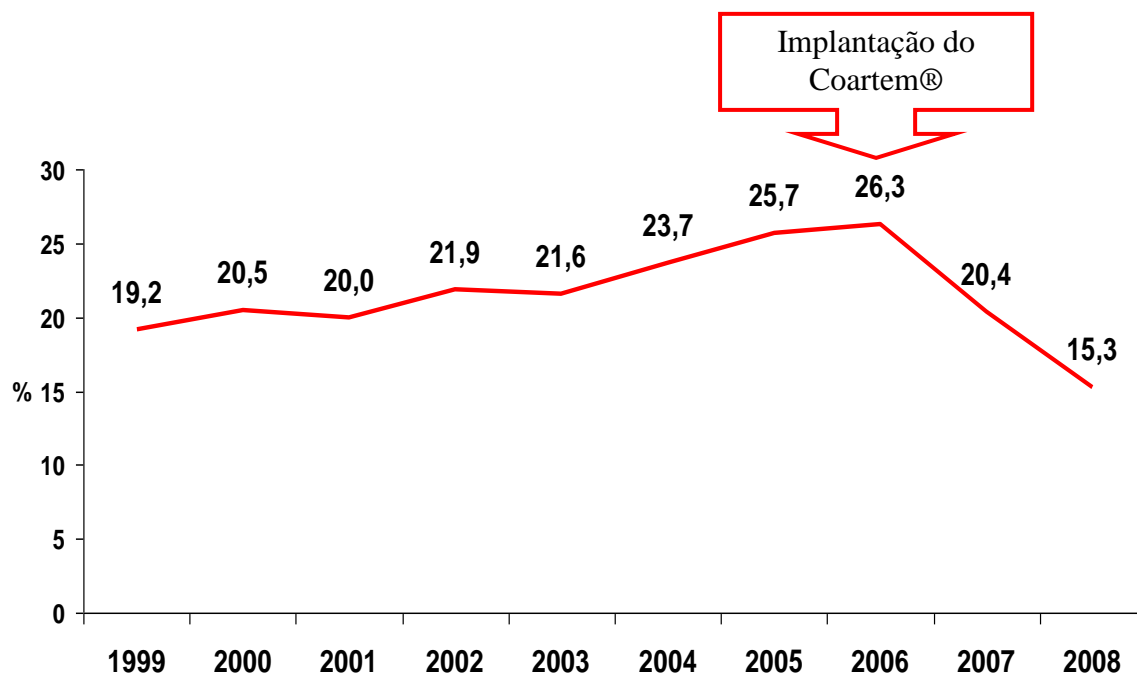
No ano de 2008, foram notificados 314.754 casos da doença na Amazônia legal, já em 2009 foram registrados 304.233 casos, no mesmo período, com redução de 3,3%. (BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2008; BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2009). Nesta mesma região, em 17 anos (1990 a 2007), houve redução de 160 para 82 no número de municípios de alto risco, isto é, cuja incidência é superior a 49,9 casos por 1.000 habitantes, representando decréscimo total de 48,8% (BRASIL/SESPA, 2008).

Ao considerar as espécies transmissoras da malária no Brasil, percebe-se o predomínio das infecções pelo *P. vivax*, havendo redução nos casos de malária por *P. falciparum* em praticamente todos os Estados. Na Amazônia legal o percentual passou de 20,4% em 2007 para 15,3% em 2008 (figura 03), contudo, no ano de 2009, houve um discreto aumento neste valor para 16,5%. (BRASIL/MS/SVS /SIVEP, 2008; BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2009). Na região Norte, os dois Estados que apresentam maior número de casos de malária falciparum na Amazônia legal são o Pará (99.531) e Amazonas (98.869), sendo que o primeiro apresentou 16,6% em 2008 e 22,6% em 2009. Já o Amazonas apresentou 15,1% em 2008 e 12,7% em 2009. (BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2009).



**Figura 02:** Mapa do Risco de Transmissão da Malária. Brasil, 2007

Fonte: BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2008



**Figura 03:** Proporção de malária por *P. falciparum* na Amazônia, janeiro de 1999 a agosto de 2008.

Fonte: BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2008

Tal cenário pode ser parcialmente atribuído à introdução dos derivados da artemisinina como tratamento de primeira escolha da malária por *P. Falciparum*. Outros fatores de destaque foram: o impacto das ações dos órgãos de saúde pública através da expansão da rede de diagnóstico e do tratamento oportuno e adequado dos pacientes (BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2008; BRASIL/CENSIPAM/SIPAM, 2008).

Há alguns anos tem-se registrado diminuição das internações hospitalares resultantes das complicações da malária em todos os Estados da Amazônia legal (de janeiro a maio de 2008 foram registradas 1.576 internações, enquanto no mesmo período de 2007 ocorreram 2.910, representando uma redução de 45,8%), resultando na economia de 6,8 milhões de reais. (BRASIL/SESPA, 2008; BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2009). Contudo, de janeiro a novembro de 2009, houve aumento das internações em praticamente todos os Estados da região, como mostra a tabela 01.

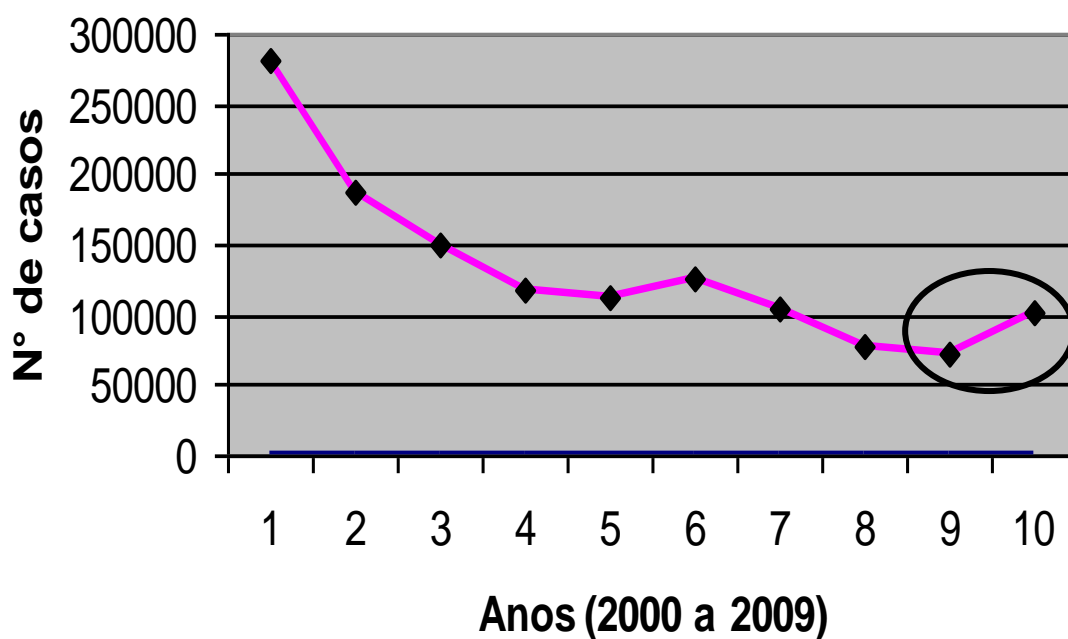


**TABELA 01:** Internações hospitalares. Amazônia Legal, janeiro à novembro de 2008 e 2009.

<b>Estados</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>
Rondônia	544	629
Acre	544	567
Amazonas	740	580
Roraima	257	301
Pará	781	1.167
Amapá	142	175
Tocantins	41	30
Maranhão	127	164
Mato Grosso	126	149
<b>Total</b>	<b>3.302</b>	<b>3.762</b>

Fonte: BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2009

Há anos o número de casos da doença vinha reduzindo no estado do Pará, contudo em 2009 houve aumento tanto do número de casos de malária (figura 04) quanto das internações (tabela 01) (BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2009). Em contrapartida, o Estado do Amazonas vem obtendo bons resultados comparando-se os anos de 2008 e 2009.



**FIGURA 04:** Casos de malária, Pará. 2000 a 2009.

Fonte: Adaptado de BRASIL/MS/SVS/SIVEP, 2009

## 2.2 VETORES, AGENTES ETIOLÓGICOS E CICLO BIOLÓGICO DA MALÁRIA HUMANA

Os vetores da malária humana são mosquitos pertencentes ao filo Artropoda, classe Insecta, ordem Díptera, família Culicidae e gênero *Anopheles*, que compreende cerca de 430 espécies, das quais, apenas 60 são vetores da malária em condições naturais e 30 destas são de grande importância, destacando-se o *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, comuns na Amazônia Brasileira. O êxito para o desenvolvimento do parasita da malária no mosquito depende de vários fatores, destacando-se a temperatura e a umidade (REY, 1992; CDC, 2004; SUH; KAIN; KEYSTONE, 2004; TUTEJA, 2007; BRASIL/MS/SVS, 2010).

Os protozoários unicelulares causadores da malária pertencem ao Filo Apicomplexa, Ordem Eucoccidiida, Subordem Haemosporinae, Família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*. Quatro, de aproximadamente 100 espécies que infectam aves, répteis e outros mamíferos, infectam o homem, a saber: *P. falciparum*; *P. vivax*; *P. ovale* e *P. malariae* (GOMES, 2006; FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). Recentemente foi sugerido que o *Plasmodium Knowlesi* pode infectar os seres humanos. (HORTELANO et al., 2008).

Estas quatro espécies apresentam diferenças morfológicas e imunológicas, distinta distribuição geográfica, padrões de recaídas e respostas aos fármacos antimaláricos. O *P. falciparum* é o responsável pela malária grave e potencialmente fatal, sendo o principal causador de mortes nas crianças africanas. O *P. ovale* é pouco comum, e sua distribuição é restrita a África Ocidental, enquanto *P. malariae* é encontrado em todo o mundo, contudo com baixa frequência. O *P. vivax* é o mais difundido, entretanto a infecção raramente é fatal. (SNOW; KORENKROMP; GOUWS, 2004; TUTEJA, 2007)

O ciclo do *Plasmodium* (figura 05) ocorre em dois hospedeiros, um intermediário (vertebrado), onde há reprodução por esquizogonia e o desenvolvimento das formas assexuadas, e o outro definitivo (invertebrado), onde ocorre a reprodução sexuada do tipo esporogonia. Em ambos, o ciclo de vida do *Plasmodium* é bastante complexo, requer a expressão de proteínas especializadas para a sobrevivência intra e extracelular do parasita. (SACHS; MALANEY, 2002; MOORE; SURGEY; CADWGAN, 2002; TUTEJA, 2007).

A infecção em humanos começa com a inoculação, durante a hematofagia, dos esporozoítos presentes nas glândulas salivares da fêmea infectada do mosquito, os quais são

transportados pela corrente sanguínea e rapidamente penetram nos hepatócitos. Neste estágio o parasita está recoberto pela proteína circunsporozoíto (CS) e pela proteína adesiva relacionada com a trombospondina (TRAP), responsáveis por mediar o processo de invasão nos hepatócitos e a formação do vacúolo parasitóforo. (MILLER et al., 2002; NUNES; FERREIRA, 2005; PRUDENCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006).

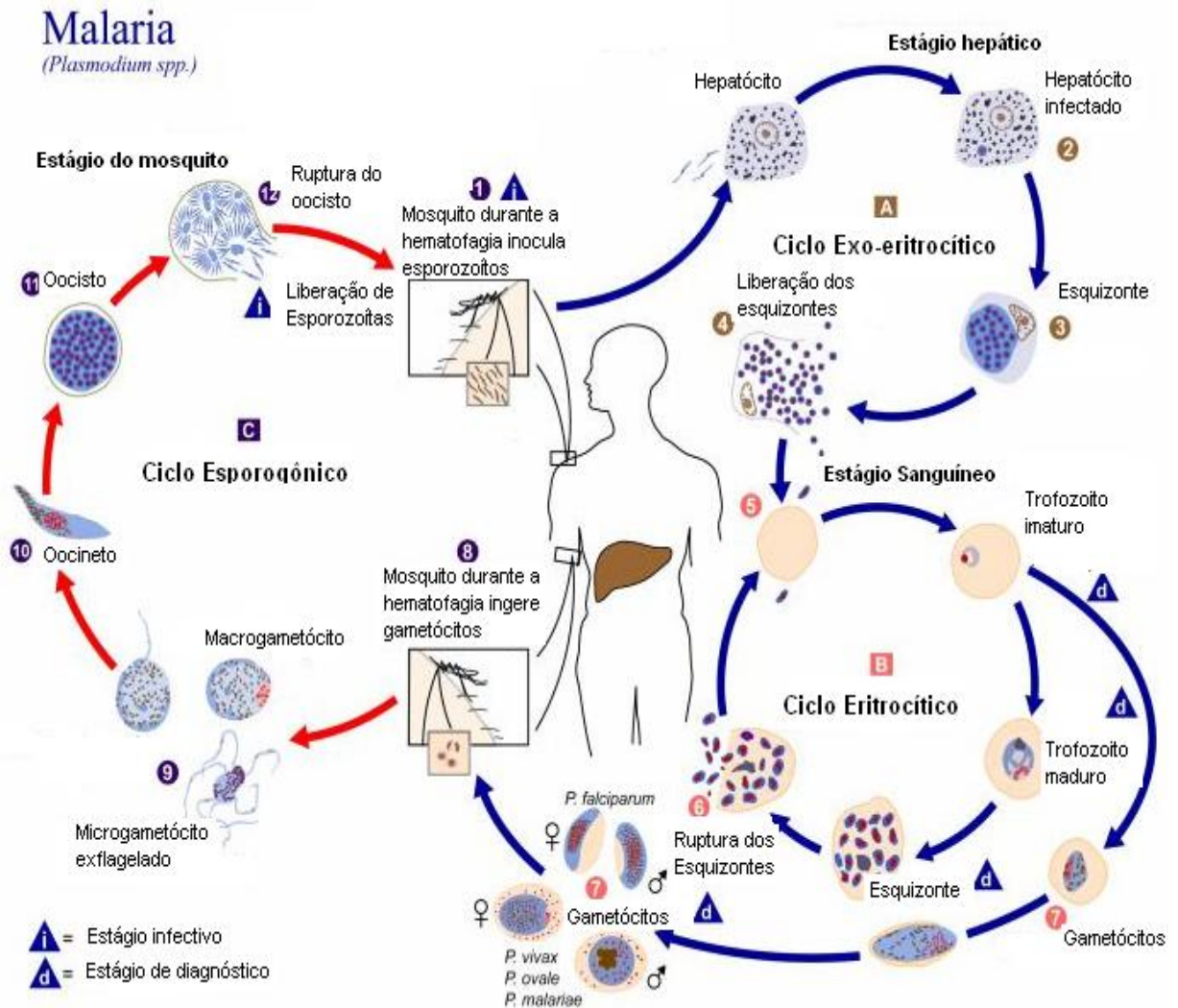
No fígado o *P. falciparum* permanece por 9 a 16 dias, iniciando uma fase de divisão assexuada (esquizogonia), originando os esquizontes teciduais, que em seguida se rompem e liberam milhares de merozoítos que invadem os eritrócitos (TUTEJA, 2007; FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). O tempo para completar a esquizogonia varia de acordo com a espécie infectante (de oito a 25 dias para *P. falciparum*; de oito a 27 para *P. vivax*; de nove a 17 para *P. ovale* e de 15 a 30 dias para *P. malariae*) (TUTEJA, 2007).

A invasão das hemácias pelos merozoítos é um processo complexo que pode ser dividido em quatro fases: reconhecimento inicial e fixação reversível do merozoíto à membrana eritrocitária; reorientação e formação de uma junção entre o ápice do merozoíto e a membrana celular, além da liberação de substâncias, levando a formação de um vacúolo; invaginação da membrana do eritrócito em torno do parasita acompanhada pela remoção da superfície de revestimento do mesmo e restabelecimento do vacúolo e das membranas do eritrócito após término do processo (MILLER et al., 2002).

Durante a permanência dos merozoítos nas hemácias há um intenso metabolismo, tal como glicólise, ingestão de citoplasma do hospedeiro e proteólise da hemoglobina. O parasita não degrada o heme em subprodutos, pois este estando livre é tóxico para ele.

Portanto, durante a degradação da hemoglobina, o heme liberado é polimerizado em hemozoína (pigmento malárico). (MILLER et al., 2002).

Os merozoítos se dividem por esquizogonia eritrocitária e sofrem maturações com morfologia distinta, tais como: formas em anel, trofozoítos e esquizontes. Há ruptura da célula invadida e liberação de algumas dezenas de novos merozoítos. Neste ínterim, há diferenciação dos gametócitos, que são a forma infectante para o vetor *Anopheles* (NUNES; FERREIRA, 2005; CDC, 2006a).



**Figura 05:** Esquema do ciclo biológico da malária humana

Fonte: Adaptado de [http://www.cdc.gov/malaria/biology/life\\_cycle.htm](http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm). Acesso, março de 2009

### 2.3 SINAIS E SINTOMAS DA MALÁRIA POR *Plasmodium falciparum*

A malária causada pelo *P. falciparum* produz enfermidade mais grave e com maior mortalidade. O período de incubação varia de oito a 12 dias, apresentando como sintomas iniciais e inespecíficos: mal-estar, cefaléia, náuseas, vômitos e mialgias, que geralmente precedem à clássica febre da malária. (HORTELANO et al., 2008; BRASIL/MS/SAS, 2008).

O paroxismo se inicia com calafrio que dura de 15 minutos até uma hora, sendo seguido por uma fase febril, com temperatura corpórea podendo atingir 41°C ou mais. Após um período de duas a seis horas, ocorre defervescência e o paciente apresenta sudorese profusa e fraqueza intensa. Após a fase inicial, a febre assume um caráter intermitente, que depende da duração do ciclo eritrocítico, que no caso do *P. falciparum* é de 48 horas. (BRASIL/MS/SAS, 2008).

O quadro clínico da malária pode ser leve, moderado ou grave, na dependência da espécie e quantidade de parasitas circulantes, do tempo de doença e da imunidade do paciente. As gestantes, as crianças e os primoinfectados estão sujeitos a maior gravidade. (BRASIL/MS/SVS, 2010).

Os acessos na malária falciparum não complicada são caracterizados por debilidade física, febre, náuseas e vômitos. Ao exame físico, o paciente apresenta-se pálido e com baço palpável. Os indivíduos mais sucessíveis podem apresentar a forma complicada, que é caracterizada por hipoglicemia e demais sinais e sintomas (quadro 01), os quais são indicadores de prognóstico desfavorável. (BRASIL/MS/FUNASA, 2001; CDC, 2006a;

BRASIL/MS/SVS, 2010). Duas características são responsáveis pela severidade e patogênese da malária por *P. falciparum*, quer sejam: a habilidade para invadir eritrócitos de todas as idades, causando parasitemia elevada, e a capacidade dos eritrócitos infectados aderirem ao endotélio vascular, o que pode causar a malária cerebral. (HEDDINI, 2002).

<b>Sinais e Sintomas</b>	Prostração Alteração da consciência Dispnéia ou hiperventilação Convulsões Hipotensão arterial ou choque Edema pulmonar ao Rx de tórax Hemorragias Icterícia Hemoglobinúria Hiperpirexia (>41°C) Oligúria
<b>Alterações Laboratoriais</b>	Anemia grave Hipoglicemia Acidose metabólica Insuficiência renal Hiperlactatemia Hiperparasitemia

**Quadro 01:** Manifestações clínicas e laboratoriais da malária grave e complicada, causada pela infecção por *P. falciparum*

Fonte: BRASIL/MS/SVS, 2010

## 2.4 QUIMIOTERAPIA DA MALÁRIA

Diversas substâncias têm sido utilizadas no tratamento da malária ao longo do tempo. Antes da era Cristã, os chineses tratavam a doença com *Chang shan*, uma preparação da raiz pulverizada de *Dichroa febrifuga*. Antes da chegada dos europeus ao continente americano, os índios peruanos usavam a casca da quina. Em 1820, os químicos franceses Pelletier e Caventou isolaram a substância ativa da casca desta planta, o alcalóide quinina, cujo

primeiro relato da resistência do *P. falciparum* a este composto foi feito por Neiva em 1910 (SILVA, 1997; VALE; MOREIRA; GOMES, 2005).

O desenvolvimento dos fármacos antimaláricos associou-se inicialmente as observações de Ehrlich sobre o azul de metileno, que inibe a glutatona-redutase do *P. falciparum* (SILVA, 1997; VALE; MOREIRA; GOMES, 2005). Entre 1920 e 1930, Schuleman e colaboradores sintetizaram a pamaquina a partir do azul de metileno. A seguir, foram obtidas a mepacrina, santoquina e resorquina (SILVA, 1997). Durante a segunda guerra mundial houve maior incentivo para o desenvolvimento de novos antimaláricos, tendo sido sintetizados a amodiaquina, primaquina, proguanil, pirimetamina e cloroquina (CUNICO et al., 2008).

A última, já havia sido sintetizada pelos alemães na década de 1930, tornando-se então o fármaco de primeira escolha para o tratamento da malária, devido seu baixo custo e segurança. Entretanto, durante a guerra do Vietnã, vários soldados americanos apresentaram resistência à cloroquina, o que levou a adição da dapsona a quimioprevenção e da associação pirimetamina/sulfadoxina para o tratamento da malária (CUNICO et al., 2008). Contudo, a resistência a pirimetamina se desenvolveu rapidamente, bem como foi observada resistência cruzada com o proguanil (SILVA, 1997).

O surgimento da resistência as 4-aminoquinoleínas e outros compostos, revelou a relativa pobreza do arsenal terapêutico, estimulando o governo dos Estados Unidos a desenvolver um programa de síntese de novos antimaláricos, cujos fármacos mais promissores foram a mefloquina, que passou, com o decorrer dos anos, a ser largamente utilizada em diversos países, e em menor escala a halofantrina (SILVA, 1997; SILVA et al., 2005).



Atualmente estão sendo utilizados os derivados da artemisinina (*qinghaosu*), extraída no início dos anos 70, da planta chinesa *qinghao* (*Artemisia annua* L.), sendo que esta já era utilizada há séculos pela medicina chinesa (Ge Hong no ano de 340 e Li Shizhen em 1596 recomendavam a ingestão da infusão aquosa da planta para o alívio da febre da malária). Dentre os derivados da artemisinina, se destacam o artesunato de sódio, a dihidroartemisinina, o arteéter e o arteméter, os quais foram introduzidos no Brasil a partir da década de 90 (KLAYMAN et al.,1984; HIEN; WHITE, 1993). Os antimaláricos distribuídos atualmente pelo Ministério da Saúde do Brasil para uso rotineiro são: cloroquina, primaquina, mefloquina, quinina, doxiciclina, artesunato e recentemente o Coartem<sup>®</sup> (NUNES; FERREIRA, 2005).

## 2.5 RESISTÊNCIA DO *P. falciparum* AOS ANTIMALÁRICOS

Esforços para o controle da malária estão sendo empreendidos em diversos países tropicais, contudo, em muitos deles, os objetivos não estão sendo alcançados devido à seleção e disseminação de cepas de parasitas resistentes aos antimaláricos atualmente disponíveis (EKLAND; FIDOCK, 2008). Portanto, a virulência do *P. falciparum* associada ao desenvolvimento da resistência, descrita a partir de 1940, permitem caracterizá-lo como a espécie de plasmódio humano que representa importante ameaça à saúde pública global (WINSTANLEY; WARD; SNOW, 2002; FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Segundo White (2004), a probabilidade da seleção de parasitas resistentes aos fármacos antimaláricos é determinada pelos seguintes fatores: a frequência de surgimento do fenômeno, a parasitemia, a concentração plasmática do antimalárico, o mecanismo de ação do fármaco quando o parasita é exposto e a imunidade do hospedeiro.

O uso inadequado, geralmente através da automedicação e/ou a administração de fármacos de baixa qualidade, também contribuem para o surgimento de resistência, uma vez que pode expor o parasita as concentrações subterapêuticas (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). Soma-se, na maioria dos países endêmicos, o acesso restrito ao saneamento básico, as dificuldades financeiras e o tratamento da malária sem confirmação parasitológica (MAY; MEYER, 2003).

As alterações genéticas que conferem resistência aos parasitas estão associadas às mutações que codificam ou estão relacionadas com o alvo do fármaco, afetando a eficácia do medicamento. Múltiplas alterações ou um único evento podem ser suficientes para a resistência. Um exemplo é o surgimento de *P. falciparum* resistente à cloroquina, no final dos anos 50 no sudeste asiático e na América do Sul, que foi atribuído a mutações do gene que codifica o transportador T 76 (MAY; MEYER, 2003; WHITE, 2004; FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A resistência à cloroquina emergiu em 1957, no Camboja, de forma lenta após longa utilização clínica. No Nepal, foram detectados altos níveis de resistência a este fármaco, resultando na mudança da terapia de primeira linha para sulfadoxina-pirimetamina em 1989, mas alguns estudos sugerem que já há resistência a este tratamento, a qual varia de 56% a 87% (RONN et al., 1996; HASTINGS, 2001; WINSTANLEY; WARD; SNOW, 2002; MAY; MEYER, 2003; THAPA et al., 2007).

A resistência à mefloquina e halofantrina foi associada à mutação no gene *pfmdr* (MAY; MEYER, 2003). Fato corroborado por Price et al. (2004) ao observarem que os

pacientes com cepas de *P. falciparum*, que possuíam aumento no número de cópias do gene *pfmdr*, apresentavam maior risco de falha no tratamento.

No Brasil há relatos de resistência aos diversos fármacos indicados para o tratamento da malária não complicada. Na Amazônia ocidental, em 1983, foram caracterizadas cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, amodiaquina e à sulfadoxina-pirimetamina (SILVA, 1997; NUNES; FERREIRA, 2005). Atualmente todos os isolados de *P. falciparum* da Amazônia brasileira apresentam mutações que conferem resistência à cloroquina. Quanto aos demais fármacos, há relato de diminuição da sensibilidade a quinina e ao artesunato (NUNES; FERREIRA, 2005).

Diversos estudos avaliam atualmente a sensibilidade *in vitro* do *Plasmodium falciparum* aos novos antimaláricos, Wong et al. (2010) avaliaram oito fármacos: cloroquina, amodiaquina, piperaquina, nafitoquina, mefloquina, lumefantrina, dihidroartemisinina e azitromicina. As cepas mostraram-se resistentes a cloroquina (82%), mas não as drogas que são administradas em combinação (ACTs). Nsohya et al. (2010) também avaliaram a sensibilidade *in vitro* de antimaláricos (cloroquina, monodesetilamodiaquina, quinina, dihidroartemisinina, lumefantrina e piperaquina) contra *P. falciparum*. Seus dados corroboram com o estudo de Wong et al. (2010), com maior resistência aos fármacos mais antigos (os três primeiros) e boa atividade dos três últimos. A mutação *pfmdr* 1 86Y foi mais comum nos parasitas resistentes a cloroquina e monodesetilamodiaquina e a mutação D1 246Y *pfmdr* 1 foi significativamente mais comum nos parasitas que eram mais resistentes à quinina e monodesetilamodiaquina.

## 2.6 COARTEM<sup>®</sup> NO TRATAMENTO DA MALÁRIA FALCIPARUM NÃO COMPLICADA

Com a intensificação da resistência aos antimaláricos, a procura por novas estruturas químicas efetivas contra o parasita e segura para os pacientes ganhou impulso em vários países. Atualmente o tratamento da malária tem sido baseado na combinação dos derivados da artemisinina (ACTs), que são frequentemente mais efetivos que a monoterapia, apresentando menores efeitos adversos e reduzido tempo de tratamento (CUNICO et al., 2008).

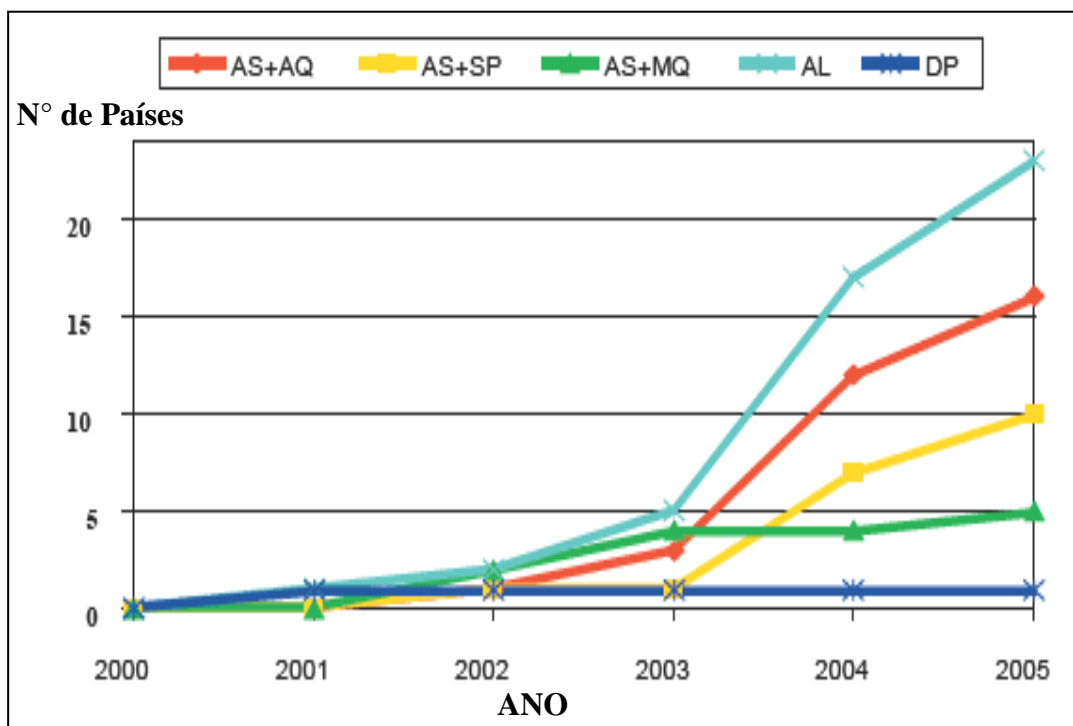
ACTs oferecem novas possibilidades terapêuticas, com diversos estudos em andamento em todo o mundo, tendo a sua eficácia sido demonstrada em vários deles (ELAMIN et al., 2009; ASSEFA et al., 2010; FAYE et al., 2010). Recentemente a OMS anunciou que os antimaláricos devem ter eficácia superior a 95% avaliada ao longo de 28 dias de acompanhamento, e que o tratamento deve ser restrito a alguns comprimidos administrados em dose única ou por curto período. (SAGARA et al., 2009).

Algumas ACTs já estão em uso clínico, como é o caso do co-arteméter (Coartem<sup>®</sup>/Riamet<sup>®</sup>), recomendado pela OMS nos países que apresentam casos de resistência a monoterapia convencional (WHO, 2006b; BLESSBORN et al., 2007). A figura 06 mostra o aumento no número de países que estão aderindo, a cada ano, aos esquemas terapêuticos antimaláricos envolvendo ACTs.

Coartem<sup>®</sup> é uma combinação fixa de arteméter (20mg) e lumefantrina (120mg), desenvolvida na China e produzida atualmente na Suíça pela Novartis<sup>®</sup>. As duas substâncias atuam de maneira sinérgica, na qual o arteméter reduz rapidamente a parasitemia (minimizando

os sintomas) e a lumefantrina, devido à longa ação, elimina os parasitas residuais. É indicado para adultos e crianças com malária falciparum aguda não complicada ou infecção mista que inclua *P. falciparum* (WHITE, 1997; COLUSSI et al., 1999; NOVARTIS, 1999; EZZET et al., 2000; OMARI; GAMBLE; GARNER, 2004; ASHLEY et al., 2007a).

A padronização dos esquemas terapêuticos (quadros 02 e 03) foi estabelecida através de estudos de cinética e dinâmica dos dois fármacos, bem como da observação dos efeitos adversos tanto em voluntários saudáveis, quanto nos pacientes com malária.



AS+AQ: Artesunato+Amodiaquina; AS+MQ: Artesunato+Mefloquina  
 AS+SP: Artesunato+Sulfadoxina/Pirimetamina; AL: Arteméter/Lumefantrina;  
 DP: Dihidroartemisinina/Piperquina

**Figura 06:** Tendência mundial para adoção de ACTs como primeira linha de tratamento para malária falciparum.

Fonte: Adaptado de WHO, 2006b

<b>Tratamento</b>	<b>Dose única inicial logo após diagnóstico</b>	<b>Doses restantes</b>	<b>Total de comprimidos administrados</b>
Em áreas sem resistência	4 comprimidos	4 comprimidos as 8, 24 e 48 hs após o início do tratamento	16
Em áreas com resistência	4 comprimidos	4 comprimidos as 8,24,36,48 e 60 hs após o início do tratamento	24

**Quadro 02:** Esquema terapêutico de Coartem<sup>®</sup>/Riamet<sup>®</sup> indicado para adultos

Fonte: Adaptado de Novartis<sup>®</sup> Pharmaceutical, 1999 e 2008.

<b>Tratamento</b>	<b>Peso</b>	<b>Dose única inicial logo após diagnóstico</b>	<b>Doses restantes</b>	<b>Total de comprimidos administrados</b>
Em áreas sem resistência	5 a 14 kg	1 comprimido	1 comprimido as 8, 24 e 48 hs após o início do tratamento	4
	15 a 24 kg	2 comprimidos	2 comprimidos as 8, 24 e 48hs após o início do tratamento	8
	25 a 35 kg	3 comprimidos	3 comprimidos as 8, 24 e 48hs após início do tratamento	12
Em áreas com resistência	10 a 14 kg	1 comprimido	1 comprimido após 8 hs e duas vezes ao dia durante 2 dias	6
	15 a 24 kg	2 comprimidos	2 comprimidos após 8hs e duas vezes ao dia durante 2 dias	12
	25 a 35 kg	3 comprimidos	3 comprimidos após 8 hs duas vezes ao dia durante 2 dias	18

**Quadro 03:** Esquema terapêutico de Coartem<sup>®</sup>/Riamet<sup>®</sup> indicado para crianças

Fonte: Adaptado de Novartis<sup>®</sup> Pharmaceutical, 1999 e 2008.

Ezzet, Mull e Karbwang (1998), Van Vugt et al. (1999)(a), Ezzet et al. (2000) e Mueller et al. (2006) realizaram estudos randomizados envolvendo pacientes com malária falciparum não grave, com três esquemas diferentes, todos empregando quatro comprimidos de Coartem<sup>®</sup> (20mg/120mg) por dose: quatro doses em três dias, seis doses em três dias e seis doses em cinco dias. Nos três casos observou-se que a resposta terapêutica foi similar, contudo a porcentagem de cura após 28 dias de tratamento foi maior para os esquemas de seis doses.

O excelente resultado clínico obtido com três dias de terapia no estudo de Van Vugt et al. (1998), os quais demonstraram que esta combinação foi mais efetiva e melhor tolerada quando comparada ao artesunato-mefloquina nas áreas de resistência a multi-drogas, impulsionou sua disseminação. Tal achado foi corroborado por Toovery (2008) em estudo realizado em Moçambique ao demonstrar que a combinação arteméter-lumefantrina foi efetiva quando utilizada em pacientes não graves, bem como impediu a recrudescência da doença.

Ashley et al. (2007)(a) compararam dois esquemas de Coartem<sup>®</sup> 20mg/120mg: um com seis doses (4 comprimidos no início do tratamento e quatro as 8, 24, 36, 48 e 60 horas após o início do esquema) com outro de três doses, também com quatro comprimidos por dose, mas administrado uma vez ao dia (0, 24 e 48 horas após o diagnóstico) e observaram que o último esquema não é viável, pois a biodisponibilidade da LF foi insuficiente para alcançar a concentração inibitória mínima.

Elamin et al. (2009) realizaram estudo descritivo sobre a eficácia do Coartem<sup>®</sup> no Sudão. Foram recrutados 291 pacientes com malária falciparum que foram acompanhados por 28 dias; A resposta clínica e parasitológica adequada foi observada em 99,4% dos pacientes.

Efeitos adversos brandos e reversíveis foram relatados por 3,8%, logo, mostrou-se que este regime é eficaz e seguro.

Assefa et al. (2010) avaliaram o efeito terapêutico da associação arteméter-lumefantrina em 90 pacientes com malária falciparum na Etiópia. Observou-se que 100% das crianças com menos de cinco anos e 97,4% entre cinco e quatorze anos apresentaram resposta clínica e parasitológica adequadas. Não houve falha precoce em todas as faixas etárias, 72,5% dos gametócitos foram eliminados no primeiro dia de tratamento, com clareamento total no sétimo dia. Os autores concluíram que o Coartem® tem excelente eficácia terapêutica, no entanto, a distribuição e absorção dos fármacos precisam de melhor avaliação.

Van Den Broek et al. (2005) em estudo randomizado com 364 pacientes portadores de malária falciparum compararam a eficácia de cloroquina/sulfadoxina-pirimetamina a mefloquina/artesunato e ao Coartem®. Os autores observaram que o primeiro esquema foi o menos efetivo, contudo todos foram bem tolerados. Os dois esquemas a base de ACTs se apresentaram como ótimas opções, devido à efetividade e prevenção de recrudescência. Sagara et al. (2008) e Faye et al. (2010), realizaram estudos randomizados com pacientes utilizando Coartem® e mefloquina/artesunato (Artequin®), ambos os autores concluíram que os esquemas são eficazes e bem tolerados (sem efeitos adversos graves), e as taxas de cura após 28 dias foram semelhantes (93,7% e 96,2%, respectivamente).

Mens et al. (2008), Arinaitwe et al. (2009) e Katrak et al. (2009) realizaram trabalhos randomizados de comparação da eficácia do Coartem® e dihidroartemisinina-piperaquina. O primeiro observou que a primeira combinação é mais eficaz na eliminação dos gametócitos, acarretando rápido declínio da parasitemia. O segundo, em estudo com crianças



da Uganda, concluiu que nos dois esquemas a recrudescência foi semelhante e ambos foram eficazes. O terceiro optou por trabalhar com crianças infectadas e não infectadas por HIV, observando que não houve aumento de risco de diarreia ou vômito e que os esquemas são seguros e bem tolerados para os dois grupos estudados.

Thapa et al. (2007) compararam a eficácia de Coartem® e sulfadoxina-pirimetamina em 99 nepalenses com malária falciparum. A falha do tratamento, após 28 dias, foi maior (12,1%) na segunda associação. Bell et al. (2009) estudaram a aderência ao esquema proposto, sobre a eficácia de Coartem®, sulfadoxina-pirimetamina e clorproguanil-dapsona em crianças e adultos com malária falciparum não complicada. Elevada aderência (100%), ausência de falha terapêutica e eficácia elevada, mesmo na administração não supervisionada, foram observada no primeiro esquema.

Mukhtar et al. (2007) em estudo com 157 pacientes com malária falciparum compararam a eficácia entre artesunato/sulfadoxina/pirimetamina e arteméter-lumefantrina. O resultado indicou eficácia de 93,5% ao primeiro e de 91,3% para o segundo grupo, que pode ser justificada pela maior adesão dos pacientes.

Sagara et al. (2006), em estudo randomizado, compararam a eficácia do Coartem® ao artesunato-sulfametoxipirazina-pirimetamina, obtendo taxas de cura de 99 e 100%, respectivamente. Não houve relato de efeito adverso grave em ambos os grupos. Sagara et al. (2009), repetiram o mesmo estudo em pacientes de Camarões, Mali, Ruanda e Sudão e observaram que ambos os esquemas foram eficazes, bem tolerados e seguros, sendo relatados eventos adversos gastrointestinais, como vômito e diarreia, os quais foram ligeiramente superiores no segundo esquema.

Sowunmi et al. (2007) compararam em 181 crianças com *P. falciparum*, a eficácia da amodiaquina-sulfadoxina-pirimetamina e do Coartem®. Os autores observaram que o tempo para o término da febre foi igual nos dois tratamentos, assim como a diminuição do número de gametócitos. A recrudescência ou reinfecção foi maior e a diminuição da parasitemia foi mais rápida no último. Zongo et al. (2007) e Obonyo et al. (2007) em estudo similar, envolvendo os mesmos esquemas, verificaram que ambos foram bem tolerados e seguros, contudo os primeiros autores afirmaram que amodiaquina-sulfadoxina-pirimetamina foi mais efetivo.

Sowunmi et al. (2008) compararam a eficácia de arteméter-lumefantrina e da amodiaquina-sulfalene-pirimetamina nas formas sexuadas do parasita em 42 crianças nigerianas com malária falciparum não complicada. Ambas as terapias exerceram efeitos moderados sobre a eliminação de gametócitos, mas Coartem® foi mais potente na redução da transmissibilidade da doença, exercendo maior efeito na densidade de gametócitos pós-tratamento.

Outros trabalhos comparam a eficácia e tolerabilidade de Coartem® com artesunato-amodiaquina concluindo que ambos são eficazes e toleráveis, apresentando altas taxas de cura e redução do número de gametócitos. (GUTHMANN et al., 2006; KOBBE et al., 2008). Entretanto, ocorreram mais falhas clínicas nos pacientes usando o primeiro e a aceitação do tratamento foi maior para o segundo esquema. (KOBBE et al., 2008).

Mutabingwa et al. (2005) realizaram estudo randomizado com crianças, entre quatro e 59 meses, com malária falciparum não complicada, objetivando analisar a eficácia de quatro tratamentos: amodiaquina, amodiaquina-sulfadoxina-pirimetamina, artesunato-

amodiaquina e arteméter-lumefantrina. Eles observaram que houve falha parasitológica, após 14 dias, em 42%, 20%, 11% e em 1%, dos esquemas empregados, respectivamente. Após 28 dias, a falha aumentou para 76%, 61%, 40% e 21%, respectivamente. E a taxa de recrudescência após 28 dias foi de 48,4%; 34,5%; 11,2% e 2,8%, respectivamente.

Estudos envolvendo a comparação da eficácia, tolerabilidade e segurança do Coartem® com halofantrina (AGTMAEL et al., 1999), quinina-doxiciclina (ALECRIM et al., 2006), cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina (SINGH et al., 2010) e dihidroartemisinina-naptoquina-trimetoprim (KRUDSOOD et al., 2003) também foram publicados, observando-se que em todos o co-arteméter é efetivo, seguro e bem tolerado. Apenas no primeiro trabalho foi relatada menor taxa de cura após 28 dias para ele (82%) em comparação a 100% para halofantrina.

Atualmente as formulações pediátricas orais de ACTs não são ideais para esta população de alto risco, pois crianças pequenas não podem engolir comprimidos inteiros devido ao perigo de asfixia e muitas vezes retornam o fármaco, pelo gosto amargo dos comprimidos esmagados, o que pode resultar na perda dos ingredientes ativos. Além disso, estes não são recomendados para crianças menores de 5Kg. Por isto, recentemente a Novartis® lançou formulações que facilitam a administração às crianças pequenas (em suspensão e efervescente) (JUMA, 2008; ABDULLA; SAGARA, 2009; PREMJI, 2009).

As formulações de medicamentos pediátricos como xaropes e pós de reconstituição têm várias desvantagens: são volumosos para o fornecimento e armazenamento, depois de abertos/reconstituídos a estabilidade e higiene da formulação não pode mais ser garantida, sendo difícil uma medição exata da dose a ser administrada.

Comprimidos dispersíveis permitem uma dose exata, são simples para o preparo, requerendo apenas água para dispersão (ABDULLA; SAGARA, 2009; NOVARTIS, 2009).

Abdulla et al. (2008) realizaram ensaios clínicos na África em 899 crianças com malária falciparum não complicada, avaliando os parâmetros farmacocinéticos dos comprimidos esmagados e arteméter-lumefantrina efervescente (ou dispersível). Concluíram que ambas as formas de administração foram eficazes e com perfil de segurança semelhante. Juma et al. (2008) compararam em 245 crianças do Quênia a eficácia do arteméter-lumefantrina em suspensão (Co-artesiane®) com o comprimido, e observaram que a cura parasitológica foi de 93,4% e 96%, respectivamente. Ambas foram efetivas no clareamento dos gametócitos.

Em 2004, o co-arteméter foi adotado como terapia de primeira linha no Quênia e na Tanzânia. Na Nigéria, após a implantação da combinação, houve redução significativa no número de crianças menores de cinco anos admitidas nos hospitais com malária grave. Na África do Sul, observou-se declínio tanto no número de casos da doença quanto de óbitos. Durante o ano de 2006, mais de 62 milhões de caixas de Coartem® foram fornecidas pela OMS a mais de 30 países em toda a África (NOVARTIS, 2007).

Diante da escolha do Coartem® como primeira linha de tratamento para malária na África, o Ministério da Saúde do Brasil implantou esta combinação nos Estados da Amazônia legal que apresentam casos de malária falciparum resistente a terapia padrão, como o Amazonas, Tocantins (onde a doença causada pelo *P. falciparum* aumentou em 142%) e Pará (BRASIL/SESAU, 2007).

Atualmente a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) lançou o projeto Coartem®, objetivando a realização de um estudo multicêntrico para avaliação do efeito da administração desta combinação na transmissão da malária em comunidades da região Amazônica (Amazonas e Pará) (BRASIL/SUSAM, 2006; BRASIL/SESAU, 2007; OPAS, 2008). Fatores favoráveis para disseminação desta combinação são: a capacidade do arteméter de reduzir a transmissão, por sua ação gametocitocida e a significativa aderência dos pacientes ao tratamento, geralmente superior a 90% (FOGG et al., 2004; YEUNG; WHITE 2005; PIOLA et al., 2005).

Lumefantrina está associada à menor ocorrência de reações adversas nas doses terapêuticas utilizadas. Atualmente, somente artesunato-amodiaquina e arteméter-lumefantrina são produzidos seguindo-se as boas práticas de fabricação. (KOBBE et al. 2008). Algumas limitações importantes referem-se à variabilidade na absorção oral da LF, o custo elevado do medicamento, mesmo sendo fornecido com preço reduzido para a OMS, em função da parceria com a Novartis® em 2001, administração duas vezes ao dia e a possibilidade de seleção de parasitas resistentes. (WHO, 2001; OMARI; GAMBLE; GARNER , 2004; ASHLEY et al., 2007a; KOBBE et al. 2008).

Há dificuldades na utilização da ACTs nos países mais pobres, pois o fornecimento desses derivados, apesar de crescente, permanece inadequado para estimativa de um bilhão de tratamentos a cada ano na África. Além disso, os custos são elevados (ZONGO et al., 2007), o que tem prejudicado a utilização do Coartem® nas populações vulneráveis que vivem nas regiões rurais com altos índices de malária. Portanto, a maioria dos pacientes não tem acesso ao tratamento, e continua a usar cloroquina, apesar da baixa eficácia. (KAYENTAO et al., 2009).

Wasunna et al. (2008), pesquisaram os fatores que levavam os profissionais de saúde a não prescreverem ACTs no Quênia. Concluíram que a oferta insuficiente de Coartem®, o fato de não ser oficialmente recomendado no guia para tratamento da malária do país, a falta de supervisão do tratamento e o pouco treinamento dos profissionais foram às principais causas.

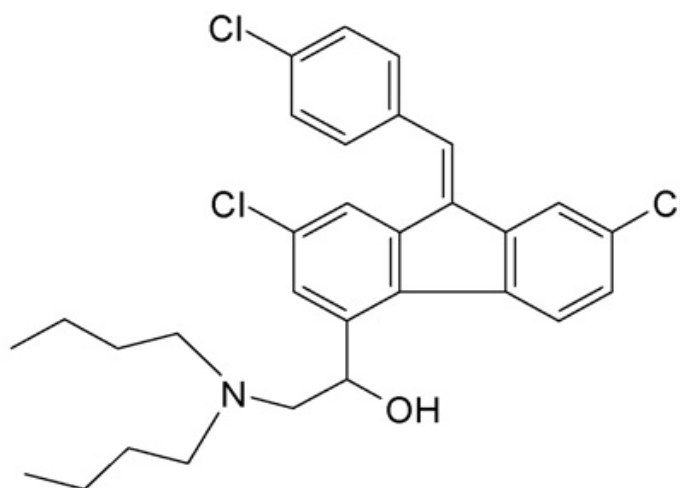
Sipilanyambe et al. (2008) e Barnes, Chanda e Barnabas (2009) analisaram o impacto do uso de Coartem® em larga escala nos países africanos. Os primeiros concluíram que mudanças nas políticas de tratamento e financiamento internacional aliado ao compromisso político local para colocar em prática os novos esquemas terapêuticos são necessários. Os segundos ensinam a planejar um estudo de avaliação do impacto das mudanças de tratamento e de outras intervenções estratégicas como mosquiteiros impregnados com praguicidas, mudanças nas técnicas de diagnósticos, dentre outros.

## 2.7 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA LUMEFANTRINA

### 2.7.1 Estrutura química e propriedades físico-químicas da lumefantrina

Lumefantrina (Figura 07), antigamente denominada de benflumetol, foi sintetizada na China, sendo registrada em 1977 como droga antimalárica da classe dos aril amino alcoóis (Quinolinometanóis), como a quinina, mefloquina e halofantrina (MANSOR et al., 1996; CÉSAR; NOGUEIRA; PIANETT, 2008). Possui a seguinte fórmula molecular:  $C_{30}H_{32}Cl_3NO$ ; peso de 528,24 Kda e densidade de 1, 252 (ARTEPAL.ORG, 2007). Apresenta-se como pó amarelo inodoro, muito lipofílico e por isto pouco solúvel em água e

em muitos solventes orgânicos, sendo solubilizada em ácidos graxos insaturados (MANSOR et al., 1996; GO; LI, 2003; ANNERBERG et al., 2005).



**Figura 07:** Estrutura química da Lumefantrina  
Fonte: CÉSAR; NOGUEIRA; PIANETT, 2008

A substituição em quatro posições da molécula de LF permite a formação de dois enantiômeros: (+)-lumefantrina e (-)-lumefantrina (WERNSDORFER et al., 1998). Estes mesmos autores demonstraram que ambos os isômeros e sua mistura (racemato) apresentam elevada ação antimalárica contra cepas de *Plasmodium falciparum in vitro*, corroborando o estudo de Zeng et al. (1996), que relataram atividade antimalárica semelhante dos isômeros, aliada a baixa toxicidade da mistura racêmica.

### 2.7.2 Farmacocinética da lumefantrina

A LF por ser altamente lipofílica, apresenta absorção lenta e variável (COLUSSI et al., 1999; SCHMIDT; DALHOFF, 2002). Ezzet, Mull e Karbwanga (1998), ao estudarem a cinética do fármaco em pacientes com malária falciparum não complicada, determinaram que a

meia-vida de absorção foi de 5,3 horas e a concentração plasmática máxima foi lentamente alcançada após oito horas da administração. A biodisponibilidade oral foi avaliada em alguns estudos com voluntários saudáveis e portadores de malária falciparum, observando-se um incremento de 16 vezes quando o fármaco foi administrado à refeição (BINDSHEDLER; DEGEN; LU, 1996).

Ezzet, Mull e Karbwanga (1998) e Ezzet et al. (2000) demonstraram que no início do tratamento a disponibilidade da LF é baixa, o que foi associado ao fato dos pacientes com malária apresentarem dificuldade para ingestão oral de alimentos, e após o retorno a dieta normal, geralmente na terceira dose, verificaram menor variabilidade no pico de concentração plasmática máxima e maior biodisponibilidade oral. Ashley et al. (2007)(b) realizaram estudo com voluntários saudáveis objetivando avaliar a quantidade necessária de gordura para otimizar a biodisponibilidade oral da LF, administrando co-arteméter com diferentes volumes de leite de soja (0, 10, 40, 150 e 500mL), alcançando uma concentração plasmática 90% superior de LF com apenas 36mL de leite, quando comparado com os indivíduos que não ingeriram gordura.

Vários estudos demonstraram que a área sob a curva de LF é a determinante cinética mais importante para resposta terapêutica adequada. É necessário que a concentração plasmática média exceda a 280ng/mL, pois foi observada recrudescência da doença em pacientes com níveis inferiores ou iguais a este. E concentração plasmática igual ou superior a 500ng/mL apresentou cura superior a 90% (EZZET; MULL; KARBWANG, 1998; WHITE; VAN VUGT; EZZET, 1999; EZZET et al., 2000; ASHLEY et al., 2007a).





Estudo em ratos e cães demonstrou que a excreção do fármaco ocorre principalmente através da bile, com excreção pelas fezes, onde a forma original é predominante em relação ao metabólito desbutil-lumefantrina (NOVARTIS, 2008). Não foram realizados estudos específicos em indivíduos com insuficiência renal, por esta via não exercer papel relevante na excreção da LF. (DJIMDÉ; LEFÈVRE, 2009).

Checchi et al. (2006) observaram que na urina de 58 voluntários saudáveis, não foi possível quantificar as concentrações de LF. Resultado semelhante foi encontrado por Bakshi et al. (2000) que realizaram análise retrospectiva de 1.869 pacientes tratados com LF, e não encontraram alteração significativa na função renal após o tratamento. Os autores concluíram que não é necessário o ajuste de dose para pacientes com leve e moderado comprometimento da função renal, recomendando cautela naqueles com disfunção renal grave.

### **2.7.3 Mecanismo de ação da lumefantrina**

A LF é um esquizotocida sanguíneo de ação prolongada e lenta que atua nos estágios intra-eritrocíticos assexuados do plasmódio (NOVARTIS, 2008). Há poucos estudos publicados sobre seu mecanismo de ação, entretanto, como pertence à classe dos quinolinometanóis, atribuí-se a inibição da produção de hemozoína, tanto por ligação direta ao grupo heme quanto por inibição da heme polimerase, que é utilizada pelo parasita para catalisar a reação de detoxificação da ferriprotoporfirina IX (Fe (III) PPIX), formando um composto inerte, não tóxico, denominado pigmento malárico, que tem por unidade básica a  $\beta$ -hematina (SULLIVAN et al., 1998; FOLEY; TILLEY, 1998; CUNICO et al., 2008). Secundariamente, promoveria a inibição da síntese protéica no parasita (NOVARTIS, 2008).

Por outro lado, GO e Li (2003) realizaram estudo *in vitro* sobre a interação de LF com os lipídios das membranas celulares e observaram que a presença do fármaco tornava a camada lipídica mais compacta e condensada. Tendo em vista que durante a infecção malárica a membrana do eritrócito fica mais fluida, a característica química da LF (anel fluoreno ligado por uma ligação dupla a um grupo fenil) permitiria a condensação dos lipídios nos eritrócitos, alterando sua permeabilidade.

#### **2.7.4 Efeitos adversos**

Vários estudos têm demonstrado que Coartem® não provoca efeitos adversos graves nos pacientes com malária falciparum (KRUDSOOD et al., 2003; FALADE et al., 2005; MULENGA et al., 2006; FANELLO et al., 2007; HAQUE et al., 2007; KABANYWANYI et al., 2007; HATZ et al., 2008; VALECHA et al., 2009; FALADE et al., (2008). Katrak et al. (2009) trabalhando com pacientes coinfectados ou não pelo HIV, observaram que os eventos adversos foram raros (1%), com apenas tosse, diarreia, vômito e anemia.

Elamin et al. (2009) estudando 291 pacientes com malária falciparum não complicada, relataram que apenas 3,8% dos participantes queixaram-se de efeitos adversos rápidos e reversíveis, não precisando trocar os medicamentos e nem fazer tratamento de suporte. Assefa et al. (2010) observaram que nenhum efeito adverso importante foi registrado em 90 indivíduos selecionados, exceto a ocorrência de úlceras orais em 7% deles.

Faye et al. (2010) trabalhando com 160 pacientes com malária, também, não relataram nenhum evento adverso grave, sendo o mais freqüente o vômito (36%). Sagara et al. (2009) corroborando com o primeiro, observaram que os efeitos adversos mais comuns foram os gastrointestinais, tais como vômito e diarreia.

Bindschedler et al. (2002) comparou os efeitos cardíacos dos antimaláricos coarteméter e halofantrina em um estudo duplo-cego com 13 pacientes com malária falciparum. Utilizando eletrocardiograma 48hs antes e 48hs depois dos tratamentos, os autores verificaram que o comprimento do intervalo QTc foi aumentado no segundo grupo. Corroborando tal achado, Van Vugt et al. (1999b), não observaram nenhum prolongamento do intervalo QTc em 150 pacientes recebendo arteméter-lumefantrina,

Toovey e Jamieson (2004) avaliaram em 150 pacientes com malária falciparum não complicada, a associação entre alterações audiométricas e a administração de Coartem®. Os autores concluíram que a perda de audição de alguns pacientes estava associada ao sinergismo entre os dois componentes da combinação. Toovey (2006) ampliaram seus estudos verificando que as alterações audiométricas causadas por Coartem®, em pacientes com malária falciparum e em saudáveis, são aparentemente irreversíveis.

Olufemi et al. (2009) analisaram os efeitos da administração, em curto prazo, de co-arteméter sobre a função testicular e seu sistema de defesa antioxidante em ratos. Foram inclusos 25 ratos machos, nenhum apresentou alterações significativas no peso do testículo, epidídimo, vesículas seminais e da próstata após três e seis dias de tratamento. Este não interferiu na quantidade, viabilidade e motilidade dos espermatozóides. Além disso, nos ensaios de glutathiona reduzida não houve significativas diferenças nos valores comparando

com o controle. Observou-se um aumento significativo no nível de malondialdeído no grupo experimental, contudo, a administração de Coartem® não teve impacto nos níveis séricos de testosterona.

### **2.7.5 Interação Medicamentosa**

Alguns estudos investigaram a possível interação da LF com outros fármacos, tal como quinina, mefloquina e cetoconazol. Principalmente aqueles que são metabolizados e que inibem a CYP3A4. Lefèvre et al. (2000), trabalhando com 42 indivíduos saudáveis, observaram que a concomitante administração de Coartem® com mefloquina causou redução (30-40%) da concentração plasmática de LF.

Lefèvre et al. (2002)(a), pesquisaram a interação de Riamet® com quinina intravenosa em pacientes saudáveis. Não foi observada interação farmacocinética entre os fármacos. Lefèvre et al. (2002)(b), trabalhando com 16 indivíduos saudáveis, avaliou a interação do cetoconazol (potente inibidor da CYP3A4) e do Riamet®. Concluíram que o último sofreu um aumento na sua concentração plasmática (de 207 para 333µg/mL) na presença de cetoconazol e que a meia vida de eliminação dele não sofreu nenhuma influência. Logo, não há necessidade de ajuste de dose do Coartem® quando administrado em associação com cetoconazol.

German et al. (2009), realizaram um estudo com 13 voluntários saudáveis para avaliar a interação de Riamet® com lopinavir/ritonavir (anti-retrovirais inibidores da CYP3A4). Os resultados corroboraram com Lefèvre et al. (2002)(b), pois observou-se um

aumento de 2,4 vezes na concentração de lumefantrina no plasma quando administrada concomitantemente com os anti-retrovirais.

## 2.8 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado, isto é, apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos e drogas e/ou metabólitos em diferentes matrizes biológicas (por exemplo, sangue total, soro, plasma, urina e tecido). (BRASIL/ANVISA, 2003; MOREAU; SIQUEIRA, 2008). Conforme descrito no Guia de validação de métodos bioanalíticos (FDA, 2001) e por Brito et al. (2003), os parâmetros fundamentais para validação de um método incluem: seletividade, linearidade, curva de calibração, sensibilidade, recuperação, precisão, estabilidade e robustez.

Segundo Ribani et al. (2004) e Moreau e Siqueira (2008), a seletividade avalia o grau de interferência de outros ingredientes ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes na amostra. Garante que a resposta seja exclusivamente do composto de interesse, sendo o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente.

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados proporcionais à concentração do analito (BRITO et al., 2003; BRASIL/ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004). É avaliada por intermédio de medidas da amostra em diversas concentrações, ou seja, da

construção de curvas de calibração, a partir da relação entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito, em função daquela esperada em um estudo particular (CASS; EGANI, 2001; FDA, 2001). A seguir, são obtidos o coeficiente de correlação de Pearson e a equação da reta através do método dos mínimos quadrados.

A curva de calibração deve ser gerada para cada fármaco e corrida analítica, a qual será usada para calcular a concentração do fármaco nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. Deve conter, no mínimo, cinco amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno. O cálculo do coeficiente de regressão de uma curva analítica deve ser acompanhado de uma cuidadosa inspeção, para verificar se todos os pontos a serem usados estão dentro da faixa linear dinâmica correspondente. (MOREAU; SIQUEIRA, 2008)

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

No estudo de recuperação pretende-se definir a quantidade da substância de interesse presente ou adicionada no material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. Avalia-se a eficiência do processo de extração de um método analítico em determinado limite de variação (MOREAU; SIQUEIRA, 2008). Está relacionada à exatidão,

pois reflete a quantidade de analito recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO et al., 2003).

Conforme descrito na resolução nº 899, de 2003 da ANVISA, a precisão é a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra, sendo determinada através do coeficiente de variação (CV) expresso em porcentagem. É considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-ensaio) que consiste na concordância entre os resultados em curto período de tempo com os mesmos analistas e instrumento; a precisão intermediária (inter-ensaio) que é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. E por último a reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), consistindo na concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes.

Em certos tipos de amostras, faz-se necessário avaliar a estabilidade da substância para determinar o tempo de estocagem delas evitando a degradação dos compostos de interesse (RIBANI et al., 2004).

A robustez de um método compreende a sensibilidade diante de pequenas variações. Na cromatografia líquida de alta eficiência pode ser avaliada por variação do pH, fluxo e composição da fase móvel, fabricantes dos solventes, diferentes lotes ou fabricantes de colunas e temperatura em que as últimas se encontram. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (BRASIL/ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; MOREAU; SIQUEIRA, 2008).



## 2. 9 ESTUDOS ENVOLVENDO DETERMINAÇÃO DE LUMEFANTRINA POR CLAE EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Alguns estudos foram realizados objetivando determinar as concentrações de LF tanto nos fluidos biológicos como em comprimidos. Zeng et al. (1996) foram os primeiros a publicarem um método para determinação de lumefantrina em plasma humano utilizando CLAE com detecção UV e coluna C18 (fase reversa). Dose única de 500mg de LF foi administrada a voluntários, e coletados 2mL de sangue após 30 minutos e 14 dias da administração. Os autores estabeleceram as seguintes condições cromatográficas: fase móvel composta por metanol-água-ácido acético glacial-dietilamina (93:6:1:0,03, v/v), fluxo de 1mL/min e absorbância de 335nm.

Foi utilizado como padrão interno um homólogo da LF. Durante a extração líquido-líquido, utilizou-se 1 mL de plasma, 1mL de solução tampão de hidrofosfato de sódio 0,2M-ácido cítrico 0,1M (7,71:12,29, v/v) e 2mL de ácido acético glacial-acetato de etila (1:100, v/v) para evitar a emulsificação e obter uma maior recuperação, cujo valor absoluto foi 92,91% (nas concentrações de 5 a 4000 ng/mL) e do padrão interno de 84,85% (300ng/mL). O limite de detecção da LF foi 11,8 ng/mL, a eluição foi em 4,86min e a precisão baixa em pequenas concentrações (5 e 10ng/mL) e elevada em altas concentrações (20 a 4000ng/mL).

Mansor et al. (1996) também determinaram lumefantrina por CLAE com detector UV e coluna C18 . Este estudo foi realizado com dois voluntários saudáveis, os quais utilizaram 500mg do fármaco. A seguir, foram coletados 10mL de sangue em diferentes horários. A fase móvel foi composta por acetonitrila-acetato de amônio 0,1M (90:10:, v/v), pH 4,9 ajustado

com ácido acético; fluxo de 1,5mL/min. e absorvância de 335nm. O padrão interno foi a halofantrina.

Foi empregada extração líquido-líquido, sendo utilizados: 1 mL de plasma, 50µL de halofantrina (5000ng/mL), 1mL de tampão ftalato 0,1M (pH= 2) e 7mL de hexano-dietiléter (70:30, v/v). O tempo de retenção da LF foi 15,9 min e do padrão interno 13,3minutos. A curva de calibração foi linear no intervalo de 0-800 ng/mL, a recuperação média foi 96,8±5,2%(%±desvio padrão), limite de detecção de 5ng/mL usando 1mL de plasma e precisão intra-dia e inter-dia de 1,8-4,0% e 1,8-4,2%, respectivamente.

Annerberg et al. (2005) determinaram as concentrações de lumefantrina em 96 amostras de plasma, utilizando detector UV e coluna CN (ciano), nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel composta por acetonitrila-tampão fosfato (pH 2,0; 0,1M) (58:42, v/v) e percolato de sódio 0,01M (mol/L de fase móvel); fluxo de 1,2mL/min. e absorvância de 335nm. Na extração em fase sólida foram utilizado 0,25ml de plasma, 500µL de acetonitrila-ácido acético (99:1, v/v) para precipitação de proteínas.

Como padrão interno utilizou-se um análogo da LF na concentração de 2,50µg/mL. Os tempos de retenção da LF e do padrão interno foram 10,2 e 8,3 minutos, respectivamente. As recuperações médias do fármaco nas concentrações de 200, 2000 e 15000 ng/mL foram 83,0±3,7; 84,4±4,2 e 86,5±2,5, respectivamente. O limite de detecção foi de 10ng/mL e o de quantificação de 25ng/mL.

Lindegardh et al. (2005) desenvolveram um método para simultânea determinação de lumefantrina e desbutil-lumefantrina em plasma de pacientes com malária falciparum não complicada utilizando CLAE com coluna CN e detector UV. A fase móvel utilizada foi acetonitrila-tampão fosfato (pH 2,0; 0,1M) (55:45 v/v) e percolato de sódio 0,05M, com fluxo de 1,2mL/min. e absorvância de 335nm. O padrão interno foi um análogo da lumefantrina, denominado “IS-2”.

A extração foi em fase sólida, utilizando 250µL de plasma, 0,5 mL de acetonitrila-ácido acético (99:1 v/v) e 2,5µg/mL de padrão interno. A linearidade da LF foi de 0,024 a 20,0µg/mL e da DLF de 0,021 a 1,01µg/mL. Os limites de detecção e quantificação da LF foram 0,010µg/mL e 0,021µg/mL, respectivamente. O tempo de retenção da LF foi de 17min. e da DLF foi de 10min. As recuperações médias da LF, DLF e do padrão interno foram 70,75%, 66% e 88,5 %, respectivamente.

Huang et al. (2010) fizeram modificações no método proposto por Lindegardh et al. (2005), promovendo a precipitação das proteínas, utilizando acetonitrila contendo 0,2% de ácido perclórico e halofantrina como PI (padrão interno). Foi usada coluna CN, detecção UV em 335nm e eluição em gradiente com duas fases móveis: água e ácido trifluoracético (0,1%) e metanol e ácido trifluoracético 0,1%. O fluxo foi de 0,4mL/min. A extração foi em fase sólida, utilizando 0,2mL de plasma, 50 µL de PI (100 µg/mL) e 0,5mL de acetonitrila contendo 0,2% de ácido perclórico. Os tempos de retenção da LF e do PI foram 14 e 6 minutos, respectivamente. O intervalo de linearidade foi 50-10.000ng/mL, Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram inferiores a 15% e a recuperação da LF alcançou 90%.

Blessborn et al. (2007) desenvolveram e validaram um método para determinação de LF em sangue capilar adsorvidas em papel de filtro de nove pacientes com malária falciparum não complicada, após 40 e 135 horas do uso de Coartem®. A fase móvel foi acetonitrila-tampão fosfato (0,1M, pH 2) (55:45, v/v) com 0,03M percolato de sódio, fluxo de 0,4mL/min. em coluna CN, com detector UV e absorvância em 335nm. O padrão interno foi o análogo TA 3039.

Na extração em fase sólida utilizou-se “spots” de 100µL, 1mL de ácido acético 0,5M, 1 mL de acetonitrila e 1 mL de padrão interno. Os tempos de retenção da LF e do padrão interno foram 11,5 e 12,2minutos, respectivamente. O limite de detecção da LF foi de 0,1µM, e de quantificação de 0,25µM. Recuperação média entre 60-65% foi obtida quando os “spots” foram extraídos no mesmo dia da aplicação no papel de filtro, contudo, reduziu para 40%, passado alguns dias. Os autores recomendaram para evitar perdas que o papel de filtro seja tratado com ácido tartárico 0,75M.

Ntale et al. (2008) desenvolveram um método para quantificação de LF e DLF em amostras de sangue total, adsorvidas em papel de filtro, de quatro pacientes com malária falciparum que fizeram uso de Coartem®. Foi utilizada CLAE com coluna C18 e detector UV. Como padrão interno utilizou-se halofantrina. A fase móvel consistiu de 10% de acetonitrila em tampão acetato de amônio (acetato de amônio 0,1M e ácido acético 0,01M, pH 6,5), fluxo de 1mL/min. e absorvância de 335nm. Os analitos foram estabilizados no papel de filtro tratando o sangue com ácido fosfórico (1,6 mol/L).

Na extração líquido-líquido foram utilizados 50µL de padrão interno, 1mL de metanol, 2mL de tampão fosfato de sódio (0,4 M, pH=2), 120µL de KOH (1M) e 8mL de di-

isopropiléter. O tempo de retenção da LF foi 6,03 min, para a DLF de 4,32min. e do padrão interno de 4,96min. A estabilidade dos fármacos nos “spots” foi satisfatória e a recuperação média da LF foi  $45\pm 3\%$  e da DLF  $28\pm 3\%$ . O limite de quantificação para ambos foi 300nM.

## 2.10 JUSTIFICATIVA

Com a crescente utilização mundial do Coartem®, inclusive no Brasil, onde foi adotado como esquema de primeira linha para o tratamento da malária por *P. falciparum*, faz-se necessário a validação de metodologia analítica de baixo custo, rápida e sensível, que permita a determinação de lumefantrina em amostras biológicas, a fim de auxiliar no estabelecimento dos esquemas terapêuticos ideais para a população amazônica, avaliar os casos de falha de resposta terapêutica a este novo esquema, contribuindo assim, para o controle apropriado dos casos clínicos de modo a possibilitar a aplicação de novas medidas terapêuticas, uma vez que fármacos com tempo de eliminação prolongada favorecem a disseminação de parasitas resistentes, pois as concentrações residuais no organismo do paciente aumentam a chance da pressão seletiva, no caso de reinfecção, surgindo mutações que podem ser disseminadas. (PREMJI, 2009).

Soma-se o fato que o método proposto neste estudo considera a dificuldade de transporte de amostras, a carência de recursos públicos para o sistema de saúde pública e a possibilidade de difusão da monitorização terapêutica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Validar metodologia analítica para determinação de lumefantrina em amostras de plasma e sangue total adsorvida em papel de filtro por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta em pacientes com malária causada por *P. falciparum* não complicada

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Padronizar a extração líquido-líquido de lumefantrina em plasma;
- Estabelecer as condições para a extração líquido-líquido em sangue total utilizando papel de filtro;
- Realizar estudos de seletividade, linearidade, curva de calibração, limites de detecção e quantificação, recuperação, precisão intra e inter ensaio, estabilidade e robustez;
- Verificar a aplicabilidade do método validado na determinação das concentrações de lumefantrina em amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro e em plasma de pacientes com malária por *P. falciparum*.;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 CASUÍSTICA

Para validação da metodologia analítica foram utilizadas amostras de sangue total e plasma de voluntário que nunca apresentou episódios de malária.

Para o estudo da aplicabilidade do procedimento validado foram coletadas, no período de julho a agosto de 2010, amostras de sangue total e plasma de pacientes com malária falciparum não grave, atendidos pelo Projeto RAVREDA, usando o quimioterápico de interesse (lumefantrina), por demanda espontânea, dentre aqueles que procuram o serviço de malária da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMTAM - (situada em Manaus-Amazonas). Cada coleta do material biológico foi acompanhada do preenchimento de protocolo contendo identificação da amostra, o nome do paciente, idade e sexo.

#### 4.1.1 Critérios de Inclusão

- Diagnóstico hemoparasitológico de malária por *P. falciparum*;
- Iniciado tratamento para malária por *P. falciparum*: Coartem® ou Riamet® (quatro comprimidos de 20mg/120mg, duas vezes ao dia por 3 dias);
- Idade acima de 18 anos (ambos os sexos);
- Assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

#### 4.1.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes com malária mista (aqueles com *P. falciparum* e outra espécie de malária);
- Os que apresentarem agravamento do quadro;
- Pacientes com doenças associadas;
- Aqueles que recusarem assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

#### 4.2 AMOSTRAS

Foram coletadas amostras por punção digital e por punção venosa empregando EDTA como anticoagulante, de pacientes com malária falciparum não grave, no terceiro dia (D3) após o início do tratamento. As primeiras foram transferidas para papel de filtro Whatman n° 41 (previamente tratado com ácido tartárico 0,75M), com seis aplicações de 100 µL em gotas concêntricas de aproximadamente dois cm de diâmetro, A seguir, o papel de filtro foi seco à temperatura ambiente, por três horas, e acondicionado em envelope comum devidamente identificado. As amostras foram transferidas ao Laboratório de Toxicologia da UFPA, onde foram realizadas as análises.

#### 4.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência *Varian*<sup>®</sup>, composto por uma bomba isocrática modelo ProStar 300, injetor manual reodyne, com *loop* de 20µL, detector duplo canal ultravioleta e visível ProStar, modelo 220. A separação



cromatográfica foi realizada a temperatura ambiente empregando-se coluna X-TERRA<sup>®</sup> RP18 5µm 4.6 X 150mm (Waters, Saint Quentin-en-Yvelines, France).

No preparo das amostras também foram utilizados: agitador de tubos vortex, Q-22ob1, Quimis<sup>®</sup>; Ultra-som, Q-335D, Quimis<sup>®</sup>; Centrífuga, 2K15, Sigma Laborzentrifugen<sup>®</sup>; peagâmetro digital PHS-3B, pHte<sup>®</sup> k; Balança, VL-1mg, Acculab<sup>®</sup>; Homogeneizador BHS-300, Benfer<sup>®</sup>; Bomba de vácuo, Fabbe<sup>®</sup>; desionizador de água Aquapur AQ 0010<sup>®</sup>; microseringa de 50µL, Halmliton<sup>®</sup>; Papel de filtro Qualy<sup>®</sup> (14µg de poro); Papel de filtro Whatman<sup>®</sup> n° 41 ; micropipetas automáticas com volume regulável Finnpipette (10µL a 100µL, 20µL a 200µL e 200µL a 1000µL), Labsystems<sup>®</sup>.; coluna preparativa de 100mL e chapa aquecedora.

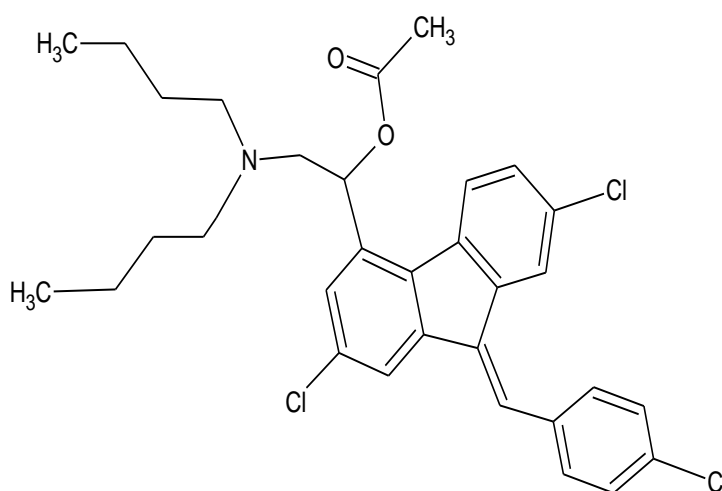
#### 4.4 REAGENTES E SOLVENTES

Foram utilizados metanol, ácido acético, ácido tartárico, trietilamina, ácido fosfórico, acetonitrila, anidrido acético, hexano e éter-etílico que foram obtidos da Merck<sup>®</sup> e Labsynth<sup>®</sup>. A água utilizada foi purificada com o sistema Aquapur AQ 0010<sup>®</sup>.

#### 4.5 SÍNTESE DO PADRÃO INTERNO (LUMEFANTRINA ACETILADA)

A síntese foi realizada no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia-UFPA, utilizando oito comprimidos de Coartem<sup>®</sup>, que foram triturados e solubilizados em metanol. A mistura foi filtrada em papel de filtro, e o filtrado permaneceu a

temperatura ambiente para evaporação do solvente. A seguir, foi pesado e transferido para erlenmeyer, no qual foi adicionado anidrido acético e trietilamina. Submetido a aquecimento em placa aquecedora a 70°C por duas horas. Por fim, resfriado a temperatura ambiente para cristalização do produto da reação. O derivado acetilado formado está apresentado na figura abaixo.



**Figura 09:** Estrutura química do Padrão interno

Fonte: Próprio autor

## 4.6 SOLUÇÕES-PADRÃO

### 4.6.1 Soluções estoque

As soluções estoque de lumefantrina (adquirida de Novartis® Pharmaceutical) e do padrão interno lumefantrina acetilada (adquirida através de síntese) foram preparadas usando metanol-ácido acético (99,8:0,2 v/v) para uma concentração final de 200µg/mL e de

212 $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A seguir, foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar a  $-20^{\circ}\text{C}$

#### **4.6.2 Soluções intermediárias**

As soluções estoque de LF e do PI foram diluídas em metanol para obtenção das soluções intermediárias de 20  $\mu\text{g/mL}$  e 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

#### **4.6.3 Soluções de trabalho**

As soluções intermediárias de LF e do PI foram diluídas em metanol para obtenção das soluções de trabalho nas concentrações de 8 $\mu\text{g/mL}$  e 1  $\mu\text{g/mL}$  para LF e na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  para o PI. Estas soluções foram preparadas momentos antes do uso.

#### **4.6.4 Padrões de calibração**

As amostras controle de lumefantrina utilizadas na validação da metodologia analítica foram preparadas em sangue total e plasma, oriundas de voluntário saudável que nunca fez uso de antimalárico. Foram obtidas a partir da diluição de alíquotas da solução de trabalho (8  $\mu\text{g/mL}$ ) de LF em volumes apropriados de sangue total e plasma humano, de modo a obter seis concentrações diferentes (160, 320, 640, 800, 1440 e 1760  $\text{ng/mL}$ ).

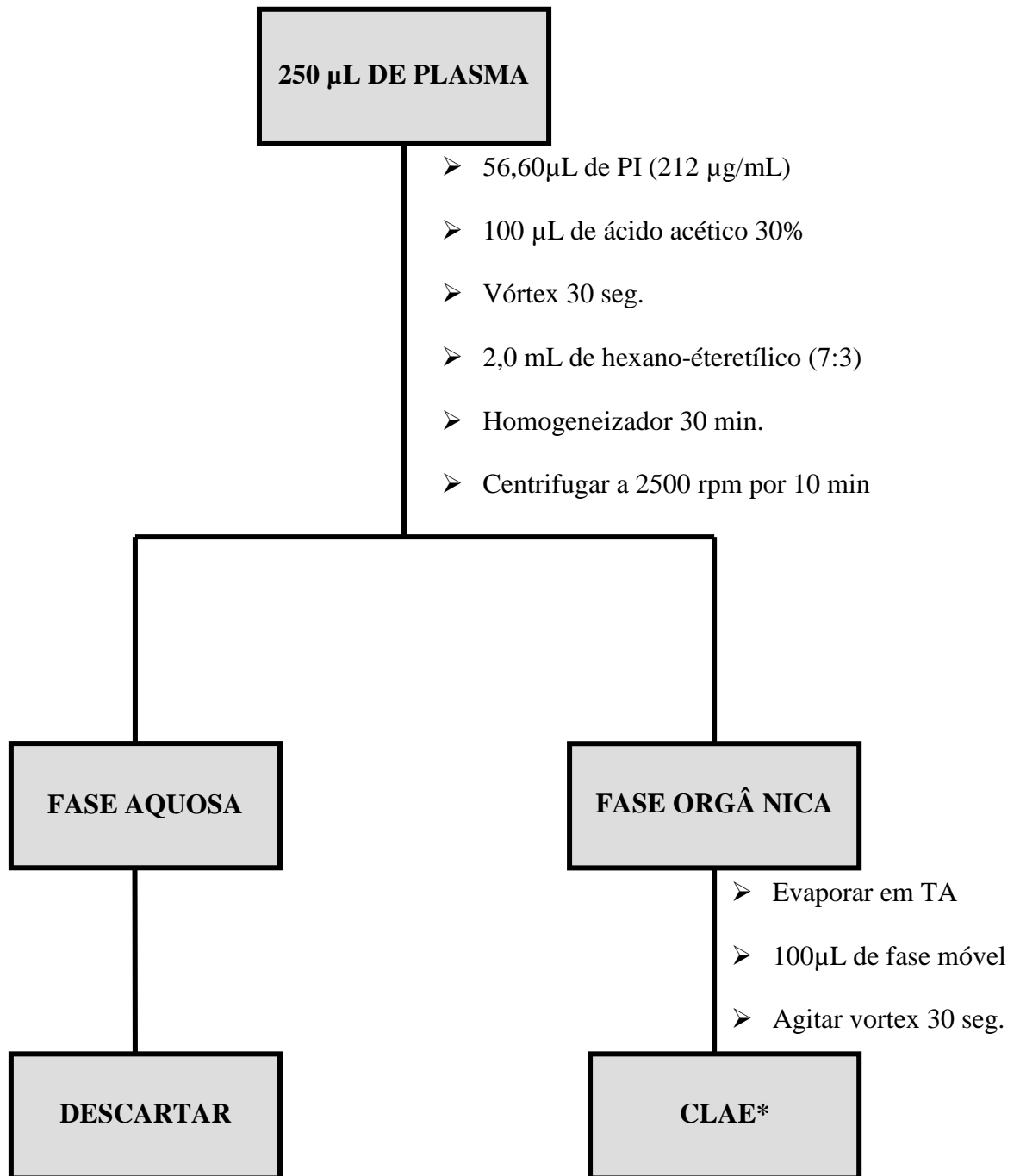
Antes de receber a amostra biológica, o papel de filtro foi submerso por 30 segundos em um recipiente plástico contendo solução de ácido tartárico 0,75M e seco a temperatura ambiente por uma hora. A seguir, estocado e protegido da luz (BLESSBORN et al., 2007). Os “spots” foram preparados no papel de filtro usando 100µL das amostras controle em diversas concentrações. Foram realizadas dez aplicações em cada folha de papel de filtro, os quais foram secos por três horas e armazenados em envelope a temperatura ambiente.

#### 4.7 EXTRAÇÃO DA LUMEFANTRINA DAS AMOSTRAS DE PLASMA

Foi utilizada uma alíquota de 250µL de cada amostra, que foi transferida para tubos de centrífuga de polipropileno de capacidade de 15mL (*FALCON*). A seguir, foram adicionados 56,60 µL do padrão interno (212 µg/mL) e 100 µL de ácido acético 30%. O tubo foi agitado em vórtex por 30 segundos e adicionado 2,0 mL de hexano-éteretílico (7:3). Posteriormente homogeneizado por 30 minutos e centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm. A fase orgânica (sobrenadante) foi transferida para microtubos de polietileno (*eppendorf*) e evaporada a temperatura ambiente. O resíduo foi ressuspenso com 100 µL da fase móvel, agitado em vórtex por 30 segundos, e volume de 50 µL foi injetado no cromatógrafo, seguindo-se as condições previamente descritas no item 5.1. O fluxograma do procedimento analítico encontra-se descrito na Figura 10.

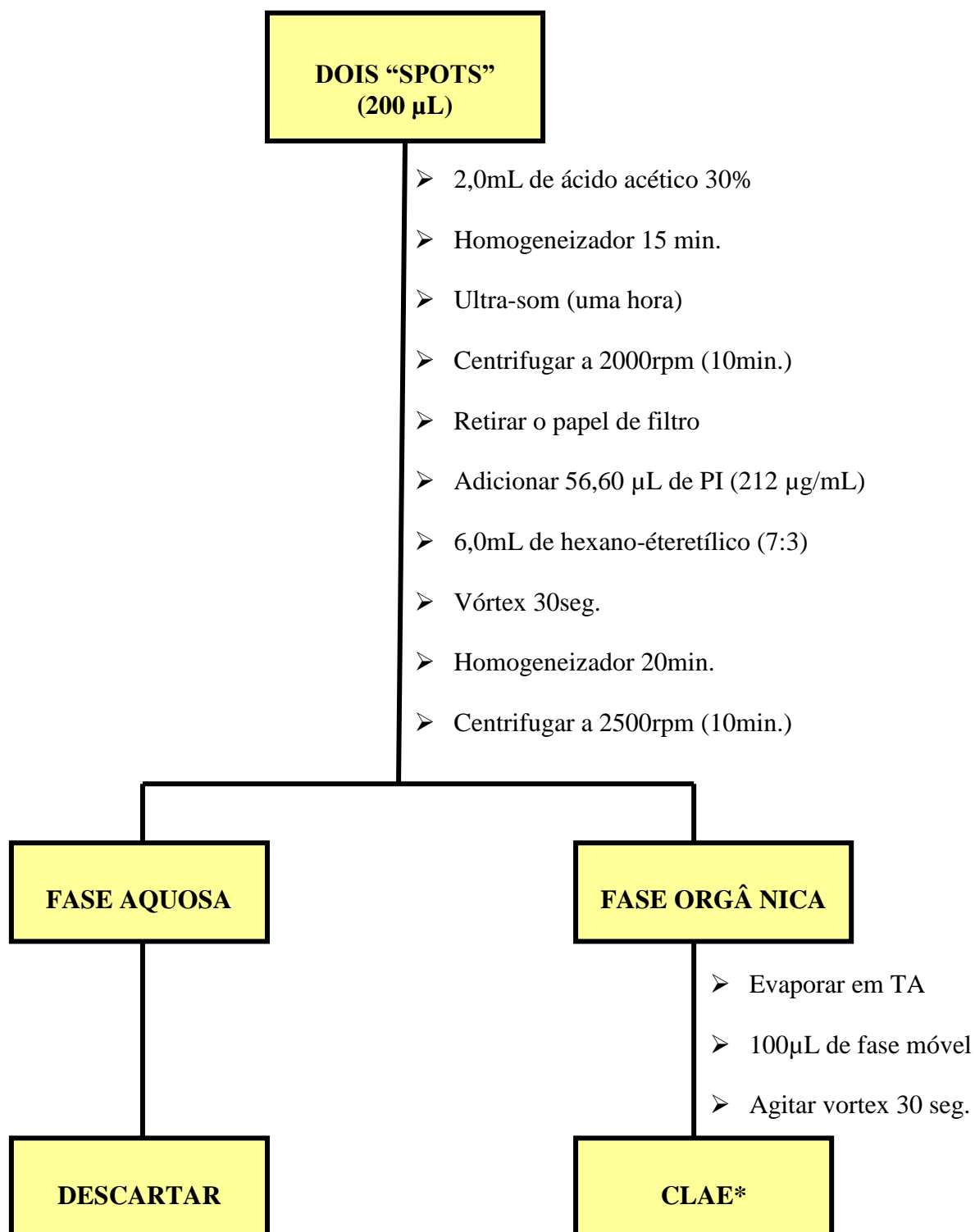
#### 4.8 EXTRAÇÃO DA LUMEFANTRINA DAS AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL ADSORVIDAS EM PAPEL DE FILTRO.

Os “spots” (com 100  $\mu\text{L}$  de sangue cada um) foram cortados em pequenas peças e transferidos para tubos de centrifuga de polipropileno ( *FALCON* ) com capacidade de 15mL e adicionados 2mL de ácido acético a 30%. A seguir, foram homogeneizados por 15 minutos e transferidos para ultra-som por uma hora e depois centrifugados a 2000 rpm por 10min. O papel de filtro foi retirado, com auxílio de um palito de madeira e adicionados 56,60  $\mu\text{L}$  do PI (212  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 6mL de hexano-éteretílico (7:3). Os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos, homogeneizados por 20 minutos e centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos. A fase orgânica (sobrenadante) foi transferida para tubos de centrifuga de polipropileno e evaporada a temperatura ambiente. O resíduo foi ressuspendido com 100  $\mu\text{L}$  da fase móvel, agitado em vórtex por 30 segundos, e volume de 50  $\mu\text{L}$  foi injetado no cromatógrafo, seguindo-se as condições previamente descritas em 5.1. O fluxograma do procedimento analítico encontra-se descrito na Figura 11.



\*Volume injetado: 50µL.

**Figura 10:** Fluxograma do procedimento analítico de extração da lumefantrina em amostras de plasma.



\*Volume injetado: 50µL.

**Figura 11:** Fluxograma do procedimento analítico de extração em papel de filtro da lumenfantrina em amostras de sangue total.

## 4.9 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DOS MÉTODOS

A validação das metodologias analíticas foi realizada segundo os critérios propostos pelo FDA, “Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation”, (2001) e resolução da ANVISA nº 899, de 29/5/2003. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, curva de calibração, limites de detecção e quantificação, recuperação, precisão intra e inter ensaio, estabilidade e robustez.

### 4.9.1 Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram obtidas utilizando-se soluções padrões de lumefantrina e lumefantrina acetilada em concentração de 1 µg/mL. Foram otimizados o fluxo, a composição e pH (ajustado com ácido fosfórico 30%) da fase móvel e o comprimento de onda de detecção.

### 4.9.2 Parâmetros de desempenho analítico

#### 4.9.2.1 Seletividade

Foi realizada a fim de caracterizar a possível interferência dos fármacos comumente empregados no tratamento da malária e seus metabólitos ou para hipertermia nos tempos de retenção do analito de interesse e do padrão interno. Foram avaliados a mefloquina, carboximefloquina, quinidina, quinina, cloroquina, desetilcloroquina, doxiciclina,



amodiaquina, primaquina, diclofenaco, ácido acetilsalicílico e paracetamol. (ANNERBERG et al., 2005; NTALE et al., 2008). A análise foi realizada segundo as condições cromatográficas descritas no item 5.1.

#### **4.9.2.2 Linearidade**

Alíquotas da solução de trabalho de LF (8 µg/mL) foram diluídas em metanol para a obtenção de seis concentrações diferentes (160, 320, 640, 800, 1440 e 1760 ng/mL), as quais foram injetadas em quintuplicata no cromatógrafo de acordo com as condições apresentadas no item 5.1. A seguir, a concentração de lumefantrina foi plotada no eixo das abscissas e a relação entre sua área e a do padrão interno (212 µg/mL) no eixo das ordenadas. Foi obtida a equação da reta, pelo método dos mínimos quadrados, e determinado o coeficiente de correlação de Pearson (r).

#### **4.9.2.3 Curva de calibração**

Foram construídas duas curvas, utilizando amostras controle de sangue total adsorvida em papel de filtro, e com plasma contendo LF nas concentrações de 160, 320, 640, 800 e 1440 ng/mL, as quais foram submetidas aos procedimentos de extração e quantificação descritos em 4.7, 4.8 e 5.1. Os ensaios foram realizados em quintuplicata e as relações das áreas de lumefantrina e do padrão interno foram projetadas no eixo da ordenada e as concentrações na abscissa. A regressão linear foi feita para obtenção da equação da reta e o coeficiente de Pearson (r) foi calculado para estabelecer a correlação entre a concentração do

fármaco e as respectivas relações das áreas do analito e do padrão interno (FDA, 2001; BRASIL/ANVISA, 2003).

#### **4.9.2.4 Limite de detecção**

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

#### **4.9.2.5 Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi determinado empregando-se amostras controle contendo lumefantrina em concentração decrescente, as quais foram submetidas ao procedimento de extração e determinação, segundo condições padronizadas neste estudo. As relações das áreas da lumefantrina e do padrão interno nas diversas concentrações avaliadas foram empregadas para obtenção do coeficiente de variação. As análises foram realizadas em quintuplicata e o limite de quantificação foi considerado aquele que apresentou coeficiente de variação inferior a 15% (FDA, 2001; BRASIL/ANVISA, 2003).

#### **4.9.2.6 Recuperação**

Foram empregadas amostras controle contendo lumefantrina em concentrações de 160, 640 e 1440ng/mL, as quais foram submetidas aos procedimentos de extração e quantificação previamente descritos. As relações das áreas da lumefantrina e do padrão interno das amostras controle foram comparadas aquelas resultantes da injeção direta no cromatógrafo da solução padrão de lumefantrina e do padrão interno, nas mesmas concentrações. Os resultados foram expressos em porcentagem da área da amostra extraída, em relação aquela da solução injetada diretamente no cromatógrafo, que representa 100%. As amostras foram analisadas em quintuplicata durante cinco dias consecutivos.

#### **4.9.2.7 Precisão**

A precisão intra-ensaio foi determinada, analisando-se, em um mesmo dia, amostras de plasma e sangue total fortificadas com LF, em concentrações de 160, 640 e 1440ng/mL. A análise foi realizada em quintuplicata para cada concentração e submetida à extração conforme descrito nas figuras 10 e 11. Foram calculados os valores do coeficiente de variação para cada análise (FDA, 2001; BRASIL/ANVISA, 2003).

O estudo de precisão inter-ensaio foi realizado analisando amostras de plasma e sangue total fortificadas com LF nas concentrações de 160, 640 e 1440ng/mL, em quintuplicata por cinco dias consecutivos. Para obtenção da precisão inter ensaio foram calculados os coeficientes de variação de cada concentração durante os cinco dias de estudo (FDA, 2001; BRASIL/ANVISA, 2003).

#### 4.9.2.8 Estabilidade

A estabilidade da lumefantrina no sangue total adsorvido em papel de filtro foi determinada por meio da análise, em triplicata, das amostras controle contendo diversas concentrações do analito (160, 640 e 1440 ng/mL), no mesmo dia de preparo dos “spots” (tempo 0) e comparadas àquelas analisadas após 70 dias de acondicionamento do papel de filtro em envelopes lacrados armazenados a temperatura ambiente. A variação aceita é de 15% (BRASIL/ANVISA, 2003; NASCIMENTO, 2008).

#### 4.9.2.9 Robustez

Para estudo de robustez foram testadas três condições dos parâmetros cromatográficos mais sujeitas a variação: pH, fluxo e composição da fase móvel.

### 4.10 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

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

#### 4.11 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi desenvolvido com amostras biológicas coletadas para as pesquisas associadas ao projeto RAVREDA. Cada paciente candidato ao presente estudo assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo A), aceitando participar da pesquisa e teve sua identidade mantida em sigilo. O presente trabalho foi submetido ao comitê de ética em Pesquisa de seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-CCS/UFPA) (anexo B).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas utilizadas para validação dos métodos estão apresentadas na tabela 02:

**TABELA 02:** Parâmetros cromatográficos utilizados para validação da metodologia analítica

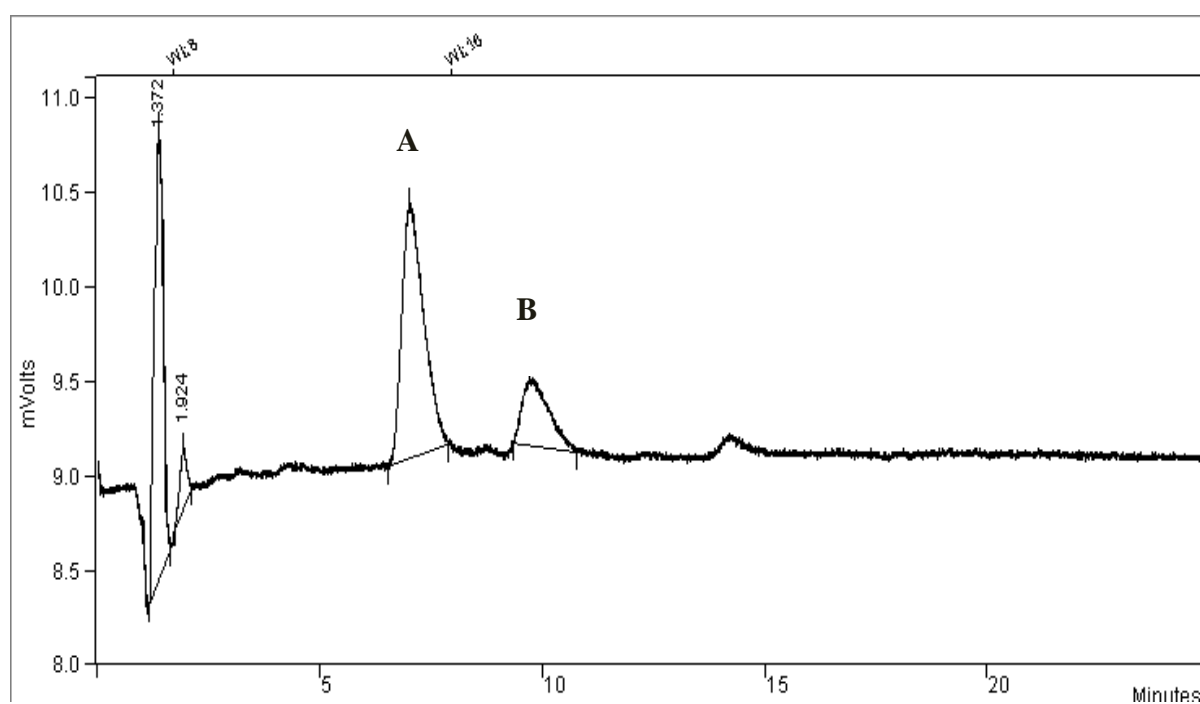
PARÂMETRO	CONDIÇÃO
Detecção	UV ( $\lambda = 335 \text{ nm}$ )
Fluxo	1,2 mL/min
Coluna	C18, 5 $\mu\text{m}$ X-terra 4.6 X 150mm (Waters, Saint Quentin-en-Yvelines, France).
Fase móvel	Acetonitrila:água, pH de 3,5 (60:40)
Volume de injeção	20 $\mu\text{L}$

Nas condições cromatográficas acima, os tempos de retenção das soluções padrões de LF e LFac (lumefantrina acetilada) estão apresentados na Tabela 03 e o cromatograma está ilustrado na Figura 12.

**TABELA 03:** Tempo de retenção das soluções padrões de LF (1µg/mL) e PI (1µg/mL) segundo condições cromatográficas previamente padronizadas.

Fármaco	n	Retenção (min)
Lumefantrina (A)	5	7,0
Lumefantrina acetilada(B)	5	9,7

n= número de determinações



**Figura 12:** Cromatograma das soluções padrões de LF (1µg/mL) (A) e PI (1µg/mL) (B), segundo condições cromatográficas padronizadas.

## 5.2 PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO

### 5.2.1 Seletividade

A tabela 04 mostra que nas condições cromatográficas estabelecidas, não há interferência dos fármacos avaliados nos tempos de retenção da LF e do PI.

### 5.2.2 Linearidade

A linearidade do procedimento juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) estão apresentados na tabela 05 e na figura 13.

### 5.2.3 Curva de calibração

As curvas de calibração obtidas através de análises do plasma e sangue total, conforme descrito em 4.9.2.3 estão apresentadas nas tabelas 06 e 07 e ilustradas nas figuras 14 e 15, respectivamente.



**TABELA 04:** Tempo de retenção dos fármacos de interesse, de acordo com as condições cromatográficas padronizadas para determinação de lumefantrina.

<b>Fármaco</b>	<b>Tempo de retenção (minutos)</b>
Mefloquina	NE
Carboximefloquina	3,6
Quinidina	NE
Quinina	NE
Cloroquina	NE
Desetilcloroquina	1,4
Doxiciclina	1,6
Amodiaquina	NE
Primaquina	NE
Diclofenaco	NE
Ácido acetilsalicílico	2,3
Paracetamol	1,8

NE: Não eluiu nas condições cromatográficas padronizadas

**TABELA 05:** Linearidade da lumefantrina

<b>Lumefantrina ng/mL</b>	<b>n</b>	<b>Relação das áreas Lumefantrina/Padrão interno</b>
160	5	0,057
320	5	0,129
640	5	0,253
800	5	0,415
1440	5	0,715
1760	5	0,909

n= número de determinações

### Linearidade Lumefantrina

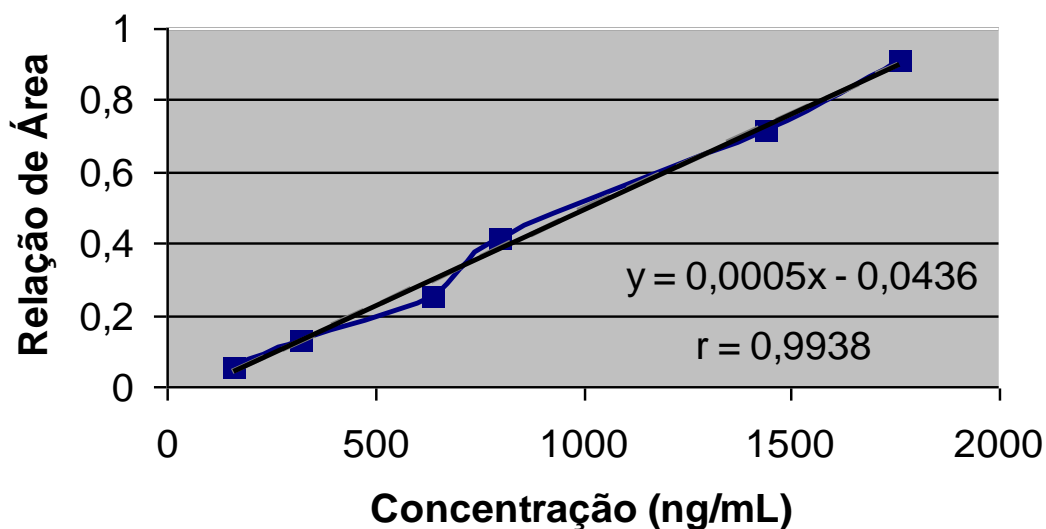


Figura 13: Representação gráfica da Linearidade da Lumefantrina

TABELA 06: Curva de calibração da lumefantrina em plasma

Lumefantrina ng/mL	n	Relação das áreas Lumefantrina/Padrão interno
160	5	0,872
320	5	1,324
640	5	2,097
800	5	2,876
1440	5	4,007

n= número de determinações

TABELA 07: Curva de calibração da lumefantrina em sangue total

Lumefantrina ng/mL	n	Relação das áreas Lumefantrina/Padrão interno
160	5	0,228
320	5	0,253
640	5	0,295
800	5	0,356
1440	5	0,412

n= número de determinações

### Curva de calibração da lumefantrina em plasma

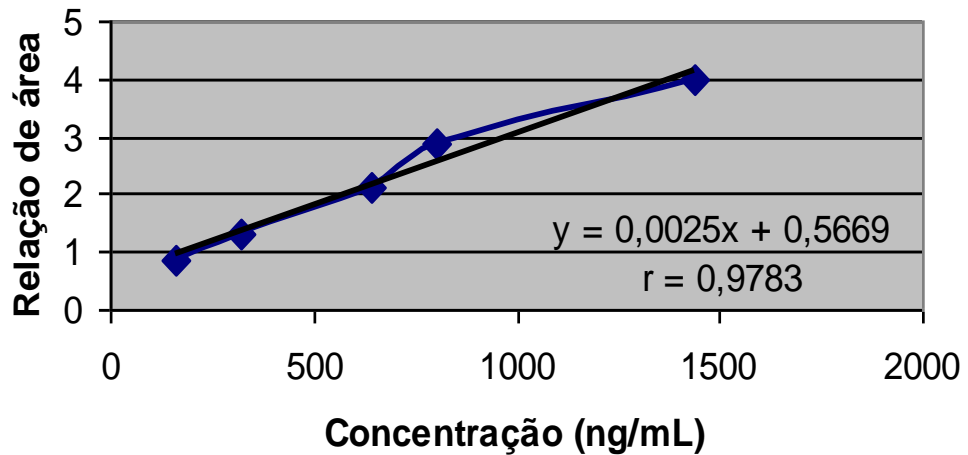


FIGURA 14: Representação gráfica da curva de calibração da lumefantrina em plasma

### Curva de calibração da lumefantrina em sangue total

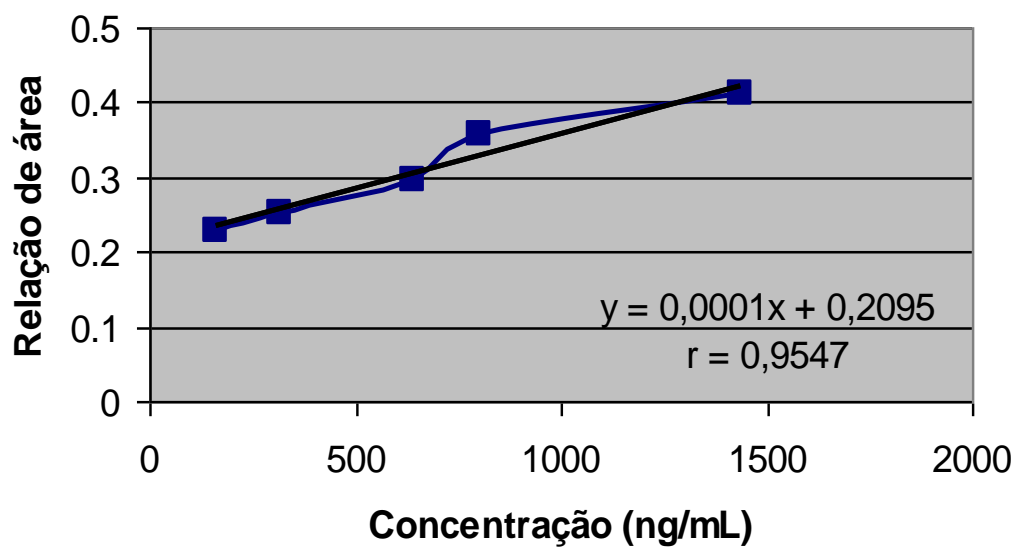


FIGURA 15: Representação gráfica da curva de calibração da lumefantrina em sangue total adsorvido em papel de filtro.

#### 5.2.4 Limite de detecção

O limite de detecção foi de 32ng/mL

#### 5.2.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação tanto para o plasma quanto para o sangue total foi de 160ng/mL

#### 5.2.6 Recuperação absoluta

Na Tabela 08 estão apresentados os resultados da recuperação absoluta da lumefantrina no plasma e no sangue total adsorvido em papel de filtro, em três concentrações avaliadas.

**TABELA 08:** Recuperação absoluta da Lumefantrina em plasma e sangue total

<b>Lumefantrina em plasma ng/mL</b>	<b>n</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Lumefantrina em sangue total ng/mL</b>	<b>n</b>	<b>Recuperação (%)</b>
160	15	114	160	15	120
640	15	106	640	15	85
1440	15	80	1440	15	48

n= número de determinações

### 5.2.7 Precisão dos métodos

As Tabelas 09 e 10 mostram os resultados obtidos nos ensaios de precisão em plasma e sangue total adsorvido em papel de filtro, respectivamente. Pode ser observado que os coeficientes de variação mantiveram-se abaixo de 15% para ambos.

**TABELA 09:** Precisão intra-ensaio e inter-ensaio da Lumefantrina em amostras de plasma expressa como coeficiente de variação.

<b>Lumefantrina ng/mL</b>	<b>n</b>	<b>Coeficiente de Variação INTRAENSAIO (%)</b>	<b>n</b>	<b>Coeficiente de Variação INTERENSAIO (%)</b>
160	5	11,55	15	14,37
640	5	10,95	15	10,89
1440	5	10,15	15	14,39

n= número de determinações

**TABELA 10:** Precisão intra-ensaio e inter-ensaio da Lumefantrina em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro, expressa como coeficiente de variação.

<b>Lumefantrina ng/mL</b>	<b>n</b>	<b>Coeficiente de Variação INTRAENSAIO (%)</b>	<b>n</b>	<b>Coeficiente de Variação INTERENSAIO (%)</b>
160	5	9,14	15	10,63
640	5	10,05	15	10,03
1440	5	5,96	15	14,68

n= número de determinações

### 5.2.8 Estabilidade

A tabela 11 mostra os resultados obtidos no estudo da estabilidade química da lumefantrina (item 4.9.2.8). Foi observado que, durante 70 dias, as amostras mantidas a temperatura ambiente, não apresentaram perda superior a 15%.

**TABELA 11:** Estudo da estabilidade da lumefantrina

<b>Concentração de lumefantrina (ng/mL)</b>	<b>n</b>	<b>Tempo 0 (relação de área)</b>	<b>70 dias depois (relação de área)</b>	<b>Perda de lumefantrina (%)</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
160	3	0,285	0,225	21,05	8,98
640	3	0,256	0,204	20,31	8,27
1440	3	0,287	0,223	22,30	13,70

n= número de determinações

### 5.2.9 Robustez

Para avaliação da robustez do procedimento foram variados o pH da fase móvel em 5,1 e 3,5 , a concentração de acetonitrila, nas proporções de 70:30 (v/v) e 60:40 (v/v) e o fluxo da fase móvel em 1,2; 1; 0,8; 0,6 e 0,5 . Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12.

### 5.2.10 Aplicabilidade do método

O resultado da análise da concentração de lumefantrina em sangue total adsorvido em papel de filtro dos pacientes com malária falciparum em tratamento com Coartem<sup>®</sup>, coletado no D3, submetidos ao método validado, está representado na tabela 13 e figura 16.

**TABELA 12:** Avaliação da robustez do método através de alterações no valor de pH, fluxo e na proporção dos solventes da fase móvel, de acordo com as condições cromatográficas previamente padronizadas.

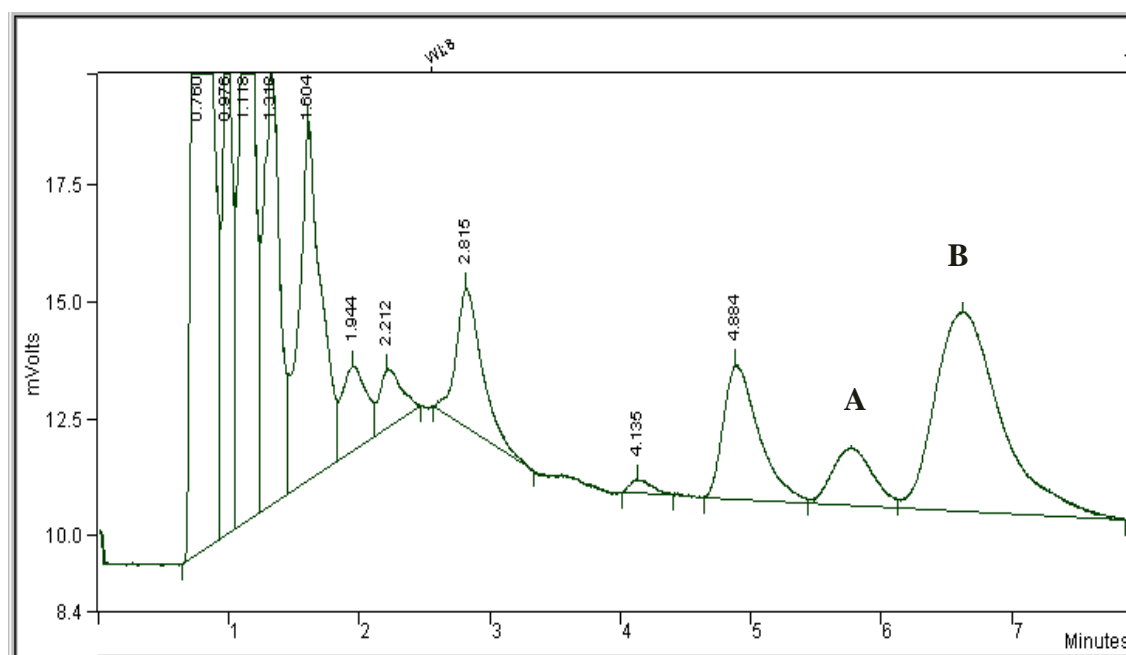
Variação	Tempo de Retenção (min)		
	n	Lumefantrina	PI
ACN/água (70:30) pH=5,1; fluxo de 1mL/min.	5	6,7	7,6
ACN/água (70:30) pH=5,1; fluxo de 0,8mL/min.	5	9,2	10,1
ACN/água (60:40) pH=5,1; fluxo de 1mL/min.	5	5,5	6,1
ACN/água (60:40) pH=5,1; fluxo de 0,6mL/min.	5	9,4	10,5
ACN/água (60:40) pH=3,5; fluxo de 0,5mL/min.	5	12,4	12,2
ACN/água (60:40) pH=3,5; fluxo de 0,8mL/min.	5	14	19,7
ACN/água (60:40) pH=3,5; fluxo de 1mL/min.	5	12,1	17,5

n= número de determinações

**TABELA 13:** Concentrações (ng/mL) de lumefantrina em pacientes com malária falciparum

Paciente	n	Concentração lumefantrina (ng/mL)
1	3	785
2	3	1118

n= número de determinações



**FIGURA 16:** Cromatograma de amostra de sangue total de paciente com malária falciparum em tratamento com Coartem<sup>®</sup>. LF(A) e LFac (B).



## 6. DISCUSSÃO

É fundamental que os laboratórios analíticos disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaios que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que suas características de desempenho atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas. (INMETRO, 2003).

A importância da validação em análise química tornou-se mais acentuada a partir da constatação, na década de 1970, da enorme variabilidade dos resultados de análise toxicológica de amostras submetidas a estudos interlaboratoriais por órgãos do governo americano. A partir de iniciativas de instituições do governo americano, tais como o *Food and Drug Administration* (FDA) e a *Environmental Protection Agency* (EPA), e dos resultados de estudos para assegurar a integridade dos dados laboratoriais, criou-se o sistema denominado ISSO/IEC-25. (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994), objetivando a padronização das exigências a serem seguidas pelos laboratórios a fim de garantirem competência na realização dos serviços, assim como tornarem os resultados internacionalmente aceitos e passíveis de serem reproduzidos em outros laboratórios. A partir destas normas, cada país estabelece seu próprio programa para assegurar a qualidade. (LANÇAS, 2009).

No Brasil, há duas agências para verificar a competência dos laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação dos métodos analíticos. A regulamentação é

apresentada na resolução nº 899, da ANVISA, a qual é baseada no guia proposto pelo FDA (*Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation*).

Artigos envolvendo determinação de LF nos fluídos biológicos são escassos, principalmente aqueles que envolvem o papel de filtro como suporte, até o momento apenas dois artigos se encontraram em todo o mundo: Blessborn et al. (2007) e Ntale et al. (2008). Os que utilizam plasma humano também possuem carência de publicações, apenas cinco: Zeng et al. (1996); Mansor et al. (1996); Annerberg et al. (2005); Lindegardh et al. (2005); Huang et al. (2010). Isto é preocupante, pois a lumefantrina em combinação com arteméter está sendo utilizada em muitos países onde a malária é endêmica e onde há presença de resistência aos outros antimaláricos (WHITE, 2004).

Com a introdução do Coartem® como terapia de primeira linha para o tratamento da malária falciparum no Brasil, torna-se imprescindível a validação de um método que determine a concentração da LF em fluídos biológicos humanos, tal como plasma e sangue total. Este foi um dos motivos que impulsionou o planejamento deste trabalho, assim como a carência de um método eficiente e de baixo custo para a monitorização terapêutica deste fármaco.

Ao considerar que para a validação analítica é necessário conhecer o processo que envolve as diversas etapas metodológicas, portanto, foram seguidas neste estudo as recomendações sugeridas por Leite (2002), quer sejam: conhecer a substância a ser analisada e a amostra, o melhor sinal analítico, o modo ideal para conservação das soluções padrões e amostras e definição das condições analíticas através do conhecimento dos dados disponibilizados na literatura.

Além disso, estudos para determinar os parâmetros de desempenho analítico devem ser realizados com equipamentos e instrumentos operando de acordo com as especificações do fabricante e devidamente calibrados. Da mesma forma, o operador que realiza os estudos deve ter competência nesta área do conhecimento e ser capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do trabalho. (HARTMANN et al., 1998; INMETRO, 2003).

No presente trabalho, o método validado para determinação de lumefantrina utilizou equipamento de baixo custo operacional (CLAE) disponível em boa parte dos laboratórios dos países em desenvolvimento como o Brasil. Além disso, possui como vantagens o tempo reduzido de análise, alta resolução, seletividade, sensibilidade e possibilidade de automatização. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

As condições para análise cromatográficas foram estabelecidas em função das características dos grupos funcionais da LF e da matriz biológica usada, uma vez que a complexidade desta é a questão principal na validação de um método bioanalítico. O desenvolvimento do método se iniciou com a escolha de um sistema cromatográfico capaz de separar o fármaco em tempo mais reduzido possível. (HENDRIKS, 2009).

O detector de ultravioleta (UV) foi escolhido por ser o mais adequado a detecção da estrutura química da LF, em comprimento de onda de 335nm (Tabela 02). Além disso, considerou-se o baixo custo e a simplicidade na detecção. (CIOLA, 1998). A coluna C18 em fase reversa foi escolhida devida suas características apolares (sílica ligada a um grupo octadecil), ter sido utilizada, com sucesso, em alguns dos métodos validados (Zeng et al. (1996); Mansor et al. (1996) e Ntale et al. (2008), além do preço inferior, quando comparada a coluna com grupamentos CN, também empregada em alguns métodos (Annerberg et al.

(2005); Lindegardh et al. (2005); Blessborn et al. (2007) e Huang et al. (2010) (CIOLA, 1998; LANÇAS, 2009).

Neste estudo, utilizou-se água ultra pura e acetonitrila na composição da fase móvel, a primeira é de fácil acesso e baixo custo; a segunda foi escolhida devida sua baixa polaridade, o que facilitou a eluição do analito em tempo adequado (Tabela 03). Esta fase móvel foi selecionada, também, devido a algumas propriedades físico-químicas importantes: alto grau de pureza, dissolução da amostra sem decompor seus componentes, não decompõe a fase estacionária, baixa viscosidade e ponto de ebulição, é compatível com o detector utilizado e tem miscibilidade completa. (LEITE, 2002; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Vários estudos publicados, como os de Mansor et al. (1996), Annerberg et al. (2005), Lindegardh et al. (2005), Blessborn et al.(2007) e Ntale et al.(2008), utilizaram tampão na composição da fase móvel (fosfato, percolato ou acetato), a fim de manter o pH constante, reproduzindo o tempo de retenção. Contudo, neste estudo o emprego de fase móvel sem tampão, não acarretou mudança significativa no tempo de retenção do analito e do padrão interno, não prejudicando sua separação e identificação.

Zeng et al.(1996) e Huang et al.(2010) acrescentaram ácidos na fase móvel para reforçar a dissociação do analito nos solventes orgânicos, o que mostrou-se desnecessário neste estudo, pois tanto no preparo da solução estoque de LF, quanto nas extrações utilizou-se ácido acético glacial, e a LF apresentou boa solubilização em acetonitrila, que é o componente majoritário da fase móvel.

Outro ponto importante foi o pH da fase móvel, pois a maioria dos artigos revisados utilizam pH ácido (entre 2,00 a 2,35), com exceção de apenas dois: Mansor et al. (1996) (pH=4,9) e Zeng et al. (1996) (pH=4,00). Sabe-se que a sílica da fase estacionária, mesmo estando ligada a grupos como o octadecil, pode ser degradada em pH extremo, e o ideal é entre 3 a 7. (CIOLA, 1998; LEITE, 2002; CÉSAR; PIANETTI, 2009). Neste estudo, optou-se por preservar a coluna utilizando pH=3,5 pois foram obtidos boa resolução dos picos e solubilização do analito na fase móvel, bem como pelo fato da LF ser uma base fraca e fases móveis muito ácidas poderiam ionizá-la, resultando no aparecimento de picos com cauda, pela maior afinidade a fase móvel. (LANÇAS, 2009).

A utilização de padrão interno confere maior reprodutibilidade ao método, pois minimiza as variações que podem ocorrer nas diversas etapas metodológicas, desde a separação e extração até as oscilações do equipamento (detector, coluna, bomba ou vazão). Assim, a identificação dos analitos de interesse por meio do tempo de retenção em relação ao padrão interno, garante maior confiabilidade à análise qualitativa, enquanto a quantificação por meio da relação de áreas dos picos cromatográficos do analito de interesse e do padrão interno assegura maior qualidade dos resultados (RIBANI et. al, 2004).

Alguns estudos utilizaram halofantrina como PI, Mansor et al. (1996), Ntale et al. (2008) e Huang et al. (2010), outros sintetizaram análogos com estruturas químicas similares a da LF, Zeng et al. (1996), Annerberg et al. (2005), Lindegardh et al. (2005) e Blessborn et al. (2007). Como não foi possível a aquisição da halofantrina, devido ao seu alto custo, optou-se pela síntese de um derivado (lumefantrina acetilada). O cromatograma das soluções padrões (figura 12) mostra que os picos apresentaram boa resolução, corroborando com os trabalhos de Annerberg et al. (2005), Lindegardh et al. (2005), Ntale et al. (2008) e Huang et al. (2010).

Tanto a extração do plasma como do papel de filtro foram baseadas nos estudos de Mansor et al. (1996) e Lindegardh et al. (2005). Vários testes foram conduzidos para otimização das condições de extração, e conseqüentemente melhor recuperação do analito e do padrão interno. O custo mais baixo e simplicidade na execução foram os pontos principais para a escolha da extração líquido-líquido, além disso, Zeng et al. (1996) e Mansor et al. (1996) obtiveram boas recuperações da LF (92,9% e 96,8% , respectivamente) utilizando este tipo de extração em amostras de plasma. O que foi corroborado pelos resultados obtidos neste estudo, cuja recuperação média da LF nas amostras de plasma em diversas concentrações foi 101,3%. (Tabela 08). Destaca-se que tais resultados são superiores aqueles empregando extração líquido-sólido, como de Annerberg et al. (2005); Lindegardh et al. (2005) e Huang et al. (2010), que obtiveram, respectivamente, as recuperações médias de 84,4%, 88,5% e 86,9%.

Soma-se o fato que os valores de recuperação das diversas concentrações de LF adicionadas as amostras de plasma neste estudo obedecem as recomendações oficiais vigentes, isto é, entre 80-115% (Tabela 08). (BRASIL/ANVISA, 2003).

A recuperação média das amostras de sangue total adsorvida em papel de filtro foi de 84,3%, variando de 48 a 120%. Admite-se a ocorrência de contaminação do papel de filtro na recuperação da concentração de 160ng/mL, fato creditado a coincidência de datas do preparo do padrão interno e desta amostra controle. Por outro lado, o menor resultado de recuperação obtido, isto é, 48% corrobora aquele de Ntale et al. (2008), único estudo que utiliza papel de filtro e extração líquido-líquido, cujo valor foi 45%.

Na avaliação da seletividade foram considerados potenciais interferentes aqueles fármacos que poderiam ser administrados pelo paciente concomitantemente ou algum tempo antes ou após o uso do Coartem®, como os antipiréticos e antimaláricos, uma vez que nas áreas endêmicas onde os indivíduos são infectados várias vezes em curto intervalo de tempo, aqueles fármacos ou seus metabólitos de meia vida prolongada, como a cloroquina e a mefloquina, ainda poderão estar no organismo do paciente. Os resultados apresentados na tabela 04 demonstraram que não houve interferência dos fármacos avaliados no tempo de retenção do analito e do padrão interno nas condições cromatográficas otimizadas.

O limite de detecção ficou um pouco acima quando comparado aos estudos de Zeng et al. (1996), Mansor et al. (1996); Annerberg et al. (2005) e Lindegardh et al. (2005). Isto se deve a diferença de sensibilidade entre os equipamentos, sem comprometimento da finalidade da análise. Já o limite de quantificação foi de 160ng/mL, caracterizando assim, a aplicabilidade do procedimento validado, uma vez que concentrações de LF inferiores a 280 ng/mL, já indicariam possibilidade de resistência (Ezzet, Mull e Karbwang (1998); White, Van vugt e Ezzet (1999).

A escolha da faixa de aplicação do método foi baseada nos estudos de farmacocinética realizados por Ezzet, Mull e Karbwang (1998), White, Van vugt e Ezzet (1999), Ezzet et al. (2000) e Ashley et al. (2007)(a), os quais demonstraram que as concentrações terapêuticas de LF em pacientes com malária falciparum variaram de 180 a 1567ng/mL. Ressalta-se que alguns fatores interferem nestas concentrações, como: biodisponibilidade após administração via oral, dia após a administração do fármaco no qual o sangue foi coletado e a aderência do paciente a terapia. (NTALE et al., 2008).

A linearidade e a curva de calibração apresentaram baixa dispersão dos pontos experimentais, com relação de áreas diretamente proporcionais a concentração do analito, que foi caracterizado pelo coeficiente de correlação ( $r$ ) superior a 0,95. (Tabelas 05, 06 e 07 e Figuras 13, 14 e 15).

A precisão dos métodos avaliada a partir do coeficiente de variação apresentou valores adequados, segundo as recomendações vigentes, isto é, inferiores a 15%, tanto para o método em plasma quanto o de sangue total (Tabelas 09 e 10). (FDA, 2001; BRASIL/ANVISA, 2003)

As agencias regulamentadores não exigem a avaliação da estabilidade, por isso alguns estudos não realizaram esta análise, contudo ao se considerar o uso do papel de filtro, como suporte para matriz biológica, torna-se relevante sua avaliação. Os resultados apresentados na tabela 11 indicam perda média do analito de 21,22%, corroborando estudos realizados por Ntale et al. (2008) ao demonstrarem que os “spots” contendo LF foram estáveis por três meses a temperatura ambiente. Já Blessborn et al.(2007), constataram que o analito é estável por quatro meses em papel de filtro tratado com ácido tartárico.

Já nas amostras de plasma não foi avaliado este parâmetro, uma vez que Mansor et al. (1996) estabeleceram que a LF, nesta matriz, pode ser estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$  por três meses sem degradação significativa. Lindegardh et al. (2005) ampliaram os estudos nas amostras de plasma, demonstrando que o analito era estável a  $-20^{\circ}\text{C}$  por até quatro meses, bem como após dois ciclos de congelamento e 24 horas a temperatura ambiente. Hodel et al. (2009), indicaram que a LF em plasma não degradava em temperatura ambiente por até 48 horas. Huang et al. (2010), verificaram que o fármaco é estável no plasma por nove meses a  $-70^{\circ}\text{C}$ , e



após três ciclos de congelamento. Já as soluções padrão foram estáveis por nove meses a  $-20^{\circ}\text{C}$  e por três dias a  $22^{\circ}\text{C}$ .

Algumas modificações nos parâmetros cromatográficos estabelecidos, como proporções do solvente orgânico, pH e no fluxo da fase móvel, não alteraram significativamente a resolução da LF e do padrão interno (Tabela 12). Indicando assim, robustez adequada do método, característica indispensável para a qualidade analítica (BRITO et al., 2003).

A aplicabilidade do método foi realizada utilizando duas amostras que foram coletadas no D3 de pacientes com malária falciparum que usaram Coartem®. Os resultados foram satisfatórios, pois o método validado demonstrou ser eficaz na identificação e quantificação do analito de interesse (figura 16). As concentrações de LF obtidas (tabela 13) corroboram com Ntale et al. (2008), no qual as concentrações determinadas no D3 foram semelhantes as obtidas neste estudo.

## 7. CONCLUSÃO

-Foram otimizados os procedimentos de separação e extração líquido-líquido de lumefantrina em amostras de plasma e de sangue total adsorvidas em papel de filtro, os quais se demonstraram adequados de acordo com a recuperação média do analito;

- O padrão interno sintetizado (lumefantrina acetilada) foi adequado aos objetivos propostos;

- Os parâmetros de validação determinados seguem as recomendações do órgão regulamentador no Brasil, indicando a aplicabilidade do procedimento na determinação de lumefantrina em amostras de plasma e sangue total adsorvidas em papel de filtro;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLA, S.; SAGARA, I. A dispersible formulation of artemether/lumefantrine: specifically developed for infants and young children. **Malaria Journal**, v. 8, n.1, 2009.

ABDULLA, S.; SAGARA, I.; BORRMANN, S.; D'ALESSANDRO, U.; GONZÁLEZ, R.; HAMEL, M.; OGUTO, B.; MARTENSSON, A.; LYIMO, J.; MAIGA, H.; SASI, P.; NAHUM, A.; BASSAT, Q.; JUMA, E.; OTIENO, L.; BJORKMAN, A.; BECK, H.P.; ANDRIANO, K.; COUSIN, M.; LEFÉVRE, G.; UBBEN, D.; PREMJI, Z. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine dispersible tablets compared with crushed commercial tablets in African infants and children with uncomplicated malaria: a randomized, single-blind, multicentre trial. **The Lancet**, v. 372, n.9652, p. 1819-1827, 2008.

AGTMAEL, M.V.; BOUCHAUD, O.; MALVY, D.; DELMONT, J.; DANIS, M.; BARETTE, S.; GRAS, C.; BERNARD, J.; TOUZE, J.E.; GATHMANN, I.; MULL, R. The comparative efficacy and tolerability of CGP 56697 (artemether + lumefantrine) versus halofantrine in the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in travellers returning from the tropics to the Netherlands and France. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, p. 159-169, 1999.

ALECRIM, M.G.; LACERDA, M.V.; MOURÃO, M.P.; ALECRIM, W.D.; PADILHA, A.; CARDOSO, B.S.; BOULOS, M. Successful treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with a six-dose regimen of artemether-lumefantrine versus quinine-doxycycline in the western Amazon region Brazil. **American Journal of tropical Medicine e Higiene**, v. 74, n.1, p. 20-25, 2006.

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

ANNERBERG, A.; SINGTOROJ, T.; TIPMANEE, P.; WHITE, N.J.; DAY, N.P.J.; LINDEGARDH, N. High throughput assay for the determination of lumefantrine in plasma. **Journal of chromatography B**, v. 822, p. 330-333, 2005.

ARINAITWE, E.; SANDISON, T.G.; WANZIRA, H.; KAKURU, A.; HOMSY, J.; KALAMYA, J.; KAMYA, M.R.; VORA, N.; GREENHOUSE, B.; ROSENTHAL, P.J.; TAPPERO, J.; DORSEY, G. Artemether-Lumefantrine versus Dihydroartemisinin-piperaquine for *Falciparum* Malaria: A Longitudinal, Randomized Trial in Young Ugandan Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1629-1637, 2009.

ARTEPAL.ORG: **Especificações de drogas combinadas (Lumefantrina)**, 2007. Disponível em: <[http://www.artepal.org/index.php?option=com\\_content&task=blogcategory&id=69&Itemid=137](http://www.artepal.org/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=69&Itemid=137)>. Acesso em: 17 de março de 2009.

ASHLEY, E.A.; STEPNIEWSKA, K.; LINDEGARDH, N.; MCGREADY, R.; ANNERBERG, A.; HUTAGALUNG, R.; SINGTOROJ, T.; HLA, G.; BROCKMAN, A.; PROUX, S.; WILAHPHAINGERN, J.; SINGHASIVANON, P.; WHITE, N.J.; NOSTEN, F. Pharmacokinetic study of artemether-lumefantrina given once daily for the treatment of uncomplicated multidrug-resistant falciparum malaria. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n 2, p. 201-208, 2007a.

ASHLEY, E.A.; STEPNIEWSKA, K.; LINDEGARDH, N.; ANNERBERG, A.; KHAM, A.; BROCKMAN, A.; SINGHASIVANON, P.; WHITE, N.J.; NOSTEN, F. How much fat is necessary to optimize lumefantrine oral bioavailability? **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n 2, p. 195-200, 2007b.

ASSEFA; A.; KASSA, M.; TADESE, G.; MOHAMED, H.; ANIMUT, A.; MENGESHA, T. Therapeutic Efficacy of artemether-lumefantrine (Coartem®) against *Plasmodium falciparum* in Kersa, south west Ethiopia. **Parasit vectors**, v. 3, n.1, 2010.

BAKSHI, R.; HERMELING-FRITZ, I.; GATHMANN, I.; ALTERI, E.; An integrated assessment of the clinical safety of artemether-lumefantrine: a new oral fixed-dose combination antimalarial drug. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 94, p. 419-424, 2000.

BARNES, K.I.; CHANDA, P.; AB BARNABAS, G. Impact of the large-scale deployment of artemether/lumefantrine on the malaria disease burden in África: case studies of South África, Zambia and Ethiopia. **Malaria Journal**, v. 8, n.1, 2009.

BELL, D.J.; WOOTTON, D.; MUKAKA, M.; MONTGOMERY, J.; KAYANGE, N.; CHIMPENI, P.; HUGHES, D.A.; MOLYNEUX, M.E.; WARD, S.A.; WINSTANLEY, P.A.; LALLOO, D.G. Measurement of adherence, drug concentrations and the effectiveness of artemether-lumefantrine, chlorproguanil-dapsone or sulphadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated malaria in Malawi. **Malaria journal**, v. 8, n.204, 2009.

BINDSHEDLER M.; DEGEN, P.; LU, Z.L. Comparative bioavailability of benflumetol after administration of single oral doses of co-artemether under fed and fasted conditions to healthy subjects. **International Congress for Tropical Medicine and Malaria**, 14, Nagasaki, 1996.

BINDSCHEDLER, M.; LEFÈVRE, G.; DEGEN, P.; SIOUFI, A. comparison of the Cardiac effects of the antimalarials co-artemether and halofantrine in healthy participants. **American Journal of tropical Medicine e Higiene**, v. 66, n. 3, p. 293-298, 2002.

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

BLESSBORN, D.; BERGQVIST, Y.; RÖMSING, S.; ANNERBERG, A.; SUNDQUIST, D.; BJÖRKMAN, A.; LINDEGARDH, N. Development and validation of an automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method for determination of lumefantrine in capillary blood on sampling paper. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 45, p.282-287, 2007.

BRASIL. Centro Gestor e Operacional do Sistema de Proteção da Amazônia. Sistema de Proteção da Amazônia.(CENSIPAM/SIPAM). **Ações do governo do Estado reduzem casos de malária em Anajás**, 2008. Disponível em: <<http://www.sipam.gov.br/content/view/848/10/>> Acesso em: 18 de março de 2009.

BRASIL. Governo do Estado de Tocantins. Secretaria da Saúde (SESAU). **Sesau apresenta novo medicamento para tratamento da malária**, 2007. Disponível em:

<<http://www.saude.to.gov.br/noticia.php?codigo=1548&mesesanteriores=09/2007>> Acesso em: 12 de março de 2009.

BRASIL. Governo do Estado do Amazonas. Sistema Único de Saúde do Amazonas (SUSAM). **Malária tem novo tratamento**, 2006. Disponível em: <<http://www.saude.am.gov.br/saude/compulsorias.php>> Acesso em: 20 de dezembro de 2008.

BRASIL. Governo do Estado do Pará. Secretaria de Saúde do Estado do Pará (SESPA). **Ministro destaca parcerias na queda de 34,8% dos casos de malária**, 2008. Disponível em: < [http://www.governodopara.pa.gov.br/noticias/materia.asp?id\\_ver='31923](http://www.governodopara.pa.gov.br/noticias/materia.asp?id_ver='31923)> Acesso em: 21 de março de 2009.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos (DOQ-CGCRE-008)**, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). **Guia para Validação de Métodos Analíticos**. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

BRASIL. Ministério da saúde. Fundação nacional de saúde. **Manual de Terapêutica da Malária**. Brasília, p. 14-15, 2001.

BRASIL. Ministério da saúde. Fundação nacional de saúde. Centro nacional de epidemiologia. Secretária de vigilância em saúde. **Situação epidemiológica da Malária no Brasil 2005**, Brasil, 2005.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica **Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil**. Série A. Normas e Manuais técnicos. Brasília, p. 9-22, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de atenção básica. Cadernos de atenção Básica. **Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose**. 2ª edição, série A: Normas e Manuais Técnicos, nº 21. Brasília, p. 101-103, 2008.

BRASIL. Ministério da saúde. Sistema de vigilância em saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Sistema de informação de vigilância epidemiológica**, Brasil, 2008.

BRASIL. Ministério da saúde. Sistema de vigilância em saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Sistema de informação de vigilância epidemiológica**, Brasil, 2009.

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

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

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



CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Os mosquitos *Anopheles***, 2004. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/biology/index.htm>> Acesso em: 17 de março de 2009.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Disease**, 2006a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/disease.htm>> Acesso em: 22 de março de 2009.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Schema of the Life Cycle of Malaria**, 2006b. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/malaria/biology/life\\_cycle.htm](http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm)>. Acesso em: 17 de março de 2009.

CÉSAR, I.C.; NOGUEIRA, F.H.A.; PIANETTI, G.A. Simultaneous determination of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets by HPLC with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 951-954, 2008.

CÉSAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, abr./jun., p. 235-240, 2009.

CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.30, n. 49, 1994.

CHECCHI, F.; PIOLA, P.; FOGG, P.; BAJUNIRWE, F.; BIRARO, S.; GRANDESSO, F.; RUZAGIRA, E.; BABIGUMIRA, J.; KIGOZI, I.; KIGULI, J.; KYOMUHENDO, J.;

FERRADINI, L.; TAYLOR, W.R. Supervised versus unsupervised antimalarial treatment with six-dose artemether-lumefantrine: pharmacokinetics and dosage-related findings from a clinical trial in Uganda. **Malaria Journal**, v.5, n.59, 2006.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho-HPLC**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1998, p. 8-151.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Ed. da UNICAMP. 2006, p. 273-398.

COLUSSI, D.; PARISOT, C.; LEGAY, F.; LEFÉVRE, G. Binding of artemether and lumefantrine to plasma proteins and erythrocytes. **European journal of pharmaceutical science**, v. 9, p. 9-16, 1999.

CUNICO, W.; CARVALHO, S.A.; GOMES, C.R.B.; MARQUES, G.H. Fármacos antimalariais-história e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 89, n. 1, p. 49-55, 2008.

DJIMDÉ, A.; LEFÉVRE, G. Understanding the pharmacokinetics of Coartem®. **Malaria Journal**, v. 8, n.1, 2009.

EKLAND, E.H.; FIDOCK, D.A. *In vitro* evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 743-747, 2008.

ELAMIN, S.B.; AWAD, A.I.; ELTAYEB, I.B.; ELMARDI, K.A.; AL HASSAN, A.H.; MOHAMED, A.O.; MALIK, E.M.; MOHAMAD, T.A. Descriptive study on the efficacy of artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Sudan. **European Journal of clinical Pharmacology**, v.66, n.3, p. 231-237, 2009.

EZZET, F.; VAN VUGT, M.; NOSTEN, F.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lumefantrine (Benflumetol) in Acute *falciparum* malária. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 697-704, 2000.

EZZET, F.; MULL, R.; KARBWANG, J. Population pharmacokinetics and therapeutic response of CGP 56697 (artemether + benflumetol) in malaria patients. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, p. 553-561, 1998.

FALADE, C.; MAKANGA, M.; PREMJI, Z.; ORTMANN, C.E.; STOCKMEYER, M.; PALACIOS, P.I. Efficacy and safety of artemether-lumefantrina (Coartem®) tablets (six-dose regimen) in African infants and children with acute, uncomplicated *falciparum* malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene**, v. 99, p. 459-467, 2005.

FALADE, C.O.; OGUNKUNLE, O.O.; DADA-ADEGBOLA, H.O.; FALADE, A.G.; LAPACIOS, P.I.; HUNT, P.; VIRTANEN, M.; ODUOLA, A.M.; SALAKO, L.A. Evaluation of the efficacy and safety of artemether-lumefantrine in the treatment of acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Nigéria infantis and children. **Malaria Journal**, v. 7, n°246, 2008.

FANELLO, C.I.; KAREMA, C.; VAN DOREN, W.; VAN OVERMEIR, C.; NGAMIJE, D.; D' ALESSANDRO, U. A randomised Trial to assess the safety and efficacy of artemether-lumefantrine (Coartem®) for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Rwanda. **Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene**, v. 101, p. 344-350, 2007.

FAYE, B.; NDIAYE, J.L.; TINE, R.; SYLLA, K.; GUEYE, A.; LÔ, A.C.; GAYE, O. A randomized trial of mefloquine-artesunate versus lumefantrine-artemether for the treatment of uncomplicated malaria by *Plasmodium falciparum* in Senegalese children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 140-4, 2010.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-**Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation**, may 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance>>. Acesso em: 20 setembro de 2008.

FERNANDO, S.D; GUNAWARDENA, D.M; BANDARA, M.R; DE SILVA, D.; CARTER, R.; MENDIS, K. N.; WICKREMASINGHE, A.R.. The impact of repeated malaria attacks on the school performance of children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 582–88, 2003.

FOGG, C.; BAJUNIRWE, F.; PIOLA, P.; BIRARO, S.; CHECCHI, F.; KIGULI, J.; NAMIRO, P. ; MUSABE, J. ; KYOMUGISHA , A. ; GUTHMANN J. Adherence to a six-dose regimen of artemether-lumefantrine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Uganda. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n.5, p. 525-530, 2004.

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

FRANÇA, T.C.C.; SANTOS, M.G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

GERMAN, P.; PARIKH, S.; LAWRENCE, J.; DORSEY, G.; ROSENTHAL, P.; HAVLIR, D.; CHARLEBOIS, E.; HANPITHAKPONG, W.; LINDEGARDH, N.A.; WEEKA, F.T. Lopinavir/ritonavir affects pharmacokinetic exposure of artemether/lumefantrine in HIV-uninfected healthy volunteers. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 51, p. 424-429, 2009.

GO, M.; LI, Q. Interaction of the antimalarial agents halofantrina and lumefantrina with lipid bilayers. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 3, p. 241-246, 2003.

GOMES, M.S.M. **Monitoramento da concentração plasmática de quinina e mefloquina em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* no Estado do Amapá-Brasil**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários)-Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

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

GUTHMANN, J.P.; COHUET, S.; RIGUTTO, C.; FORTES, F.; SARAIVA, N.; KIGULI, J.; KYOMUHENDO, J.; FRANCIS, M.; NOËL, F.; MULEMBA, M.; BALKAN, S. Short report:

high efficacy of two artemisinin-based combinations (artesunate-amodiaquine and artemether-lumefantrine) in Caala, Central Angola. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n.1, p. 143-145, 2006.

HAQUE, R.; THRIEMER, K.; WANG, Z.; SATO, K.; WAGATSUMA, Y.; SALAM, M.A.; AKTHER, S.; AKTER, J.; FUKUDA, M.; MILLER, R.S.; NOEDL, H. Short report: Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Bangladesh. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n.1, p. 39-41, 2007.

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L.; MCDOWALL, R.D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 193-218, 1998.

HASTINGS, I.M. Modeling parasite drug resistance: lessons for management and control strategies. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, p. 883-890, 2001.

HATZ, C.; ABDULLA, S.; MULL, R.; SCHELLENBERG, D.; GATHMANN, I.; KIBATALA P.; BECK, H.P.; TANNER, M.; ROYCE, C. Efficacy and safety of CGP 56697 (artemether and benflumetol) compared with chloroquine to treat acute *falciparum* malaria in Tanzanian children aged 1–5 years. **Tropical Medicine and International Health**, v. 3, n. 6, p. 498–504, 1998.

HATZ, C.; SOTO, J.; NOTHDURFT, H.D.; ZOLLER, T.; WEITZEL, T.; LOUTAN, L.; BRICAIRE, F.; GAY, F.; BURCHARD, G.D.; ANDRIANO, K.; LEFÈVRE, G.; DE PALACIOS, P.I.; GENTON, B. Treatment of acute uncomplicated *Falciparum* malaria with

artemether-lumefantrine in non-immune populations: a safety, efficacy, and pharmacokinetic study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n.2, p. 241-247, 2008.

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

HENDRIKS, G. Theoretical models in LC based bioanalytical method development. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 1-10, 2009.

HIEN, T.T; WHITE, N.J. Qinghaosu. **Lancet**, v. 6, n. 341, p. 603-608, 1993.

HODEL, E.M.; ZANOLARI, B.; MERCIER, T.; BIOLLAZ, J.; KEISER, J.; OLLIARO, P.; GENTON, B. A single LC-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 14 antimalarial drugs and their metabolites. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 10, p. 867-886, 2009.

HORTELANO, M. G.L.; ASCASO, M. T. G; PEÑA, M. J. M.; ARRIETA, J.V. Associação Espanhola de Pediatria, Protocolos Diagnóstico terapêuticos de La AEP: Infectologia Pediátrica- **Patologia Infeciosa importada I: Malaria**. 2008. Disponível em: <http://www.aeped.es/protocolos/>Acesso em: 22 de julho de 2009.

HUANG, L. ; LIZAK, P. S.; JAYEWARDENE, A. L. ; MARZAN, F. ; LEE, M. T. ; AWEEKKA, F. T. A Modified Method for Determination of Lumefantrine in Human Plasma by HPLC-UV and Combination of Protein Precipitation and Solid-Phase Extraction: Application to a Pharmacokinetic Study. **Analytical Chemistry Insights**, v. 5, p. 15-23, 2010.

JORNAL GAZETA MERCANTIL. WASHINGTON - **02 de dezembro de 2008 (Caderno C - Pág. 8)**. Disponível em:< [http://www.abiquif.org.br/noticias/clipping/02\\_12\\_08\\_FDA.html](http://www.abiquif.org.br/noticias/clipping/02_12_08_FDA.html).>

Acesso em: 23 de dezembro de 2008.

JUMA, E.A.; OBONYO, C.O.; AKHWALE, W.S.; OGUTO, B.R. A randomized , open-label, comparative efficacy Trial of artemether-lumefantrine tablets for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children in western kenya. **Malaria Journal**, v.7, n. 262, 2008.

KABANYWANYI, A.M.; MWITA, A.; SUMARI, D.; MANDIKE, R.; MUGITTU, K.; ABDULLA, S. Efficacy and safety of artemisinin-based antimalarial in the treatment of uncomplicated malaria in children in southern Tanzania. **Malaria Journal**, v. 6, n.146, 2007.

KARBWANG, J.; NA-BANGCHANG, K.; CONGPUONG, K.; MOLUNTO, P.; THANAVIBUL, A. Pharmacokinetics and bioavailability of oral and intramuscular artemether. **European Journal of clinical Pharmacology**, v. 52, p. 307-310, 1997.

KATRAK, S.; GASASIRA, A.; ARINAITWE, E.; KAKURU, A.; WANZIRA, H.; BIGIRA, V.; SANDISON, T.G.; HOMSY, J.; TAPPERO, J.W.; KAMYA, M.R.; DORSEY, G. Safety and tolerability of artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for malaria in young HIV-infected and uninfected children. **Malaria Journal**, v. 8, n. 272, 2009.

KAYENTAO, K.; MAIGA, H.; NEWMAN, R.D.; MCMORROW, M.L.; HOPPE, A.; YATTARA, O.; TRAORE, H.; KONE, Y.; GUIROU, E.A.; SAYE, R.; TRAORE, B.; DJIMDE, A.; DOUMBO, O. Artemisinin-based combinations versus amodiaquine plus



sulphadoxine-pyrimetthamine for the treatment of uncomplicated malaria in Faladje, Mali.

**Malaria journal**, v. 8, n.5, 2009.

KLAYMAN, D.L.; LIN, A.J.; ACTON, N.; SCOVILL, J.P.; HOCH, J.M.; MILHOUS, W.K.; THEOHARIDES, A.D.; DOBEK, A.S. Isolation of Artemisinin (Qinghaosu) from *artemisia annua* Growing in the United States. **Journal of Natural Products**, v.7, n.4, p. 715–717, 1984.

KOBBE, R.; KLEIN, P.; ADJEI, S.; AMEMASOR, S.; THOMPSON, W.N.; HEIDEMANN, H.; NIELSEN, M.V.; VOHWINKEL, J.; HOGAN, B.; KREUELS, B.; BÜHRLIN, M.; LOAG, W.; ANSONG, D.; MAY, J. A randomized trial on effectiveness of artemether-lumefantrine versus artesunate plus amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian children. **Malaria journal**, v. 7, n.261, p. 1-12, 2008.

KRUDSOOD, S.; CHALERMRUT, K.; PENGRUKSA, C.; SRIVILAIRIT, S.; SILACHAMROON, U.; TREEPRASERTSUK, S.; KANO, S.; BRITTENHAM, G.M.; LOOAREESUWAN, S. Comparative clinical trial of two-fixed combination dihydroartemisinin-naphoquine-trimethoprim (DNP®) and artemether-lumefantrine (Coartem®/Riamet®) in the treatment of acute uncomplicated *falciparum* malaria in Thailand. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**, v. 34, n.2, p. 316-321, 2003.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna- HPLC/CLAE**. Campinas, SP: Ed. Átomo, 2009, p. 319-354.

LEFÈVRE, G.; BINDSCHEDLER, M.; EZZET, F.; SCHAEFFER, N.; MEYER, I.; THOMSEN, M.S. Pharmacokinetic interaction trial between co-artemether-and mefloquine. **European Journal of pharmaceutical Science**, v. 10, p. 141-151, 2000.

LEFÈVRE, G.; CARPENTER, P.; SOUPPART, C.; SCHMIDLI, H.; MARTIN, J.M.; LANE, A.; WARD, C.; AMAKYE, D. Interaction trial between artemether-lumefantrine (Riamet®) and quinine in healthy subjects. **The Journal of clinical pharmacology**, 42, p. 1147-1158, 2002a.

LEFÈVRE, G.; CARPENTER, P.; SOUPPART, C.; SCHMIDLI, H.; MCCLEAN, M.; STYPINSKI, D. Pharmacokinetics and electrocardiographic pharmacodynamics of artemether-lumefantrina (Riamet®) with concomitant administration of ketoconazole in healthy subjects. **British Journal of clinical pharmacology**, v. 54, p. 485-492, 2002b.

LEFÈVRE, G.; THOMSEN, M.S. Clinical pharmacokinetics of artemether and lumefantrina (Riamet®). **Clinical drug investigation**, v. 18, p. 467-480, 1999.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4ª edição. Campinas, SP: Ed. Átomo, 2002, p. 18-186.

LINDEGARDH, N.; ANNERBERG, A.; BLESSBORN, D.; BERGQVIST, Y.; DAY, N.; WHITE, N.J. Development and validation of a bioanalytical method using automated solid-phase extraction and LC-UV for the simultaneous determination of lumefantrine and its desbutyl metabolite in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 1081-1088, 2005.

MANSOR, S.M.; NAVARATNAM, V.; YAHAYA, N.; NAIR, N.K.; WERNSDORFER, W.H.; DEGEN, P.H. Determination of a new antimalarial drug, benflumetol, in blood plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 682, p.321-325, 1996.

MAY, J.; MEYER, C.G. Chemoresistance in falciparum malaria. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 10, p.432-435, 2003.

MENS, P.F.; SAWA, P.; VAN AMSTERDAM, S.M.; VERSTEEG, I.; OMAR, S.; SCHALLIG, H.D.F.H; KAGER, P.A. A randomized trial to monitor the efficacy and effectiveness by QT-NASBA of artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperazine for treatment and transmission control of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in western Kenya. **Malaria Journal**, v. 7, n. 237, 2008.

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

MOORE, S.A., SURGEY, E.G.E., CADWGAN, A.M. Malaria Vaccines: where are we and where are we going?. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p. 737-743, 2002.

MOREAU, R. L. M; SIQUEIRA, M.E.P.B. **Ciências Farmacêuticas: Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara koogan, p. 20-39/142-146, 2008.

MUELLER, E.A.; VAN VUGT, M.; KIRCH, W.; ANDRIANO, K.; HUNT, P.; PALACIOS, P.I. Efficacy and safety of the six-dose regimen of artemether-lumefantrine for treatment of

uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in adolescents and adults: A pooled analysis of individual patient data from randomized clinical trials. **Acta Tropica**, v. 100, p. 41-53, 2006.

MULENGA, M.; VAN GEERTRUYDEN, J.P.; MWANANYANDA, L.; CHALWE, V.; MOERMAN, F.; CHILENGI, R.; VAN OVERMEIR, C.; DUJARDIN, J.C.; D'ALESSANDRO, U. Safety and efficacy of lumefantrine-artemether (Coartem®) for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Zambian adults. **Malaria Journal**, v. 5, n.73, 2006.

MUTABINGWA, T.; ANTHONY, D.; HELLER, A.; HALLETT, R.; AHMED, J.; DRAKELEY, C.; GREENWOOD, B.M.; WHITTY, C.J.M. Amodiaquine alone, amodiaquine+sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine+artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in Tanzanian children: a four-arm randomized effectiveness trial. **Lancet**, v. 365, p. 1474-1480, 2005.

MUKHTAR, E.A.; GADALLA, N.B.; EL-ZAKI, S.G.; MUKHTAR, I.; MANSOUR, F.A.; BABIKER, A.; EL-SAYED, B.B. A comparative study on the efficacy of artesunate plus sulphadoxine/pyrimethamine versus artemether-lumefantrine in eastern Sudan. **Malaria journal**, v. 6, n.92, 2007.

NASCIMENTO, M.T.S. **Validação de método para determinação de cloroquina e desetilcloroquina em amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro por cromatografia líquida de alta eficiência.** Belém. 2008. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais)- Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

NOVARTIS PHARMACEUTICAL Ltd. **Coartem<sup>®</sup> in África**, 2007. Disponível em: <[http://www.novartis.com/newsroom/news/2007-04-17\\_coartem-africa.shtml](http://www.novartis.com/newsroom/news/2007-04-17_coartem-africa.shtml)> Acesso em: 02 de março de 2009.

NOVARTIS PHARMACEUTICAL Ltd. **Bula do Coartem<sup>®</sup>**, 1999.

NOVARTIS PHARMACEUTICAL Ltd. **The electronic Medicines Compendium: Riamet<sup>®</sup>**, 2008. Disponível em: <<http://emc.medicines.org.uk/medicine/9196/SPC/Riamet+20+120mg+tablets>> Acesso em: 09 de março de 2009.

NOVARTIS PHARMACEUTICAL Ltd. **Application for inclusion of artemether/lumefantrine dispersible tablets 20 mg/120 mg in the WHO Model List of Essential Medicines for Children**. WHO 17th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines Geneva, March 2009. Disponível em: <[http://www.who.int/selection\\_medicines/committees/expert/17/application/ArtemetheLumefantrine.pdf](http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/17/application/ArtemetheLumefantrine.pdf)> Acesso em: 21 de setembro de 2010.

NSOBYA, S.L.; KIGGUNDU, M.; NANYUNJA, S.; JOLOBA, M.; GREENHOUSE, B.; ROSENTHAL, P.J. *In vitro* sensitivities of *Plasmodium falciparum* to different antimalarial drugs in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n.3, p. 1200-1206, 2010.

NTALE, M.; BECK, O; OGWAL-OKENG, J.W.; MAHINDI, M.; GUSTAFSSON, L.L.. A field-adapted sampling and HPLC quantification method for lumefantrine and its desbutyl

metabolite in whole blood spotted on filter paper. **Journal of Chromatography B**, v. 876, p. 261–265, 2008.

NUNES, M.S.; FERREIRA, M.U. Diagnóstico e tratamento da malária: estado atual e perspectivas. **Revista diagnóstico e tratamento**. Ed. 1, v. 10, jan/fev/mar, 2005.

OBONYO, C.O.; JUMA, E.A.; OGUTU, B.R; VULULE, J.M.; LAU, J. Amodiaquine combined with sulfadoxine/pyrimethamine versus artemisinin-based combinations for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in África: a meta-analysis. **Royal Society of Tropical medicine and Hygiene**, v. 101, p. 117-126, 2007.

OLUFEMI, M.A.; GABRIEL, O.; SHERIFF, O.; OLADELE, A.A. Effects of Short Term Administration of Artemether –Lumefantrine on Testicular Functions and Antioxidant Defence in the Rat. **Research Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 4, n.2, p. 165-170, 2009.

OMARI, A.A.; GAMBLE, C.; GARNER, P. Artemether-lumefantrina for uncomplicated malaria: a systematic review. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, n. 2, p. 192-199, 2004.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Projeto Coartem®**, 2008. Disponível em: <[http://www.opas.org.br/prevencao/det\\_proj.cfm?id=4&idresp=8](http://www.opas.org.br/prevencao/det_proj.cfm?id=4&idresp=8)> Acesso em: 12 de março de 2009.

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

PIOLA, P.; FOGG, C.; BAJUNIRWE, F.; BIRARO, S.; GRANDESSO, F.; RUZAGIRA, E.; BABIGUMIRA, J.; KIGOZI, I.; KIGULI, J.; KYOMUHENDO, J.; FERRADINI, L.; TAYLOR, W.; CHECCHI, F.; GUTHMANN, J.P. Supervised versus unsupervised intake of six-dose artemether-lumefantrine for treatment of acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mbarara, Uganda: a randomised Trial. **Lancet**, v. 365, p. 1467-1473, 2005.

PREMJI, Z.G. Coartem®: the journey to the clinic. **Malaria Journal**, v. 8, p. 1-6, 2009.

PRICE, R.N.; UHLEMANN, A.C.; BROCKMAN, A.; MCGREADY, R.; ASHLEY, B.; PHAIPUN, L.; PATEL, R.; LAING, K., LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J.; NOSTEN, F.; KRISHNA, S. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr 1* gene copy number. **Lancet**, v.364, p. 438-447, 2004.

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

REY, L. **Os Plasmódios e a Malária: Ecologia e Epidemiologia**. In: Parasitologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, p.315-27.

RIBANI, M.; JARDIM, C.S.F.; COLLINS, C.H.; BOTTOLI, C.B.G.; MELO L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RONN, A.M.; MSANGENI, H.A.; MHINA, J.; WERNSDORFER, W.H.; BYGBJERG, I.C. High level of resistance of *Plasmodium falciparum* to sulfadoxine-pyrimethamine in children in Tanzania. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v.90, p. 179-181, 1996.

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

SAGARA, I.; DIALLO, A.; KONE, M.; COULIBALY, M.; DIAWARA, S.I; GUINDO, O.; MAIGA, H.; NIAMBELE, M.B; SISSOKO, M.; DICKO, A.; DJIMDE, A.; DOUMBO, O. K. A randomized trial of Artesunate-mefloquine versus artemether-lumefantrine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Mali. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n.7, p. 655-661, 2008.

SAGARA,I.; RULISA, S.; MBACHAM, W.; ADAM, I.; SISSOKO, K.; MAIGA, H.; TRAORE, O.B.; DARA, N.; DICKO, Y.T.; DICKO, A.; DJIMDÈ, A.; JANSEN, F.H.; DOUMBO, O.K. Efficacy and safety of a fixed dose artesunate-sulphamethoxypyrazine-pyrimethamine compared to artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria across Africa: a randomized multi-centre trial. **Malaria journal**, v. 8, n.63, 2009.



SAGARA,I.; DICKO, A.; DJIMDÈ, A.; GUINDO, O.; KONE, M.; TOLO, Y.; THERA, M.A.; SOGOBA, M.; FOFANA, M.; OUATTARA, A.; SISSOKO, M.; JANSEN, F.H.; DOUMBO, O.K. A randomized trial of artesunate-sulfamethoxypyrazine-pyrimethamine versus artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mali. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n.4, p. 630-636, 2006.

SCHMIDT, L.E; DALHOFF, K. Food-drug interactions. **Drugs**, v. 62, p. 1481-1502, 2002.

SILVA, R.S.U. **Estudo de dose adequada da droga RO 42-1611 (Arteflene) no tratamento da malária por *Plasmodium falciparum***. Belém. 1997. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais)-Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, 1997.

SILVA, T.H.A.; OLIVEIRA, M.T.; SANTOS, H.F.; OLIVEIRA, A.B.; ALMEIDA, W.B. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricos: proposta de um farmacóforo. **Química Nova**, v. 28, p. 244-49, 2005.

SINGH, H.; DULHANI, N.; KUMAR, B.N.; TIWARI, P. A comparative study of artesunate-lumefantrine VS. cloroquine-pyrimethamine-sulfadoxine efficacy for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* tribal population in Bastar (Chhattisgarh). **The internet Journal of Pharmacology**, v. 8, n.1, 2010.

SIPIILANYAMBE, N.; SIMON, J.L; CHANDA, P.; OLUMESE, P.; SNOW, R.W.; HAMER, D.H. From chloroquine to artemether-lumefantrine: the process of drug policy change in Zambia. **Malaria Journal**, v. 7, n.25, 2008.

SKELTON-STROUD, P.; MULL, R. The Novartis Co-artemether International Development Team. Positioning, labelling, and medical information control of co-artemether tables (CGP 56697): a fixed novel combination of artemether and benflumetol. **Medicine tropical** (mars), v. 58, p. 77-81, 1998.

SNOW, R.W.; KORENKROMP, E.L.; GOUWS, E. Pediatric mortality in África: *Plasmodium falciparum* malaria as a cause or risk. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 16-24, 2004.

SOWUNMI, A.; GBOTOSHO, G.O.; HAPPI, C.T.; ADEDEJI, A.A.; FEHINTOLA, F.A.; FOLARIN, O.A.; TAMBO, E.; FATEYE, B.A. Therapeutic efficacy and effects of artemether-lumefantrine and amodiaquine-sulfalene-pyrimethamine on gametocyte carriage in children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southwestern Nigeria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n.2, p. 235-241, 2007.

SOWUNMI, A; BALOGUN, T.; GBOTOSHO, G.O.; HAPPI, C.T.; ADEDEJI, A.A.; BOLAJI, O.M.; FEHINTOLA, F.A.; FOLARIN, O.A. Activities of Artemether-Lumefantrine and Amodiaquine-Sulfalene-Pyrimethamine against Sexual-Stage Parasites in *Falciparum* Malaria in Children. **Chemotherapy**, v.54, n.3, p. 201-208, 2008.

STEKETEE, R.W; NAHLEN, B.L; PARISE, M.E; MENENDEZ, C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** , v. 64, p. 28–35, 2001.

SUH, K.N.; KAIN, K. C.; KEYSTONE, J. S. Malaria. **Canadian Medical Association Journal**, v. 170, n. 11, p. 1693-702, 2004.

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

THAPA, S.; HOLLANDER, J.; LINEHAN, M.; COX-SINGH, J.; BISTA, M.B.; THAKUR, G.D.; DAVIS, W.A.; DAVIS, T.M.E. Comparison of Artemether-lumefantrine with sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in eastern Nepal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n.3, p. 423-430, 2007.

TOOVERY, S. Effectiveness of co-artemether in an unsupervised outpatient setting for the treatment of *falciparum* malaria. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 6, p. 29-31, 2008.

TOOVEY, S.; JAMIESON, A. Audiometric changes associated with the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria with co-artemether. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 261-267, 2004.

TOOVEY, S. Effects of weight, age, and time on artemether-lumefantrine associated ototoxicity and evidence of irreversibility. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 4, p. 71-76, 2006.

TUTEJA R. Malaria- an overview. **The FEBS Journal**, v. 274, p. 4670-4679, 2007.

VALE N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da Malária: um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química**, v. 099, p. 57-69, out/dez, 2005.

VALECHA, N.; SRIVASTAVA, P.; MOHANTY, S.S.; MITTRA, P.; SHARMA, S.K.; TYAGI, P.K.; PRADHAN, K.; DEV, D.; SINGH, R.; DASH, A.P.; SHARMA, Y.D. Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine in uncomplicated falciparum malaria in Índia. **Malaria Journal**, v. 8, n.107, 2009.

VAN DEN BROEK, I.V.; MAUNG, U.A.; PETERS, A.; LIEM, L.; KAMAL, M.; RAHMAN, M.; RAHMAN, M.R.; BANGALI, A.M.; DAS, S.; BARENDIS, M.; FAIZ, A.M. Efficacy of chloroquine+sulfadoxine-pyrimethamine, mefloquine+artesunate and artemether+lumefantrine combination therapies to treat *Plasmodium falciparum* malaria in the Chittagong Hill tracts, Bangladesh. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 727-735, 2005.

VAN VUGT, M.; BROCKMAN, A.; GEMPERLI, B.; LUXEMBURGER, C.; GATHMANN, L.; ROYCE, C.; SLIGHT, T.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J.; NOSTEN, F. Randomized comparison of artemether-benflumetol and artesunate-mefloquine in treatment of multidrug-resistant *falciparum* malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p.135–139, 1998.

VAN VUGT, M.; WILAIRATANA, P.; GEMPERLI, B.; GATHMANN, I.; PHAIPUN, L.; BROCKMAN, A.; LUXEMBURGER, C.; WHITE, N.J.; NOSTEN, F.; LOOAREESUWAN, S. Efficacy of six doses of artemether-lumefantrine (benflumentol) in the treatment of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 936-942, 1999a.

VAN VUGT, M.; EZZET, F.; NOSTEN, F.; GATHMANN, I.; WILAIRATANA, P.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J. No evidence of cardiotoxicity during antimalarial treatment with artemether-lumefantrine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n°6, p. 964-967, 1999b.

ZENG, M.; LU, Z.; YANG, S.; ZHANG, M.; LIAO, J.; LIU, S.; TENG, X. Determination of benflumetol in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of chromatography B: Biomedical Applications**, v. 681, p. 299-306, 1996.

ZONGO, I.; DORSEY, G.; ROUAMBA, N.; TINTO, H.; DOKOMAJILAR, C.; GUIGUEMDE, R.T.; ROSENTHAL, P.J.; QUEDRAOGO, J.B. Artemether-lumefantrine versus amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated *falciparum* malaria in Burkia Faso: a randomized non-inferiority trial. **Lancet**, v. 369, p. 491-498, 2007.

WASUNNA, B.; ZUROVAC, D.; GOODMAN, C.A.; SNOW, R.W. Why don't health workers prescribe ACTs? A qualitative study of factors affecting the prescription of artemether-lumefantrine. **Malaria Journal**, v.7, 2008.

WERNSDORFER, W.H.; LANDGRAF, B.; KILIMALI, V.A.E.B.; WERNSDORFER, G. Activity of benflumetol and its enantiomers in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from East Africa. **Acta tropica**, v. 70, p. 9-15, 1998.

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

WHITE, N. J.; VAN VUGT, M.; EZZET, F. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 37, p. 105-125, 1999.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 8, p. 1084-1092, 2004.

WINSTANLEY, P. A.; WARD, S.A.; SNOW, R.W. Clinical status and implications of antimalarial drug resistance. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 157-164, 2002.

WONG, R.P.; LAUTU, D.; TAVUL, L.; HACKETT, S.L.; SIBA, P.; KARUNAJEEWA, H.A.; LLETT, K.F.; MUELLER, I.; DAVIS, T.M. *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to conventional and novel antimalarial drugs in Papua New Guinea. **Tropical Medicine & International Health**, v. 15, n.3, p. 342-349, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO and Novartis join forces to combat drug resistant malaria**, 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/inf-pr-2001/en/pr2001-26.html>>

>Acesso em: 25 de fevereiro de 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of Malaria**, 2006a. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>>. Acesso em: 17 de março de 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Facts on ACTs**, 2006b. Disponível em: <[http://rbm.who.int/cmc\\_upload/0/000/015/364/RBMInfosheet\\_9.htm](http://rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/364/RBMInfosheet_9.htm)> Acesso em: 06 de novembro de 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**. Geneva 27: World Health Organization, 2008. Disponível em: <<http://malaria.who.int/wmr2008/malaria2008.pdf>> Acesso em: 21 de março de 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2009**. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2009/en/index.html](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html)>. Acesso em: 01 de agosto de 2010.

YEUNG, S.; WHITE, N.J. How do patients use antimalarial drugs? A review of the evidence. **Tropical Medicine and International Health**, v. 10, p. 121-138, 2005.

# ANEXOS



## ANEXO A

### Termo de consentimento livre e esclarecido

**PROJETO: Validação de metodologia analítica para determinação de lumefantrina adsorvida em papel de filtro, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum*.**

A malária é uma doença causada por um parasita chamado Plasmodio que é um ser vivo tão pequeno que só conseguimos vê-lo com a ajuda de lentes de aumento. Essa doença é transmitida através da picada de um mosquito.

As primeiras manifestações são debilidade física, febre, enjoão e vômitos. Se não tratada corretamente, a malária pode causar sérios problemas à saúde das pessoas, como afetar os rins, fígado e cabeça.

Você tem um tipo de malária que foi causada pelo *Plasmodium falciparum*, e por isso precisou tomar o medicamento chamado Coartem<sup>®</sup>, no qual há dois compostos: arteméter e lumefantrina.

Essa pesquisa é para sabermos a quantidade de lumefantrina que permanece no seu sangue, depois de ter tomado os remédios. Para isso, haverá a necessidade de coleta de sangue, através de um pequeno furo no seu dedo indicador. Após coleta, realizada no Instituto de Medicina Tropical de Manaus, as amostras serão aplicadas em um papel de filtro e transportadas em envelopes para análise no Laboratório de Toxicologia, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

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

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

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

---

Pesquisadora: Priscila de Nazaré Quaresma Pinheiro  
End: Rua Augusto Correa nº01; Fone: 3201-7733/UFPA

### Termo de consentimento livre e esclarecido

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

Belém, \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

---

Assinatura do Responsável

**Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-CCS/UFPA) - Complexo de Sala de Aula/ CCS – Sala 13 - Campus Universitário, nº 01, Guamá – CEP: 66075-110 - Belém-Pará. Tel/Fax. 3201-8028. E-mail: cepccs@ufpa.br**



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



Carta Provisória: 099/09 CEP-ICS/UFPA

Belém, 09 de outubro de 2009.

À:  
Prof<sup>ra</sup>. Priscila de Nazaré Quaresma Pinheiro

Senhora Pesquisadora,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa "**Validação de metodologia analítica para a determinação de lumefantrina adsorvida em papel de filtro, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum***" de CAAE 0011.0.073.000-09 e parecer nº 091/09 CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, na reunião do dia 07 de outubro de 2009.

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

Atenciosamente,

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