



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

PATRÍCIA MARQUES DE ATAÍDE

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE), PARA DETERMINAÇÃO DE MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL ADSORVIDAS EM PAPEL DE FILTRO, EM PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium falciparum*.

BELÉM

2010

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) -
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical, Belém-PA**

Ataíde, Patrícia Marques de

Validação de metodologia analítica , por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para determinação de mefloquina e carboximefloquina em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro, em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* / Patrícia Marques de Ataíde; Orientador; José Luiz Fernandes Vieira. – 2010.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2010.

1. Malária.2. Mefloquina. 3. Carboximefloquina.3. Antimaláricos. I. Vieira, José Luiz Fernandes, orient. II. Título.

CDD 21ed. 616.9362

Ficha catalográfica elaborada por Valdenira Moreira, NMT/UFGA

PATRÍCIA MARQUES DE ATAÍDE

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE), PARA DETERMINAÇÃO DE MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL ADSORVIDAS EM PAPEL DE FILTRO, EM PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium falciparum*.

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais, Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará.

Área de concentração: Patologia das Doenças Tropicais
Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira.

BELÉM

2010

PATRÍCIA MARQUES DE ATAÍDE

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE), PARA DETERMINAÇÃO DE MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL ADSORVIDAS EM PAPEL DE FILTRO, EM PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium falciparum*.

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais, Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará.

Área de Concentração: Patologia das Doenças Tropicais

Data de Aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira (Orientador)
Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Maria da Conceição do Nascimento Pinheiro
Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira
Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde - UFPA

Prof. Dr. Flávio Vasconcelos
Faculdade de Farmácia - UFPA

DEDICATÓRIA

A Deus que é a fonte de toda sabedoria;

Aos meus pais, Reinaldo e Marilena, pelo carinho, incentivo, valores e princípios de vida que me ensinaram ao longo da minha vida;

Aos meus irmãos: Reinaldo Jr., Renato, Débora, Danilo e Mariana por estarem sempre presentes em minhas conquistas;

A minha tia, Rejane (in memoriam), grande incentivadora dos meus projetos, por ter me ensinado a ter perseverança e sempre tentar me aproximar da perfeição em tudo que fizer, nossa quanta saudade!

A Maria do Carmo, por todos os cuidados e proteção desde o meu nascimento;

A minha afilhada Isolda, pelo companheirismo e paciência, sempre ao meu lado;

A minha família que mora em Maceió e Recife, por todo seu amor e carinho ao longo dessa vida de constantes separações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as minhas conquistas;

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

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

Ao meu orientador, prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira, por acreditar que eu seria capaz, pela oportunidade, orientação e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico e intelectual, expresse meus sinceros agradecimentos;

Agradeço aos meus companheiros de laboratório: Juan, Priscila, Tânia, Michele, Margarete e Luís Fábio pelo grande auxílio e pelos momentos descontraídos durante esta jornada;

A amiga Larissa, que desde o início me incentiva e pela sua constante disponibilidade em ajudar;

A Dra. Anilce, colega de trabalho, pelo carinho e paciência durante os momentos que precisei estar ausente;

Ao José Maria, colega de trabalho, pela grande ajuda prestada no decorrer do curso;

A bibliotecária Maria do Carmo, pela grande ajuda na revisão e normatização deste trabalho;

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

*“Que eu jamais esqueça que Deus me ama infinitamente,
que um pequeno grão de alegria e de esperança dentro de
cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa,
pois a vida é construída nos sonhos e concretizada no
amor”*

Francisco Cândido Xavier

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição global do risco de transmissão da malária, 2006	17
Figura 2 -	Mapa do Risco de Transmissão (IPA) da Malária.....	19
Figura 3 -	Esquema do ciclo biológico da malária humana e indicação do local de ação da mefloquina	21
Figura 4 -	Estrutura química da mefloquina.....	25
Figura 5 -	Cromatograma das soluções padrões de mefloquina (25 µg/mL) (C), carboximefloquina (25 µg/mL) (B) e quinidina (21 µg/mL) (A), segundo condições cromatográficas previamente padronizadas	42
Figura 6 -	Representação gráfica da linearidade da mefloquina	44
Figura 7 -	Representação gráfica da linearidade da carboximefloquina	45
Figura 8 -	Curva de calibração da mefloquina no plasma	46
Figura 9 -	Curva de calibração da carboximefloquina no plasma	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros cromatográficos utilizados para validação da metodologia	41
Tabela 2 -	Tempo de retenção das soluções padrões de mefloquina (25 µg/mL), carboximefloquina (25 µg/mL) e quinina (21 µg/mL), segundo condições cromatográficas previamente padronizadas	41
Tabela 3 -	Medicamentos com seus respectivos tempos de retenção para identificar a possível interferência de quimioterápicos administrados em associação com mefloquina	43
Tabela 4 -	Linearidade da mefloquina	43
Tabela 5 -	Linearidade da carboximefloquina	44
Tabela 6 -	Curva de calibração da mefloquina no plasma	45
Tabela 7 -	Curva de calibração da carboximefloquina no plasma	46
Tabela 8 -	Precisão intraensaio e interensaio da mefloquina, expressa como coeficiente de variação	48
Tabela 9 -	Precisão intra ensaio e inter ensaio da carboximefloquina, expressa como coeficiente de variação	48
Tabela 10 -	Recuperação absoluta do método de extração sem separação overnight de diferentes concentrações de mefloquina e carboximefloquina	49
Tabela 11 -	Recuperação absoluta do método de extração com overnight para a determinação de diferentes concentrações de mefloquina e carboximefloquina	49
Tabela 12 -	Estabilidade da mefloquina e carboximefloquina no plasma após ciclos de congelamento e à temperatura ambiente	50
Tabela 13 -	Avaliação da interferência do pH da fase móvel no tempo de retenção da mefloquina, carboximefloquina e do padrão interno (quinidina)	50
Tabela 14 -	Concentrações plasmáticas de mefloquina e carboximefloquina (µg/mL) em D3 após a instituição da terapia, em pacientes com malária <i>falciparum</i> , oriundas do ambulatório/Laboratório do Programa de Ensaio Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas, no período de janeiro a julho de 2009	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA	17
2.2 VETORES DA MALÁRIA	19
2.3 AGENTES ETIOLÓGICOS DA MALÁRIA	20
2.4 CICLO BIOLÓGICO DA MALÁRIA HUMANA E BIOLOGIA DO PARASITA	21
2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA	23
2.6 ASPÉCTOS FARMACOLÓGICOS DA MEFLOQUINA	24
2.6.1 Estrutura química e propriedades físico-químicas da mefloquina	24
2.6.2 Farmacocinética da mefloquina	25
2.6.2.1 Absorção	25
2.6.2.2 Distribuição	25
2.6.2.3 Biotransformação	26
2.6.2.4 Excreção	26
2.6.3 Mecanismo de ação da mefloquina	26
2.6.4 Efeitos adversos	27
2.7 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....	28
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 GERAL	32
4.2 ESPECÍFICOS	32
5 CASUÍSTICA E MÉTODO	33
5.1 CASUÍSTICA	33
5.1.1 Critérios de inclusão	33
5.1.2 Critérios de exclusão	33
5.2 AMOSTRA	34
5.3 ESQUEMA TERAPÊUTICO	34
5.4 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	34
5.5 REAGENTES E SOLVENTES	35
5.6 SOLUÇÕES PADRÃO	35
5.6.1 Soluções estoque	35
5.6.2 Soluções de trabalho	35
5.6.3 Amostras controle	36
5.7 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	36
5.8 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	36
5.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	37
5.9.1 Seletividade	37
5.9.2 Linearidade e curva de calibração	37
5.9.3 Limite de detecção e de quantificação	38
5.9.4 Precisão intra-ensaio e interensaio	38
5.9.5 Recuperação	39
5.9.6 Estabilidade	39
5.9.7 Robustez	39
5.9.8 Aplicação	23

5.9.9 Aplicação do método validado em papel de filtro contendo sangue total de pacientes com malária <i>falciparum</i>	40
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5.11 ASPECTOS ÉTICOS	40
6 RESULTADOS	41
6.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	41
6.2 PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO	42
6.2.1 Seletividade	42
6.2.2 Linearidade e curva de calibração	43
6.2.3 Limite de detecção	47
6.2.4 Limite de quantificação	47
6.2.5 Precisão do método	47
6.2.6 Recuperação	48
6.2.7 Estabilidade	49
6.2.8 Robustez.....	50
6.2.9 Determinação de mefloquina e carboximefloquina em pacientes com malária <i>falciparum</i>	51
7 DISCUSSÃO	52
8 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	65

RESUMO

Dentre os principais desafios para o controle da malária no Brasil e no mundo, o advento da resistência do plasmódio, em especial do *Plasmodium falciparum*, se apresenta como o de maior relevância. A mefloquina é o fármaco de primeira linha para o tratamento da malária falciparum, e a disponibilidade de métodos sensíveis e baixo custo para monitorização das concentrações sanguíneas do fármaco e da carboximefloquina auxilia na otimização dos esquemas terapêuticos. Neste sentido, foi validada metodologia analítica, de acordo com parâmetros sugeridos pelos órgãos regulamentadores oficiais, para determinação de mefloquina e seu derivado carboxilado em amostra de sangue total adsorvida em papel de filtro. Foi empregado cromatografia líquida de alta eficiência após extração líquido-líquido dos analitos de interesse. A detecção foi realizada em $\lambda = 222\text{nm}$. Não foi observada interferência de outros antimaláricos comumente utilizados. O método foi linear em intervalo de concentração de 0,25 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$, para mefloquina e seu derivado carboxilado. O limite de detecção foi de 35 ng/mL e do de quantificação de 70 ng/mL , para mefloquina e carboximefloquina, respectivamente. A precisão intra ensaio média foi $31\pm 4\%$ para mefloquina e de $21\pm 5\%$ para carboximefloquina. A precisão inter ensaio média foi de $38\pm 4\%$ para mefloquina e de $25\pm 7\%$ para carboximefloquina. A recuperação média para concentrações de mefloquina variando de 0,25 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ foi de $83\pm 14\%$, e de carboximefloquina nas concentrações de 0,375 a 3740 $\mu\text{g/mL}$ foi de $88\pm 11\%$. O fármaco foi estável nas amostras adsorvidas em papel de filtro pelo período de um mês. O método foi robusto para pequenas variações de pH da fase móvel. Para avaliar a aplicabilidade do método foi realizada determinação dos analitos em amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro de pacientes com malária falciparum. A concentração média de mefloquina foi de $0,861\pm 0,723\ \mu\text{g/mL}$ e de carboximefloquina de $0,472\pm 0,086\ \mu\text{g/mL}$. Os parâmetros de validação da metodologia analítica seguem as recomendações propostas pelos órgãos oficiais sendo o método adequado para determinação de mefloquina e carboximefloquina em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro.

Palavras-chave: Malária. Mefloquina. Carboximefloquina. Validação de método. Monitorização.

ABSTRACT

Among the main challenges for malaria control in Brazil and in the world, the advent of resistance to the *Plasmodium*, particularly *Plasmodium falciparum*, is presented as the most relevant. Mefloquine is a drug of first line for the treatment of falciparum malaria, and the availability of sensitive methods and low cost for monitoring of blood concentrations of the drug and carboxymefloquine assists in the optimization of drug regimens. In this sense, analytical methodology was validated in accordance with the parameters suggested by official regulatory agency for determination of mefloquine and its carboxylated derivative on the whole blood sample adsorbed on filter paper. The method was employed using High Performance Liquid Chromatography after liquid-liquid extraction of the analytes. The detection was performed at 222nm. No interference was observed in other antimalarials commonly used. The method was linear in concentration range from 0.25 to 2.5 $\mu\text{g/mL}$ for mefloquine and its carboxylated derivative. The detection and quantification limits were 35 ng/mL and 70 ng/mL for mefloquine and carboxymefloquine, respectively. The average intra assay precision was $31\pm 4\%$ for mefloquine and $21\pm 5\%$ for carboxymefloquine. The average inter assay precision was $38\pm 4\%$ for mefloquine and $25\pm 7\%$ for carboxymefloquine. The average of recovery for concentrations of mefloquine ranging from 0.25 to 2.5 $\mu\text{g/mL}$ was $83\pm 14\%$ and carboxymefloquine varying from 0.375 to 3740 $\mu\text{g/mL}$ was $88\pm 11\%$. The drug was stable in samples adsorbed on filter paper for a period of a month. . The method showed to be robust for small changes on pH of the mobile phase. To evaluate the applicability of the method was performed determination of analytes in blood samples adsorbed on filter paper from patients with falciparum malaria. The average concentration of mefloquine was $0.861\pm 0.723 \mu\text{g/mL}$ and carboxymefloquine $0.472\pm 0.086 \mu\text{g/mL}$. The validation parameters of the analytical methodology followed the recommendations proposed by the official agencies and the method showed to be appropriate for determination of mefloquine and carboxymefloquine in whole blood samples adsorbed on filter paper.

Keywords: malaria, mefloquine, carboxymefloquine, validation method, monitoring.

1 INTRODUÇÃO

A malária tem persistido, ao longo dos anos, como relevante endemia no Mundo. Hipócrates relacionou as manifestações clínicas com as estações do ano e os locais onde os doentes habitavam (BRUCE-CHWATT, 1980). Os povos antigos acreditavam que era causada por emanções e miasmas oriundas dos pântanos. Desta forma, a expressão inicial usada para se referir a doença era de “mal aire”, de origem italiana que significa mau ar, insalubre ou que pode trazer doenças (SUCEN, 2000).

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

Atualmente a malária é considerada importante problema de saúde pública para 2,4 bilhões de pessoas, o que representa mais de 40% da população do mundo em mais de 90 países de regiões tropicais e sub-tropicais. É responsável por mais de um milhão de óbitos ao ano, a maioria em gestantes e crianças, que são os grupos de risco para a forma grave da doença, cuja ocorrência anual é de dois a três milhões. Nas áreas endêmicas, os casos durante a gravidez são responsáveis por cerca de 25% dos episódios de anemia materna grave e 10-20% de baixo peso ao nascer (BRUCE-CHWATT, 1980; KAGER, 2002; WHITTY et al, 2008).

Apesar da maioria das mortes ocorrerem na África, evidências indicam que o número de episódios clínicos pela malária *falciparum* é superior ao anteriormente citado, e a mortalidade na Ásia é amplamente subnotificada, incluindo os casos pelo *Plasmodium vivax* (CDC, 2005). É uma doença global, porém difere em suas características em um mesmo País, portanto a adoção de uma única estratégia de controle não poderá ser aplicável para todas as regiões. Sendo assim, para implantação de políticas de controle da doença é importante que se considere fatores biológicos, antropológicos, culturais e sociais, como as características da

população, intensidade e periodicidade da transmissão, espécies do parasito e sua sensibilidade aos antimaláricos, espécies do mosquito vetor, mudanças sociais e ecológicas e a operacionalização do serviço de saúde local (PHILLIPS, 2001).

Os principais desafios para o controle da malária no Brasil e no mundo são: o aumento acelerado das populações nas áreas endêmicas, as migrações para regiões de transmissão, a degradação ambiental que causa desequilíbrio ecológico, o desmatamento e a formação de novos criadouros para o vetor, carência de políticas e estratégias adequadas para o controle da infecção e o advento da resistência do plasmódio, em especial do *P. falciparum* às drogas antimaláricas e do vetor aos principais inseticidas disponíveis no mercado (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2005; VITTOR et al., 2006). Somam-se as dificuldades para produção de vacinas eficazes assim como a diminuição dos recursos financeiros para produção de novos quimioterápicos (CRAVO; ROSÁRIO, 2002).

As manifestações clínicas da doença levam a diminuição do nível educacional e produtividade dos pacientes devido à incapacidade de participação nas atividades escolares e ocupacionais. Cerca de 76% dos anos de vida produtiva são perdidos em decorrência da malária quando comparado as doenças degenerativas nos países economicamente desenvolvidos (PHILLIPS, 2001). O efeito econômico do paludismo é elevado, estimativas demonstraram que o Produto Interno Bruto (PIB), diminuiu 2% nos Países onde a doença era endêmica, em relação àqueles nos quais os casos são importados (GREENWOOD et al, 2005).

A malária é transmitida através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, infectado pelo *Plasmodium*. No Brasil, três espécies principais causam a doença: *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*, esta última responsável pela forma mais grave da doença. Também conhecida como paludismo, é uma doença infecciosa febril aguda, caracterizada por febre alta acompanhada de calafrios, sudorese e cefaléia, que ocorrem em padrões cíclicos, conforme a espécie do parasita infectante (BRASIL/MS/SAS, 2008).

A quinina, alcalóide, ativo extraído da casca da *Cinchona* sp., foi por longo período utilizada no tratamento da malária. Contudo as dificuldades do fornecimento em larga escala, principalmente durante os períodos de guerra, estimularam pesquisadores à obtenção de

antimaláricos sintéticos, culminando com o desenvolvimento da pamaquina (1924), mepacrina (1930) e cloroquina (1934) (DUTRA, 2001).

Na década de 60, surgiram cepas de *plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina (WERNSDOFER, 1991). Neste sentido, em 1971 foi desenvolvida a mefloquina por Ohnmacht e colaboradores do programa *Walter Reed Institute for Medical Research*, objetivando combater tais cepas (SALLES; SALLES, 2000). A quimioterapia objetiva abolir o ciclo de reprodução do parasita, agindo em diversas etapas deste, como na interrupção da esquizogonia sanguínea. Sendo assim, dentre os vários medicamentos utilizados, a mefloquina se destaca por sua ação nas formas eritrocitárias do parasita (BRASIL/MS/FNS, 2001).

A associação quinina e doxiciclina foi implantada no Brasil para o tratamento da malária *falciparum* não complicada há vários anos, entretanto, estudo recente apontou eficácia inferior a 90% abaixo daquela recomendada pela Organização Mundial de Saúde. No estado do Pará, foi demonstrada redução na adesão a este tratamento para 75%. Em 2005, foram inseridos novos esquemas terapêuticos, como a associação mefloquina e artesunato, cuja eficácia atualmente se aproxima de 100% (BRASIL/MS/SVS, 2007).

No Brasil, o cloridrato de mefloquina é distribuído sob supervisão da Fundação Nacional de Saúde em comprimidos contendo 274 mg do sal, equivalente a 250 mg de mefloquina-base. Apresentada na forma de Lariam (Roche®) e Mephaquin (Mepha®). A dose recomendada pelo Ministério da Saúde é de 15-20 mg/kg em adultos e não deve ser utilizada em menores de 6 meses de idade ou pesando menos de 15 kg (BRASIL/MS/FNS, 2001).

Ao se considerar a ausência de novos medicamentos, existe um esforço contínuo na busca por estratégias de baixo custo e eficazes para o aperfeiçoamento das políticas de tratamento e controle da doença, sendo a monitorização das concentrações plasmáticas dos antimaláricos uma importante ferramenta a qual requer métodos analíticos sensíveis, de fácil execução e baixo custo. Neste sentido, propõe-se neste estudo a validação de metodologia analítica para determinação das concentrações de mefloquina e carboximefloquina em amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

A doença se distribui pelas regiões tropical e sub-tropical do planeta (Figura 1). A maior área de transmissão é a África-Sub-Sahariana onde ocorrem 90% dos casos. É endêmica em 53 países da África, 21 das Américas, 4 da Europa e 14 no Leste do Mediterrâneo e no Sudoeste Asiático (MUTABINGWA, 2002; GREENWOOD, 2005).

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

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

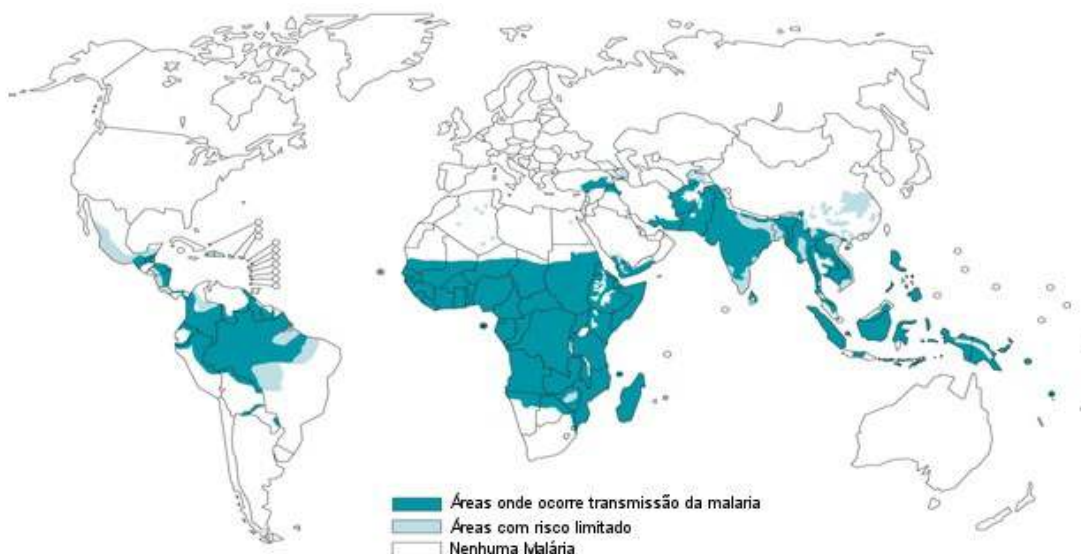


Figura 1: Distribuição global do risco de transmissão da malária, 2006
Fonte: WHO, 2007.

Mais de dois bilhões de pessoas, representando mais de 40% da população mundial, estão em risco de contrair a doença nas regiões onde a temperatura e os índices pluviométricos favorecem a disseminação dos vetores, o que aliado às condições econômicas regionais, propiciam a continuidade da endemia (WHITTY et al., 2008). A malária foi endêmica na Europa Ocidental e Estados Unidos, entretanto, atualmente são observados apenas casos importados das áreas endêmicas, o que está associado ao desenvolvimento econômico e às medidas de cuidados da saúde da população (GREENWOOD et al., 2008).

Em 2007, 547.659 episódios foram diagnosticados no Brasil, destes 99,9% na Amazônia Legal (BRASIL/MS/SAS, 2008). A situação epidemiológica atual é preocupante, apesar do declínio no número absoluto de casos, no ano de 2008 ainda foi superior a 300.000 pacientes em todo o País. Destes, 99,9% transmitidos nos Estados da Amazônia Legal, sendo o *P. vivax* a espécie causadora de cerca de 90%. No entanto, a transmissão do *P. falciparum*, sabidamente responsável pela forma grave e letal da doença, tem apresentado redução importante nos últimos anos, o que é refletido na diminuição da frequência das internações pela doença no Brasil, ficando em 1,3% no ano de 2008, enquanto em 2003 foi de 2,6%. A distribuição espacial do risco de transmissão da doença no Brasil é apresentada na Figura 2. (BRASIL/MS/SVS, 2010)

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde demonstram queda expressiva dos casos na região da Amazônia Brasileira. No período de janeiro a setembro de 2008, foram notificados 241.420 episódios da doença, e, em 2007, no mesmo período, 362.518, equivalente a redução de 33,4%. Neste período, o Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica (Sivep-Malária) do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) registrou diminuição de 50,3% da infecção pelo *P. falciparum*, principal responsável pela forma grave da doença. Foram 74.808 casos, em 2007, e 37.200, em 2008 (SIVEP-MALÁRIA; DATASUS, 2009).

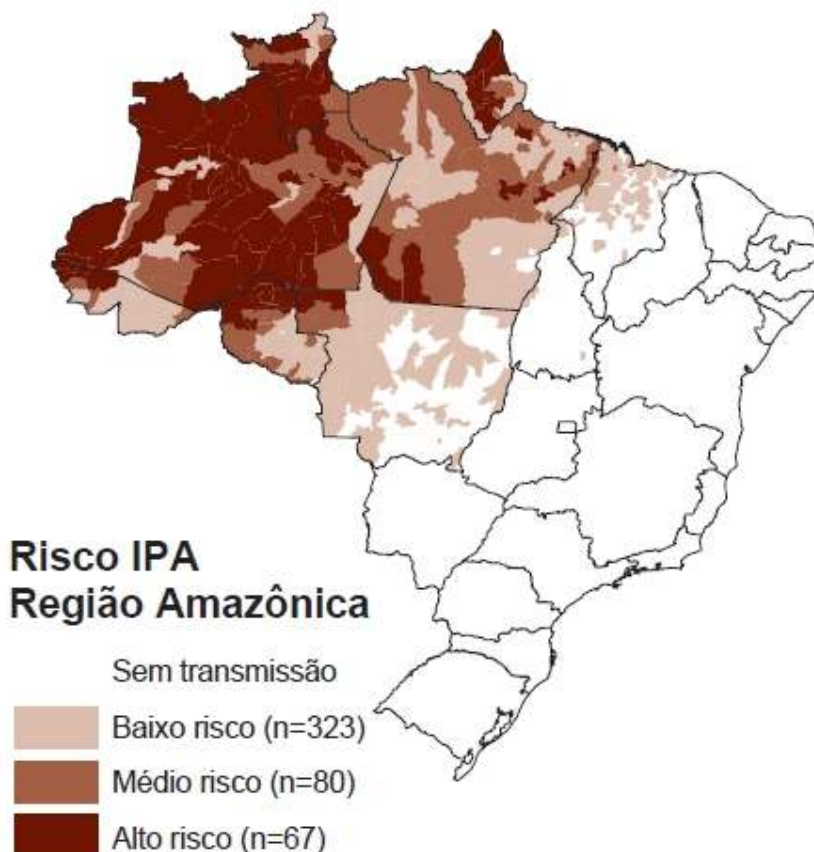


Figura 2: Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual.
Fonte: BRASIL/MS/SVS, 2010

2.2 VETORES DA MALÁRIA

São insetos da ordem Diptera, família Culicidae, gênero *Anopheles* (RUSSEL et al, 1946; FORANTTINI, 1962). Existem aproximadamente 400 espécies de *Anopheles* em todo o mundo, destes cerca de 60 são vetores da doença nas condições naturais, dos quais 30 têm relevância epidemiológica (TUTEJA, 2007).

No Brasil, as principais espécies transmissoras pertencem a dois subgêneros: *Nyssorhincus*, destacando-se as espécies *Anopheles (N) darlingi* Root, 1926 e *Anopheles (N) aquasalis* Curry, 1932, e o *Anopheles (N) albitarsis*, Arribalzaga, 1878; e o subgênero

Kerteszia, com as principais espécies *A. (K) cruzzi*, Dyar; Knab, 1908 e *A. (K) bellator*, Dyar; Knab, 1908 (DEANE, 1986).

O *Anopheles (N) darlingi* Root, 1926, é considerado o mais importante vetor da doença no Brasil, principalmente na região amazônica brasileira. É a espécie de maior importância epidemiológica, pela abundância, ampla distribuição no território nacional, alto grau de antropofilia e endofagia e capacidade de transmitir diferentes espécies de plasmódios. Possui como criadouros preferenciais as coleções de águas limpas, quentes, sombreadas e de baixo fluxo, o que é frequente nesta região (DE OLIVEIRA-FERREIRA et al, 1990; PÓVOA et al, 2000).

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

2.3 AGENTES ETIOLÓGICOS DA MALÁRIA

Pertencem ao Filo Apicomplexa, Ordem Eucoccidiida, Subordem Haemosporinae, Família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium* (MACHIAFAVA; CELLI, 1885), o qual apresenta cerca de 120 espécies, destas, quatro infectam o homem: *Plasmodium malariae* (LAVERAM, 1881), *Plasmodium vivax* (GRASSI; FELETTI, 1890), *Plasmodium falciparum* (WELCH 1897) e *Plasmodium ovale* (STEPHENS, 1922) (GOMES et al, 2001).

Mais de 100 espécies de *Plasmodium* podem infectar os animais, como répteis, aves e mamíferos, entretanto apenas quatro causam a doença nos seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale*. Estes diferem na morfologia, nos aspectos imunológicos, na distribuição geográfica, nos padrões de recaída e na resposta ao tratamento com antimaláricos (TUTEJA, 2007).

Segundo Bruce-chwatt (1987) a distribuição do *P. vivax* é ampla, prevalecendo nas zonas temperadas, subtropicais e tropicais. O *P. falciparum* é encontrado nas zonas tropicais e subtropicais, podendo ser visto também nas temperadas. O *P. malarie* apresenta distribuição semelhante ao *P. falciparum*, no entanto em menor frequência. Enquanto o *P. ovale* apresenta baixa prevalência, sendo pouco encontrado na África tropical e esporadicamente em outras partes do mundo.

2.4 CICLO BIOLÓGICO DA MALÁRIA HUMANA E BIOLOGIA DO PARASITA

O ciclo do *P. falciparum* dura cerca de 48 horas no homem e produz a malária denominada terçã maligna. No *P. vivax* é de 48 horas e produz a terçã benigna, assim denominada pela menor gravidade dos casos. Já no *Plasmodium ovale* é de 48 horas e no *Plasmodium malarie*, causador da malária quartã, é de 72 horas (CAMARGO, 2003; CORNEJO; ESCALANTE, 2006).

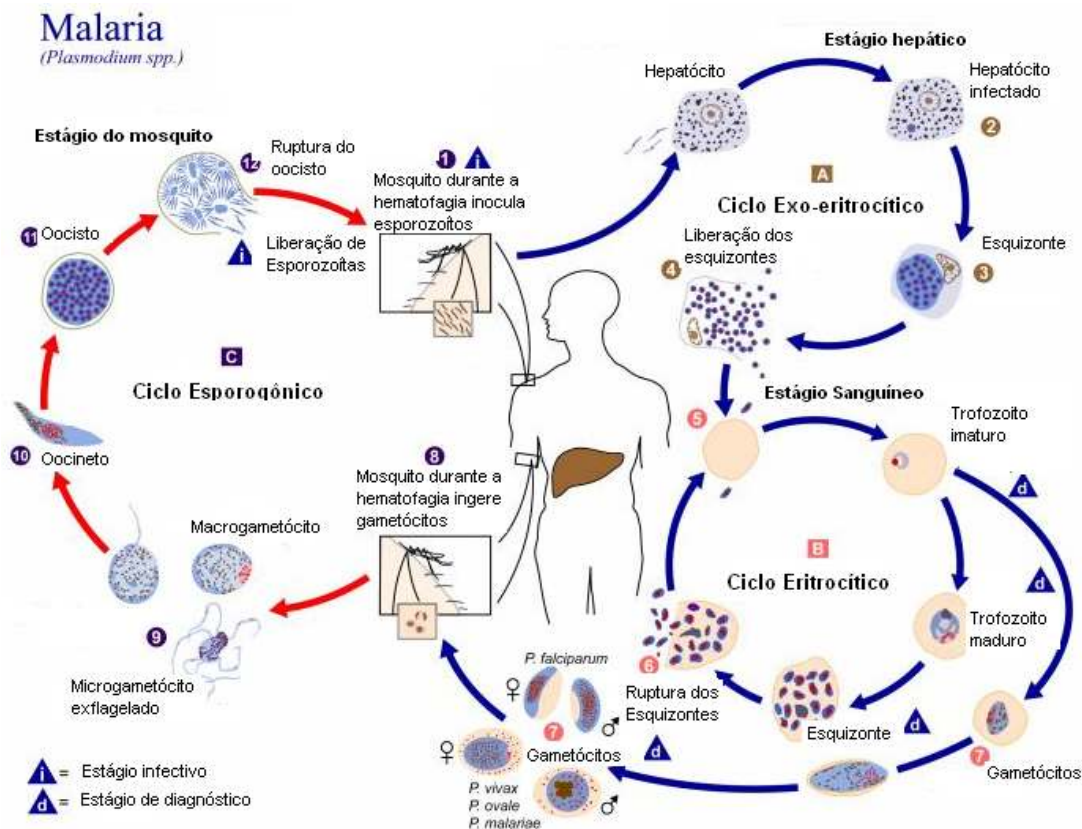


Figura 3: Esquema do ciclo biológico da malária humana e indicação do local de ação da mefloquina. Fonte: Adaptado de <http://www.famane-malaria.blogspot.com>. Acesso, agosto de 2010.

O ciclo biológico (figura 3) se processa em dois hospedeiros. No homem, considerado intermediário, ocorre reprodução assexuada por esquizogonia e, no mosquito, hospedeiro definitivo, é do tipo sexuada por esporogonia (REBÊLO, 2001).

Inicialmente a fêmea do mosquito *Anopheles*, infectada pelo plasmódio, ao exercer a hematofagia, inocula a forma infectante, chamada esporozoíto, na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, os quais migram pela circulação periférica e infectam células do fígado, neste estágio o parasita está recoberto pela proteína circunsporozoíto (CS) e pela proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP), responsáveis por mediar o processo de invasão nos hepatócitos e pela formação do vacúolo parasitóforo (MILLER et al, 2002; PRUDENCIO et al, 2006).

Nesta fase, denominada primária, exo-eritrocítica ou tissular, o esporozoíto se diferencia em trofozoíto pré-eritrocítico, que se multiplica por reprodução assexuada do tipo esquizogonia originando os esquizontes teciduais, que se rompem e liberam merozoítos. O *P. vivax* e o *P. ovale* têm uma forma latente, os hipnozoítas que podem persistir no fígado e causar relapsos invadindo a circulação sanguínea, em semanas ou mesmo anos mais tarde (CDC, 2006).

Posteriormente, os merozoítas hepáticos penetram nas hemácias, onde se transformam em trofozoítas jovens, que crescem e se dividem por esquizogonia, originando os esquizontes hemáticos que, após o rompimento das hemácias, liberam os merozoítas na circulação, que invadem outros eritrócitos repetindo o ciclo. Esta fase é denominada de esquizogonia eritrocítica (MARSH; KINYANJUI, 2006).

Alguns parasitas se diferenciam em micro (masculino) e macrogametócitos (feminino), que são as formas infectantes para o mosquito, ingeridas pela fêmea do anofelino durante o repasto sanguíneo (CDC, 2006). No estômago do mosquito, os microgametas penetram nos macrogametas que geram os zigotos, que se tornam móveis e alongados (oocinetos) e invadem a parede do intestino médio do mosquito e se transformam em oocistos, que crescem, rompem e liberam os esporozoítos que irão migrar para as glândulas salivares do mosquito, os quais durante o repasto sanguíneo são inoculados no hospedeiro humano e o novo ciclo se inicia (REBÊLO, 2001).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA

As principais manifestações da malária não grave são: febre, cefaléia e sudorese intensa acompanhada de outros sintomas inespecíficos como, vômitos, diarréia e dores abdominais (TAVARES, 2006).

Dentre as espécies de plasmódios que causam a malária nos seres humanos, o *P. falciparum* é o mais importante, pois é responsável pelo maior número de óbitos, o que pode se relacionar a capacidade de se vincular ao endotélio arterial durante a infecção, particularmente no sistema nervoso central, acarretando quadro de gravidade variável em função do estado imune do hospedeiro. As manifestações clínicas mais freqüentes da malária grave são anemia severa (resultante da destruição direta dos glóbulos vermelhos por ação dos parasitas ou indiretamente via complexos antigênicos), convulsões, insuficiência renal, alterações respiratórias, comprometimento do sistema nervoso central e alterações metabólicas como hipoglicemia (GREENWOOD et al, 2008).

No Quadro I estão apresentados os principais achados clínicos e laboratoriais dos pacientes com malária falciparum grave.

Quadro1: Manifestações Clínicas e Laboratoriais da malária grave e complicada, por *P. falciparum*

Sintomas e sinais	Alterações laboratoriais
Prostração	Anemia grave
Alteração da consciência	Hipoglicemia
Dispnéia ou hiperventilação	Acidose metabólica
Convulsões	Insuficiência renal
Edema pulmonar ao RX de tórax	Hiperlactatemia
Hemorragias	Hiperparasitemia
Hemoglobinúria	-
Oligúria	-
Hiperpirexia (>41° C)	-
Icterícia	-
Hipotensão arterial ou choque	-

Fonte: BRASIL/MS/SVS/2010

2.6 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA MEFLOQUINA

2.6.1 Estrutura química e propriedades físico-químicas da mefloquina

É um derivado 4-quinoleínometanol ou 4-hidroximetilquinoleína, quimicamente relacionada à quinina (SOURI et al, 1997). Apresenta a nomenclatura química (R*,S*)-(±)- α -2-piperidinil-2,8-bis(trifluorometil)-4-quinolinometanol, fórmula molecular C₁₇H₁₆F₆N₂O e peso molecular de 414.78 K. É um pó cristalino branco ou levemente amarelado, pouco solúvel em água e solúvel em metanol, acetato de etila e etanol; possui ponto de fusão de 259 a 260 °C e constante de dissociação (PKa) de aproximadamente 9.0 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2006).

Está presente no mercado como mistura racêmica de igual proporção, cujas propriedades farmacocinéticas são estereoespecíficas (ASHLEY et al., 2006). Estudos *in vitro*

sugerem que (+)-mefloquina apresenta maior atividade antimalárica que (-)-mefloquina contra algumas cepas de *P. falciparum* (SKÓRSKA et al, 2006).

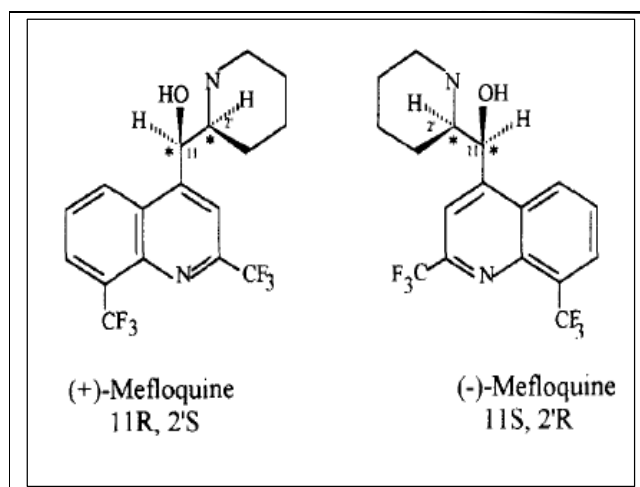


FIGURA 4: Estrutura química da mefloquina.
Fonte: SOURJ et al., 1997.

2.6.2 Farmacocinética da mefloquina

2.6.2.1 Absorção

Após administração via oral, a meia-vida de absorção é de aproximadamente duas horas (SCHWARTZ et al, 1982) e o tempo médio para alcançar o pico de concentração plasmática de 17 horas. A biodisponibilidade média é de 85% (LARIAM, 2004), e a presença de água e alimentos eleva significativamente a velocidade e a quantidade do fármaco absorvida (CREVOISIER et al, 1997). Foi observado durante a fase aguda da doença a redução da absorção do fármaco, a qual não foi elevada pela ingestão conjunta de alimentos, contudo na convalescência, a biodisponibilidade foi aumentada, o que pode ser creditado ao fato do paciente estar afebril e com funções gastrintestinais normais (ASHELY et al, 2006).

2.6.2.2 Distribuição

Nos adultos saudáveis, o volume de distribuição aparente, após dose única de 250 mg, é aproximadamente 20 L/Kg, caracterizando extensa distribuição tecidual e prolongada

atividade (KARBWANG; WHITE, 1990). Apresenta alta capacidade de ligação às proteínas plasmáticas (>98%) e se distribui intensamente não só nos tecidos, como também nos fluidos orgânicos, sendo detectada em altas concentrações nos pulmões, fígado, rins, músculos, tecido adiposo e eritrócitos (SALLES; SALLES, 2000).

2.6.2.3 Biotransformação

A mefloquina é biotransformada pela subfamília 3A do citocromo P-450, originando produtos de biotransformação carboxilados e hidroxilados. O principal metabólito é a carboximefloquina, cujos níveis plasmáticos nos indivíduos saudáveis são detectados entre duas a quatro horas após dose única oral, e pode exceder em cerca de 50%, aquela do fármaco original após duas semanas da ingestão (SCHWARTZ et al, 1982).

2.6.2.4 Excreção

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

A excreção ocorre principalmente pela via fecal, pois o fármaco apresenta secreção biliar e substancial circulação entero-hepática (SCHWARTZ et al, 1982). Pequena quantidade inalterada é excretada pela urina. Cerca de 3 a 4% de mefloquina é secretada pelo leite materno, após dose equivalente a 250 mg de base livre (LARIAM, 2004).

2.6.3 Mecanismo de ação da mefloquina

A mefloquina é um esquizotocida sangüíneo de ação prolongada que atua no estágio intra eritrocítico assexuado do plasmódio, particularmente sob as formas de trofozoíta e esquizonte do *P. falciparum* e do *P. vivax* (GUSTAFSSON et al, 1987). Interrompe a

esquizogonia eritrocitária abolindo as manifestações clínicas da doença. A regressão da parasitemia ocorre em cerca de três dias (TAVAREZ, 1996). O tratamento deve ser acompanhado de primaquina uma vez que, o fármaco não tem ação sobre os estágios hepáticos do plasmódio, os gametócitos maduros do *P. falciparum* e as formas tissulares latentes do *P. vivax* (BRASIL/MS/FNS, 2001).

O exato mecanismo de ação dos quinolinometanóis não é bem conhecido, entretanto, parece envolver ligação direta ao grupo heme e inibição da heme polimerase com crescente acúmulo de Fe (III) PPIX no vacúolo digestivo (FOLEY; TILLEY, 1998). Esta enzima é utilizada pelo parasita para catalisar a detoxificação da Fe (III) PPIX, formando um composto inerte, não tóxico, denominado hemozoína ou pigmento malárico, que tem por unidade básica a β -hematina (SULLIVAN et al, 1998).

A mefloquina, a exemplo da quinina, não se concentra tão intensamente no parasita, quando comparada a cloroquina, sugerindo-se que outros mecanismos possam estar envolvidos (FOLEY; TILLEY, 1998).

2.6.4 Efeitos adversos

A mefloquina é geralmente bem tolerada por crianças e adultos, no entanto, pode ocasionar reações adversas como distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares, dermatológicos e neuropsiquiátricos (WOOLTORTON, 2002). As últimas são caracterizadas por psicose, encefalopatias, polineuropatias motora e sensorial (incluindo parestesia, tremor e ataxia), confusão mental, depressão, ansiedade, crise de pânico, mudanças de humor, reações paranóicas, fadiga, alterações visuais, alucinações e, raramente suicídio (CRAIG; STITZEL, 1996; WATT-SMITH et al, 2001; SANJEEV et al, 2006).

Outros eventos adversos freqüentes são: tontura, labirintite, náusea, vômito, diarréia e dor abdominal, os quais podem ocorrer em cerca de 40% dos pacientes e, em geral, são leves ou moderados, auto-limitados e não requerem tratamento específico (PALMER et al, 1993; WOOLTORTON, 2002).

2.7 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

O termo validar nas análises químicas, se traduz na confiabilidade de determinado resultado analítico (LEITE, 2002). Portanto, é a garantia que um novo método analítico esteja fornecendo informações confiáveis e interpretáveis de determinado analito, isto é, adequado para seu propósito (RIBANI et al, 2004); um método é considerado validado, quando suas características atendem pré-requisitos estabelecidos em procedimento padrões disponibilizados pelos órgãos regulamentadores oficiais (BRITO et al, 2003).

No Brasil, o guia para validação para métodos analíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) recomenda a avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade e curva de calibração, limite de detecção e de quantificação (sensibilidade), precisão, intervalo de concentração, exatidão e robustez.

A seletividade se refere à capacidade de medir exatamente um composto na presença de outros como: impurezas, excipientes, produtos de degradação, demais ingredientes ativos bem como compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes na amostra; é o primeiro parâmetro a ser avaliado no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação, pois influencia nos demais parâmetros; deverá ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método (ANVISA, 2003; RIBANI et al, 2004; MOREAU et al, 2008). Nas análises por cromatografia líquida assegura que o pico da resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al, 2004).

A capacidade do método em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, é denominada linearidade (BRITO et al, 2003; RIBANI et al, 2004), que é obtida pela construção de curvas de calibração, a partir de padrões contendo concentrações próximas daquelas esperadas em determinado estudo (CASS; DEGANI, 2001; FDA, 2001).

A sensibilidade é avaliada através dos limites de quantificação, que é a menor concentração do analito que pode ser medida com precisão especificada pelos critérios de aceitação do método e de detecção, considerado a menor concentração do analito que produz

uma resposta superior a três vezes o ruído da linha de base. (CASS; DEGANI, 2001; FDA, 2001).

A precisão indica a concordância entre diferentes valores experimentais obtidos, os quais quanto mais próximos estiverem, maior será a precisão (LEITE, 2002); pode ser avaliada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-ensaio), isto é, nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e condições ambientais), geralmente no mesmo dia; o coeficiente de variação, expresso em porcentagem, é obtido, a partir de nove determinações do analito na amostra, contemplando o intervalo linear do método, quer seja, três concentrações (baixa, média e alta), analisadas em triplicata (ANVISA, 2003); a intermediária (inter-ensaio) que expressa as variações no mesmo laboratório entre diferentes dias, analistas e equipamentos, dentre outros parâmetros (ANVISA, 2003) e a reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), que avalia a precisão entre laboratórios, mediante estudos colaborativos (BRITO et al, 2003).

A exatidão demonstra a proximidade entre os valores obtidos em relação ao verdadeiro. O valor médio deve se situar dentro de 15% do valor real, exceto no limite de quantificação (FDA, 2001); esta associada à recuperação do procedimento, que se destina a avaliar a quantidade do analito recuperada no processo, em relação a real presente na amostra; é realizada através da adição de concentração conhecida do analito na amostra (“fortificação” da amostra) e posterior extração e quantificação, cujos valores são comparados com aqueles previamente adicionados. (FDA, 2001). Ressalta-se que a adição do analito a amostra tenta simular condições reais, não interferindo significativamente nas interações que ocorrem nesta, o que nem sempre é possível, visto que a solução de fortificação é preparada com solventes orgânicos, geralmente não presentes na matriz (BRITO; AMARANTE; POLESE; RIBEIRO, 2003).

A estabilidade, nas diversas etapas do processo, como coleta, manuseio da amostra após armazenagem de longa e curta duração, ciclos de congelamento e nas condições de análise, é de fundamental importância pela possibilidade de degradação dos compostos de interesse. É recomendado também o estudo da estabilidade do analito nas soluções-padrão, elaboradas nas concentrações conhecidas e solventes apropriados (ANVISA, 2003; RIBANI et al, 2004).

A robustez é a capacidade do método analítico de resistir às pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal. Deve ser avaliada para o conhecimento da susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas estabelecendo-se precauções no procedimento. Portanto, um método é considerado robusto, quando não é afetado por pequenas e deliberadas modificações nos seus parâmetros como, por exemplo, concentração do solvente orgânico e pH da fase móvel (FDA, 2001).

3 JUSTIFICATIVA

Ao se considerar a ausência de novos medicamentos, existe um esforço contínuo na busca por estratégias de baixo custo e eficazes para o aperfeiçoamento das políticas de tratamento e controle da doença, sendo a monitorização das concentrações plasmáticas dos antimaláricos uma importante ferramenta, uma vez que, através do conhecimento da cinética dos diversos antimaláricos, pode-se alcançar o tratamento eficaz, isto é, o efeito terapêutico rápido com risco reduzido de toxicidade (MELLO, 2004). Entretanto, como a malária é característica das áreas rurais, distante dos laboratórios especializados, há dificuldade no transporte e conservação das amostras de sangue total, plasma ou soro, tornando-se válido a utilização de meios alternativos de acondicionamento das amostras, como a utilização de papel de filtro para adsorção, secagem e transporte aos laboratórios analíticos (PATCHEN; MOUNT; SCHWARTZ; CHUCHILL, 1983).

Propõe-se neste estudo validar metodologia analítica para determinação de mefloquina e carboximefloquina em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro objetivando a monitorização terapêutica do fármaco nos pacientes com malária *falciparum*.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de mefloquina e carboximefloquina em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro

4.2 ESPECÍFICOS

- Propor procedimento de separação e extração líquido-líquido para mefloquina e carboximefloquina presente em amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro;
- Avaliar condições cromatográficas para resolução da mefloquina e da carboximefloquina;
- Determinar parâmetros de validação da metodologia proposta quer sejam: precisão, recuperação, linearidade, limite de detecção e de quantificação, interferentes e robustez;
- Aplicar o método validado CLAE/UV na determinação das concentrações de mefloquina e carboximefloquina em amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro de pacientes com malária falciparum.

5 CASUÍSTICA E MÉTODO

5.1 CASUÍSTICA

Para validação da metodologia analítica foram utilizadas amostras de sangue total de pacientes que nunca apresentaram episódios de malária ou fizeram uso de mefloquina, e que são regularmente atendidos no laboratório de análises clínicas do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

Para o estudo da aplicabilidade do procedimento analítico validado foram determinadas as concentrações de mefloquina e carboximefloquina, em amostras de sangue total de cinco pacientes com malária *falciparum* não grave, atendidos no Ambulatório/Laboratório do Programa de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas. A coleta do material biológico foi acompanhada do preenchimento de protocolo contendo identificação da amostra, o nome do paciente, idade e sexo.

5.1.1 Critérios de Inclusão

- Ter diagnóstico hemoparasitológico de malária por *P. falciparum*, através de exame de gota espessa;
- Ter iniciado tratamento para malária por *P. falciparum*: Larian (comprimidos contendo 250mg de mefloquina, dose única);
- Ter idade acima de 18 anos (ambos os sexos);
- Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE-Anexo 1);

5. Critérios de Exclusão

- Portadores de malária vivax, mista ou falciparum grave;
- Pacientes que apresentarem doença crônica ou infecciosa concomitante;
- Aqueles que apresentarem histórico de hipersensibilidade a mefloquina.
- Gestantes, lactantes e menores de 18 anos de idade;
- Aqueles que se recusarem a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.2 AMOSTRA

O universo amostral foi composto por cinco amostras de sangue total, coletadas de pacientes com diagnóstico de Malária por *Plasmodium falciparum* atendidos no Ambulatório/Laboratório do Programa de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas. A coleta foi realizada, empregando-se tubo tipo Vacoutainer®, de volume de 3mL, no terceiro dia (D3) após instituição da terapia. A seguir, foram transferidas para papel de filtro Whatman, nº 40, 125 mm, em aplicações de 100 µL cada, em gotas concêntricas de aproximadamente 2 cm de diâmetro. O papel de filtro foi seco à temperatura ambiente e acondicionado em envelope comum devidamente identificado e mantido a temperatura ambiente para o transporte ao Laboratório de Toxicologia da UFPA onde foram realizadas as análises. O tempo decorrido entre a preparação das amostras e a realização das análises foi inferior a três dias.

5.3 ESQUEMA TERAPÊUTICO

Todos os pacientes seguiram esquema terapêutico alternativo para o tratamento da malária *falciparum* não complicada, a saber: quatro comprimidos de 250 mg de Cloridrato de Mefloquina no D0 (BRASIL/MS/FNS, 2001).

5.4 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência *Varian*®, composto por 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® RP18* 5µm 4.6 X 150mm (Waters, Saint Quentin-en-Y velines, France).

Também foram utilizados: agitador de tubos vortex, Q-22Ob1, *Quimis*®; Ultra-som, Q-335D, *Quimis*®; Centrífuga, 2K15, *Sigma Laborzentrifugen*®; peagâmetro digital PHS-3B, *pHte*®k; Balança, VL-1mg, *Acculab*®; Homogeneizador BHS-300, *Benfer*®; Bomba de vácuo, *Fabbe*®; deionizador de água *Aquapur AQ 0010*®; microseringa de 50µL,

Halmliton®; Papel de filtro Whatman, n 40, 125 mm ; micropipetas automáticas com volume regulável Finnpiette (10µL a 100µL, 20µL a 200µL e 200µL a 1000µL), *Labsystems®*.

5.5 REAGENTES E SOLVENTES

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

5.6 SOLUÇÕES PADRÃO

5.6.1 Soluções Estoque

As soluções estoque de mefloquina em concentração de 1,0 mg/mL, carboximefloquina de 46 µg/mL e do padrão interno (quinidina) de 1,0 mg/mL, foram preparadas pela dissolução dos respectivos sais em metanol.

4.6.2 Soluções de Trabalho

As soluções estoque de mefloquina, carboximefloquina e quinina foram diluídas em metanol, com a finalidade de obter concentrações de 25 µg/mL; 25 µg/mL e 21 µg/mL, respectivamente.

Todas as soluções padrão foram acondicionadas a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e protegidas da luz em frasco âmbar, envolto em papel alumínio durante o processo.

5.6.3 Amostras Controle

As amostras controle de mefloquina e carboximefloquina utilizadas na validação da metodologia analítica foram preparadas a partir de sangue total, proveniente de voluntários que nunca fizeram uso de antimaláricos, adicionadas dos compostos de interesse em concentrações de $0,25\text{ }\mu\text{g/ml}$ a $2,5\text{ }\mu\text{g/ml}$, a partir da diluição das soluções padrão em volumes apropriados de sangue total humano através de agitação mecânica por uma hora.

Volume de $100\mu\text{L}$ de cada amostra de sangue com concentração conhecida de mefloquina e carboximefloquina foi aplicado sobre o papel de filtro, os quais foram secos por três horas e armazenados em envelopes a temperatura ambiente, e usados de acordo com as necessidades de trabalho.

5.7 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

Os “spots” foram recortados em pequenos pedaços e transferidos para tubos de centrífuga de polipropileno de capacidade de 15 mL ; foram adicionados $1,5\text{ mL}$ de $\text{HCl } 0,1\text{ M}$. Os tubos foram submetidos à agitação por vinte minutos em agitador mecânico. Posteriormente, foram transferidos para ultra-som à temperatura ambiente por uma hora. Com o auxílio de um palito de madeira, o papel de filtro foi retirado, e adicionado ao tubo $0,5\text{ mL}$ de $\text{NaOH } 2\text{M}$, $100\text{ }\mu\text{L}$ do padrão interno e 6 mL de éter metil terc butílico. Em seguida, foram agitados por quinze minutos e centrifugados a 2000 rpm por quinze minutos. A fração orgânica foi separada e evaporada em banho de água a 60° C . O resíduo foi reconstituído com $100\mu\text{L}$ da fase móvel e injetado, em volume de $20\mu\text{L}$ no CLAE (BLESSBORN et al, 2007).

5.8 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A fase móvel foi composta de uma mistura isocrática de metanol e solução aquosa de trietilamina $0,01\text{ M}$ (60:40, v/v) pH 5,5, ajustado com ácido orto-fosfórico a 50%. A solução

foi filtrada e desgaseificada em tanque de ultra-som por 10 minutos antes do uso. O fluxo foi 1,0 mL/min e comprimento de onda de 222 nm (BERGQVIST et al, 1988; GREEN et al, 1999).

Tais parâmetros de separação foram previamente otimizados nas condições laboratoriais presentes, utilizando-se soluções padrões de quinidina, mefloquina e carboximefloquina, a fim de obter a melhor resolução entre os picos dos compostos de interesse. Foram avaliadas a vazão, a constituição da fase móvel e o comprimento de onda de detecção (Patchen et al, 1983).

5.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Foi realizada segundo os critérios propostos pelo FDA (1994), “Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation”, (2001) e resolução da ANVISA RE n° 899, de 29/5/2003. Os parâmetros avaliados foram: linearidade e curva de calibração, seletividade, precisão intra e inter ensaio, recuperação, estabilidade, limites de detecção e quantificação e robustez.

5.9.1 Seletividade

Foram utilizadas alíquotas de *pool* de sangue total adsorvidos em papel de filtro, enriquecidas com as soluções padrões de quinina, quinidina, cloroquina, desetilcloroquina e amodiaquina nas concentrações terapêuticas geralmente utilizadas, as quais podem ser administradas conjuntamente com a mefloquina para o tratamento da malária, submetidas a extração conforme 5.7 e analisadas segundo condições descritas em 5.8.

5.9.2 Linearidade e curva de calibração

Foram usadas concentrações crescentes das soluções de trabalho de mefloquina e carboximefloquina, em intervalo de 0,25 µg/mL a 2,5 µg/mL que juntamente com o padrão interno, foram transferidas para tubos de polipropileno tipo eppendorf e aplicadas em

quintuplicata, no cromatógrafo, segundo condições descritas em 5.8; as relações das áreas de cada substância e do padrão interno foram plotadas no eixo da ordenada e as respectivas concentrações na abscissa. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e expressa por $y = a + bx$, onde o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y. Já a faixa linear de trabalho foi determinada por intermédio do coeficiente de correlação de Pearson (r) (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

A curva de calibração foi elaborada a partir dos calibradores adsorvidos em papel de filtro na faixa linear, os quais foram separados e extraídos, conforme 5.7, e submetidos à análise cromatográfica, segundo condições descritas em 5.8. Os ensaios foram realizados em quintuplicata e as relações das áreas de cada substância de interesse e do padrão interno foram projetadas no eixo da ordenada e as concentrações na abscissa. Foram obtidos a equação da reta e o coeficiente de correlação de Pearson (r)

5.9.3 Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção foi determinado através de injeções no cromatógrafo de soluções diluídas daquelas de trabalho da mefloquina e carboximefloquina. Foi considerado três vezes o desvio padrão da linha de base (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

O limite de quantificação da mefloquina e carboximefloquina foi determinado empregando-se amostras controle, contendo concentrações de 1,25; 0,5; 0,25 e 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada substância, as quais foram submetidas aos procedimentos de separação e extração descritos em 4.7 e analisadas segundo 4.8. As relações das áreas das substâncias de interesse e do padrão interno nas diversas concentrações foram empregadas para obtenção dos coeficientes de variação. O limite de quantificação foi considerado aquele cujo coeficiente de variação foi igual ou inferior a 15% (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

5.9.4 Precisão intra-ensaio e interensaio

A precisão intra-ensaio empregando-se amostras controle, contendo diversas concentrações dos analitos de interesse, os quais foram analisados, segundo procedimentos descritos em 4.7 e 4.8, em quintuplicata no mesmo dia. A precisão interensaio foi estabelecida a partir da análise das amostras controle enriquecida com os analitos de interesse, em quintuplicata, por três dias consecutivos. Foram determinados os coeficientes de variação intra e inter ensaios.

5.9.5 Recuperação

A recuperação absoluta foi determinada a partir das amostras controle enriquecida com diversas concentrações de mefloquina e de carboximefloquina adsorvidas em papel de filtro e analisadas conforme 5.7 e 5.8. A relação das áreas de mefloquina e carboximefloquina e do padrão interno foi comparada com aquela resultante da injeção direta no cromatógrafo das soluções de interesse e do padrão interno, nas respectivas concentrações. Os ensaios foram realizados em quintuplicata e os resultados expressos em porcentagem da área da amostra extraída em relação aquela do padrão, a qual representa 100% (FDA, 2001; ANVISA, 2003). O processo de separação dos analitos foi avaliado de acordo com 5.7 e após 12 horas (overnight) do contato com a solução ácida, objetivando determinar a melhor recuperação.

5.9.6 Estabilidade

Foi determinada por meio das amostras controles em concentração de 0.5 µg/mL adsorvidas em papel de filtro, as quais foram submetidas, em triplicata, a análise no dia de preparo, que foi considerado o tempo zero, e após 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente, em envelope lacrado, considerado o tempo 1. Foi aceita variação máxima de 15% entre os resultados.

5.9.7 Robustez

A robustez da técnica foi analisada através da avaliação da variação do pH da fase móvel (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

5.9.8 Aplicação do método validado em papel de filtro contendo sangue total de pacientes com malária *falciparum*

Alíquotas de sangue total adsorvidas em papel de filtro de indivíduos com diagnóstico positivo para malária *falciparum*, foram submetidas a análise conforme procedimentos descritos em 5.7 e 5.8.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nas diversas etapas de validação da metodologia foram descritos como média e desvio padrão; foram calculados os diversos coeficientes de variação e determinadas a equação da reta e o coeficiente de correlação de Pearson, empregando-se os softwares Bioestat 5.0 (AYRES et al, 2007) EXCEL® e INSTAT®. O nível de significância foi de 5%.

5.11 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi desenvolvido com amostras biológicas coletadas para a pesquisa no Ambulatório/Laboratório do Programa de Ensaio Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas e aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas. O número do parecer de aprovação é: 0022/20088 e o número do protocolo do CEP/IEC é: 0020/08. O estudo foi realizado em conformidade com os preceitos das Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 196/96) do Conselho Nacional de Saúde. Cada paciente, candidato ao presente estudo, assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aceitando participar da pesquisa e teve sua identidade mantida em sigilo (Anexo I).

6 RESULTADOS

6.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas utilizadas para validação da metodologia analítica, que permitiram boa resolução dos analito de interesse estão apresentadas na Tabela 1. Os tempos de retenção da mefloquina, carboximefloquina e quinidina, em concentrações de 25 µg/mL, 25 µg/mL e 21 µg/mL, respectivamente, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 01: Parâmetros cromatográficos utilizados para validação da metodologia.

Parâmetro	Condição
Detecção	UV ($\lambda = 222 \text{ nm}$)
Fluxo	1,0 mL/min
Coluna	C18, 5µm X-terra 4.6 X 150mm (Waters, Saint Quentin-en-Y velines, France ®).
Fase Móvel	mistura isocrática de metanol e solução aquosa de trietilamina 0,01 M (60:40, v/v) pH 5,5
Volume de injeção	20 µL

Tabela 02: Tempo de retenção das soluções padrões de mefloquina (25 µg/mL), carboximefloquina (25 µg/mL) e quinina (21 µg/mL), segundo condições cromatográficas previamente padronizadas.

Fármaco	n	Retenção (min)
Quinidina	3	2,46
Carboximefloquina	3	3,30
Mefloquina	3	5,36

n= número de determinações

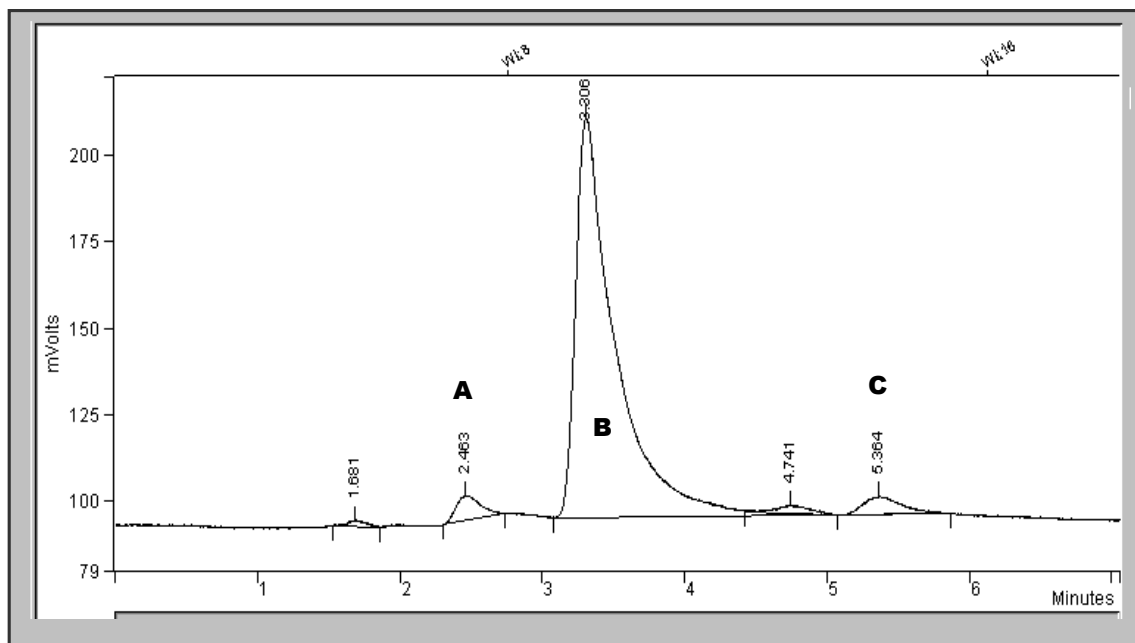


Figura 5: Cromatograma das soluções padrões de mefloquina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (C), carboximefloquina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (B) e quinidina (21 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A), segundo condições cromatográficas previamente padronizadas.

6.2 PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO

6.2.1 Seletividade

Como mostrado na Tabela 3, todos os eventuais interferentes selecionados apresentaram tempos de retenção distintos daqueles encontrados para os analitos de interesse, assim como para o padrão interno.

Tabela 3: Medicamentos com seus respectivos tempos de retenção para identificar a possível interferência de quimioterápicos administrados em associação com mefloquina.

Medicamento	Tempo de retenção
Carboximefloquina	7,01
Mefloquina	13,32
Quinina	2,8
Quinidina	2,77
Amodiaquina	3,0
Cloroquina	N.E
Desetilcloroquina	6,3

N.E: Não eluiu nas condições cromatográficas padronizadas

6.2.2 Linearidade e curva de calibração

A linearidade da resposta do detector frente às diversas concentrações de mefloquina e carboximefloquina está apresentada nas Tabelas 4 e 5, e as representações gráficas nas Figuras 6 e 7, respectivamente. A equação da reta foi $Y = 0,1988 + 1,8341X$ e coeficiente de correlação de 0,9896 para mefloquina e $Y = - 0,1686 + 2,3528 X$ e coeficiente de correlação de 0,9996 para carboximefloquina.

Tabela 4: Linearidade da mefloquina

Mefloquina µg/mL	N	Relação das áreas Amostra/Padrão interno
0,25	15	0,78
0,50	15	1,19
1,00	15	1,75
2,50	15	4,87

n= número de determinações

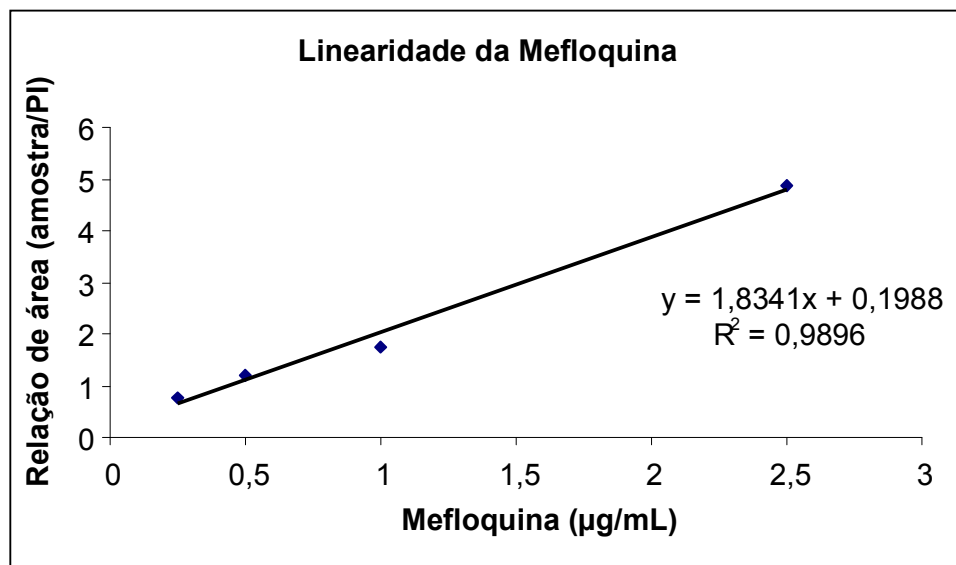


Figura 6: Representação gráfica da linearidade da mefloquina

Tabela 5: Linearidade da carboximefloquina

Carboximefloquina $\mu\text{g/mL}$	n	Relação das áreas Amostra/Padrão interno
0,375	15	1,11
0,750	15	1,94
1,500	15	3,60
3,740	15	9,00

n= número de determinações

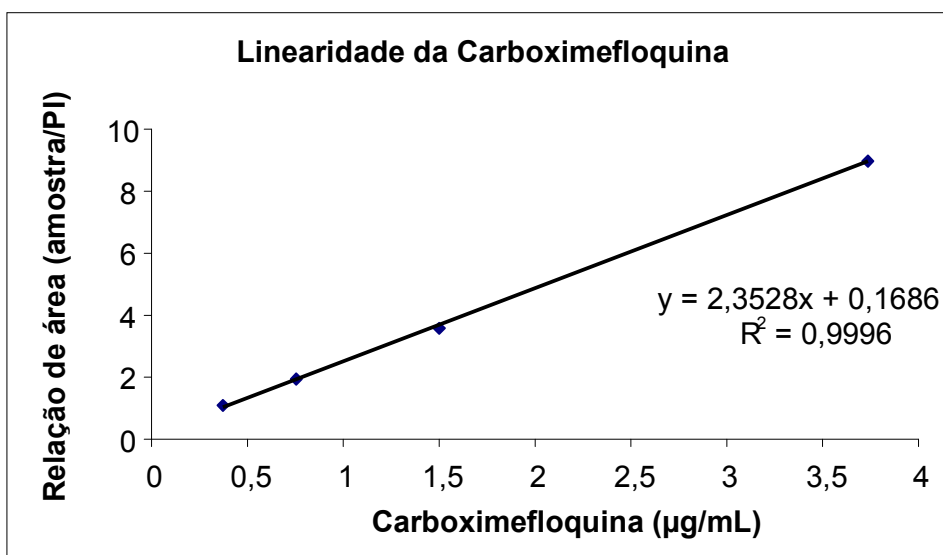


Figura 7: Representação gráfica da linearidade da carboximefloquina

As curvas de calibração de mefloquina e carboximefloquina estão apresentadas na Tabela 6 e 7 e ilustradas nas Figuras 8 e 9. Para mefloquina a equação da reta foi $Y = 0,1983 + 1,5216 X$ e o coeficiente de correlação igual a 0,9933. Já para carboximefloquina a equação da reta foi $Y = 0,0152 + 2,1146 X$ e o coeficiente de correlação (r) de 0,989.

Tabela 6: Curva de calibração da mefloquina no plasma.

Mefloquina µg/mL	n	Relação das áreas Amostra/Padrão interno
0,25	15	0,50
0,50	15	1,13
1,00	15	1,61
2,50	15	4,02

n= número de determinações

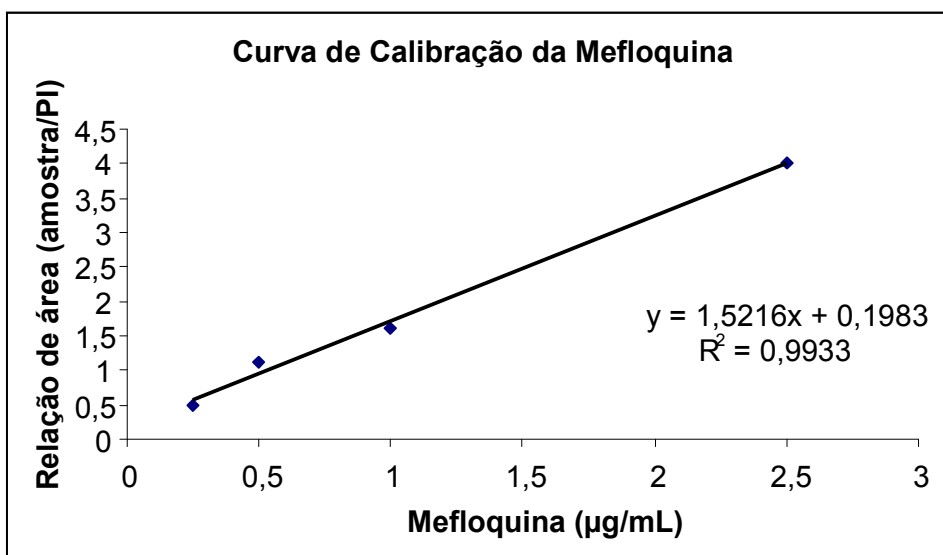


Figura 8: Curva de calibração da mefloquina no plasma.

Tabela 7: Curva de calibração da carboximefloquina no plasma.

Carboximefloquina $\mu\text{g/mL}$	N	Relação de áreas Amostra/Padrão interno
0,375	15	1,1
0,750	15	1,63
1,500	15	2,71
3,740	15	8,08

n= número de determinações

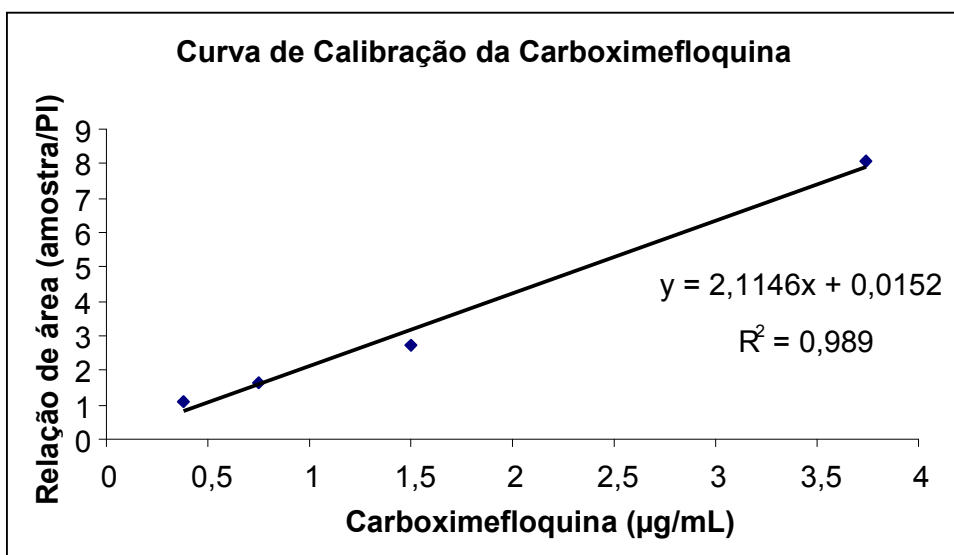


Figura 9: Curva de calibração da carboximefloquina no plasma.

6.2.3 Limite de detecção

O limite de detecção para mefloquina e carboximefloquina foi 35 ng/mL.

6.2.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação para mefloquina e carboximefloquina foi 70 ng/mL.

6.2.5 Precisão do método

Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio da mefloquina e carboximefloquina estão mostrados nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8: Precisão intraensaio e interensaio da mefloquina, expressa como coeficiente de variação.

Mefloquina μg/mL	n	Coeficiente de variação intra ensaio (%)	n	Coeficiente de variação inter ensaio (%)
0,25	5	35	15	43
1,00	5	26	15	38
2,50	5	33	15	35

n= número de determinações

Tabela 9: Precisão intra ensaio e inter ensaio da carboximefloquina, expressa como coeficiente de variação.

Carboximefloquina μg/mL	n	Coeficiente de variação intra ensaio (%)	n	Coeficiente de variação inter ensaio (%)
0,375	5	29,2	15	36
0,750	5	22	15	27
1,500	5	18	15	20
3,740	5	18	15	19

n = número de determinações

6.2.6 Recuperação

As recuperações da mefloquina e carboximefloquina, obtidas pelo método sem e após separação overnight, estão apresentadas na tabela 10 e 11 respectivamente.

Tabela 10: Recuperação absoluta do método de extração sem separação overnight de diferentes concentrações de mefloquina e carboximefloquina.

Mefloquina μg/mL	n	Recuperação (%)	Carboximefloquina μg/mL	n	Recuperação (%)
0,25	15	64	0,375	15	103
0,50	15	95	0,750	15	85
1,00	15	92	1,500	15	75
2,50	15	82	3,740	15	89

Tabela 11: Recuperação absoluta do método de extração com separação overnight de diferentes concentrações de mefloquina e carboximefloquina.

Mefloquina μg/mL	n	Recuperação (%)	Carboximefloquina μg/mL	N	Recuperação (%)
0,25	15	77	0,375	15	77
0,50	15	88	0,750	15	N.E
1,00	15	93	1,500	15	100
2,50	15	42	3,740	15	30

6.2.7 Estabilidade

De acordo com a Tabela 12, pode-se verificar a estabilidade da mefloquina e Carboximefloquina, após 30 dias da preparação do papel de filtro armazenado em envelope lacrado e mantido a temperatura ambiente.

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

Fármaco	n	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) Amostra recente	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) Armazenamento por 30 dias
Mefloquina (0,5 $\mu\text{g/mL}$)	5	0,45	0,58
Carboximefloquina (0,5 $\mu\text{g/mL}$)	5	0,48	0,47

6.2.8 Robustez

Para avaliação da robustez do procedimento foi verificada a influência do pH da fase móvel sobre os tempos de retenção dos analitos de interesse, cujos resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Avaliação da interferência do pH da fase móvel no tempo de retenção da mefloquina, carboximefloquina e do padrão interno (quinidina).

pH	Tempo de retenção da mefloquina (minutos)	Tempo de retenção da carboximefloquina (minutos)	Tempo de retenção da quinidina (minutos)
5,4	6,5	5,2	2,2
5,75	7,1	5,2	2,3
6,0	6,3	5,5	2,1
6,5	8,3	5,4	2,8

OSS: Fluxo da fase móvel: 1ml min

6.2.9 Determinação de mefloquina e carboximefloquina em pacientes com malária *falciparum*

Os resultados da determinação da mefloquina e carboximefloquina em amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro dos pacientes com malária *falciparum* estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Concentrações plasmáticas de mefloquina e carboximefloquina ($\mu\text{g/mL}$) em D3 após a instituição da terapia, em pacientes com malária *falciparum*, oriundas do ambulatório/Laboratório do Programa de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas, no período de janeiro a julho de 2009.

Pacientes	n	mefloquina $\mu\text{g/mL}$	carboximefloquina $\mu\text{g/mL}$
1	3	0,68	0,419
2	3	0,32	0,450
3	3	0,95	0,427
4	3	2.06	0,437
5	3	0.295	0,625
X \pm DP		0,861 \pm 0,723	0,472 \pm 0,086

N= número de determinações

X= média aritmética; \pm desvio padrão (DP)

7 DISCUSSÃO

Apesar dos esforços das autoridades sanitárias dos Países nos quais a malária é endêmica, não foi observado até o presente, redução significativa do número de casos, o que se traduz pelas elevadas taxas de morbimorbidade nestas áreas, com significativo impacto econômico e social. (WHITTY et al, 2008; WALKER et al, 2009)

Dentre as estratégias empregadas para redução do número de casos da doença, o tratamento rápido e eficaz, ocupa posição de destaque, por promover a cura e reduzir a transmissão (MELLO, 2004). Para avaliação da eficácia de determinado esquema terapêutico e acompanhamento da aderência do paciente a terapia proposta, a monitorização das concentrações de fármacos nos diferentes fluidos biológicos ocupa posição de destaque e para identificação e quantificação são empregadas técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida e a gasosa, as quais segundo Ribani et al. (2004) se destacam dentre as técnicas de separação, apresentando sensibilidade, especificidade e custo que se adequam a estes objetivos.

A determinação das concentrações sanguíneas de antimaláricos é relevante para avaliação dos casos nos quais há parasitas circulantes logo após ou decorrido determinado período de tempo do tratamento, objetivando a distinção entre falha terapêutica resultante da resistência ou não aderência do paciente ao tratamento proposto (LIMA, 1992; DUA et al, 1993) . Neste sentido, a disponibilidade de métodos analíticos sensíveis, específicos, de baixo custo e rápidos, são fundamentais para as dosagens séricas destes medicamentos, nas áreas onde a doença é endêmica.

A mefloquina é empregada no tratamento de primeira linha na malária por *P. falciparum* pelo Ministério da Saúde do Brasil, e sua determinação em fluidos biológicos é justificável pela sua extensa meia vida biológica, o que pode levar a exposição dos parasitas a concentrações sub-terapêuticas do fármaco, favorecendo a ocorrência de episódios de resistência. Por outro lado, apesar da ausência de atividade antimalárica da carboximefloquina, uma relação constante entre o fármaco original e seu principal metabólito

assegura que a quimioprofilaxia ou o tratamento foi realizado de maneira adequada (BRASIL/MS/FNS, 2001; SCHLITZER, 2007).

A determinação da concentração de mefloquina e de seu derivado carboxilado nos fluidos biológicos destina-se tanto aos estudos de monitorização terapêutica, quanto de farmacocinética. No último, há necessidade de separação dos isômeros, que apresentam ação farmacológica e disposição cinética diferenciadas, com emprego de técnicas de separação e colunas especiais. (BERGQVIST et al, 1988)

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

O desenvolvimento de um método cromatográfico para determinação de mefloquina e seu principal metabólito carboxilado em amostras biológicas com extração líquido-líquido em uma única etapa, empregando condições cromatográficas facilmente reprodutíveis, é uma necessidade atual dos laboratórios de monitorização terapêutica de antimaláricos. Para tanto, neste trabalho foi realizada a validação de método por HPLC para quantificação de mefloquina e carboximefloquina em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro, com a preocupação de desenvolver um procedimento simples, empregando detector ultravioleta, coluna de fase reversa C18, extração em fase líquida, reduzido consumo de solventes orgânicos e papel de filtro facilmente encontrado, a fim de tornar a análise acessível economicamente para a maioria dos laboratórios de análises de antimaláricos dos países da América Latina. (GREEN et al., 1999)

Justifica-se o emprego de papel de filtro como suporte para acondicionamento e transporte das amostras, pela possibilidade de atendimentos de pacientes residentes em áreas

remotas dos grandes centros de diagnóstico de difícil acesso ou de reduzida infra-estrutura laboratorial e de recursos humanos; soma-se o fato da possibilidade da coleta de amostra por punção digital (PATCHEN; MOUNT; SCHWARTZ; CHUCHILL, 1983).

Procedeu-se então a validação do procedimento, etapa de fundamental importância para que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida; os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, limite de detecção e quantificação, curva de calibração, tempo de retenção, recuperação, precisão, interferentes, estabilidade e robustez (SHAH et al, 2000; ANVISA, 2003; RIBANI et al, 2004).

De acordo com as condições cromatográficas padronizadas, a mefloquina, carboximefloquina e Quinidina (padrão interno) demonstraram boa separação, eluindo em 5,36, 3,30 e 5,36 minutos, respectivamente (Tabela 2 e Figura 5); não foi observada eluição de possíveis interferentes representados por outros fármacos utilizados no tratamento da malária falciparum ou de seus sintomas (Tabela 3); indicando que o método se adequa a identificação de mefloquina e carboximefloquina sem interferência de outros analitos, portanto, apresenta boa seletividade (ANVISA, 2003).

Os limites de detecção e de quantificação de mefloquina e carboximefloquina caracterizam a aplicabilidade do procedimento proposto para monitorização terapêutica do fármaco, uma vez que após o uso de mefloquina, segundo esquema terapêutico padrão para o tratamento da malária falciparum são alcançadas concentrações sanguíneas médias de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ variando de 0,871 a 6,04 $\mu\text{g/mL}$ em pacientes fazendo uso de 15 mg/kg de MQ após 24 horas (NOSTEN et al, 1991).

O método foi linear em ampla escala de concentrações de mefloquina e carboximefloquina, isto é de 0,25 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$, as quais incluem aquelas associadas ao uso terapêutico e quimioprolático do fármaco; os coeficientes de correlação de Pearson foram superiores a 0,989 para ambos analitos (Figuras 6 e 7). O mesmo achado foi observado nas curvas de calibração elaboradas com concentrações crescentes das amostras controle embebidas em papel de filtro (Figuras 8 e 9). Tais valores são adequados a legislação oficial

vigente no Brasil, a qual recomenda que no estudo de linearidade o coeficiente de Pearson deverá ser igual ou superior a 0,98. (ANVISA, 2003)

A recuperação média de mefloquina nas amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro cuja separação foi realizada em uma hora foi de $83 \pm 14\%$, enquanto que após 12 horas de separação foi $75 \pm 24\%$. Não foi observada diferença significativa nos valores médios de recuperação, considerando o intervalo de tempo do processo de separação do analito ($p > 0,05$). Contudo, na maior concentração analisada, isto é, $2.5 \mu\text{g/mL}$, os teores de mefloquina foram superiores na extração realizada em uma hora (Tabela 11). A recuperação média após separação em uma hora obedece as recomendações da legislação vigente (ANVISA, 2003).

A recuperação média da carboximefloquina nas amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro após separação de uma hora foi $88 \pm 11\%$, e após 12 horas de $69 \pm 35\%$. Não foi observada diferença estatística significativa entre os valores médios da recuperação ($p > 0,05$), considerando o intervalo de tempo para separação do analito, apesar do claro decaimento desta em período prolongado de separação; entretanto, a recuperação média após separação de uma hora atende as recomendações da legislação vigente.

O coeficiente de variação médio intra ensaio da mefloquina foi $31 \pm 4\%$ e o inter ensaio foi $38 \pm 4\%$. Para carboximefloquina tais valores foram $21 \pm 5\%$ e $25 \pm 7\%$, respectivamente (Tabelas 8 e 9). São considerados valores elevados e acima das recomendações da legislação vigente (ANVISA, 2003); entretanto, os métodos validados para determinação de outros antimaláricos, como quinina, lumefantrina e cloroquina, nos quais as amostras de sangue se encontram adsorvidas em papel de filtro, também apresentam elevados coeficientes de variação, chegando até 40%. (PATCHEN; MOUNT; SCHWARTZ; CHUCHILL, 1983; TONNESEN, 2001).

Credita-se tal variação a maneira como é realizado o corte do papel de filtro, com auxílio de tesoura, não formando cortes homogêneos, e impedindo o contato uniforme destes com a solução ácida de separação; soma-se a incerteza referente a retirada do papel de filtro após separação da matriz biológica, e o quanto da matriz adsorveu novamente no papel neste procedimento, o qual é realizado com auxílio de bastão de madeira. Por outro lado, a maneira como a amostra é aplicada ao papel de filtro também poderá corroborar para redução da

precisão do procedimento, devendo ser dispensada atenção para o volume exato de 100µL a ser transferido para o papel de filtro, o formato da circunferência formada, os movimentos homogêneos e circulares a serem aplicados ao papel no momento da aplicação e o tempo necessário para a secagem inicial do papel na posição horizontal.

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

Variações no pH da fase móvel não modificaram de maneira significativa a resolução dos analitos de interesse, sugerindo robustez adequada do método para este parâmetro, característica indispensável para a qualidade analítica (BRITO et al, 2003). Neste sentido, optou-se pelo pH 5,5 pela melhor separação dos compostos de interesse mantendo-se a adequada resolução cromatográfica considerando possíveis interferentes na matriz biológica.

Para avaliação da aplicabilidade da metodologia analítica proposta efetuou-se a determinação dos teores de mefloquina e carboximefloquina em amostras de sangue total adsorvidas em papel de filtro, coletadas de pacientes com malária falciparum três dias após ingestão do fármaco. Os valores médios obtidos corroboraram com os achados de Todd et al. (1997), que observaram teor sérico médio de 0,979µg/ml, durante a ingestão de 250 mg de mefloquina por 18 semanas, e de Hatin et al. (1992), que estudaram 47 pacientes não imunes com malária por *P. falciparum*, provenientes do Senegal, após a ingestão de dose de 12,5mg/Kg de mefloquina e obtiveram concentração sérica média de 0,955±0,74 µg/ml, com intervalo de 0,36 a 1,719 µg/ml.

Os teores de carboximefloquina apresentados na Tabela 14 variaram de 0,41 a 0,62 µg/ml e se assemelham aqueles obtidos por Hatin et al. (1992) em estudo com 47 pacientes não imunes com malária por *P. falciparum*, provenientes do Senegal após 48 horas da ingestão de 12,5 mg/kg de mefloquina, nos quais a concentração média do derivado carboxilado foi de 0,407±0,49 µg/mL, com intervalo de 0,05 a 1,180 µg/ml.

9 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicaram que:

- O método validado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta mostrou-se apropriado para determinação de mefloquina e carboximefloquina em sangue total adsorvidos em papel de filtro visto que apresentou parâmetros de desempenho condizentes aos objetivos do trabalho e em conformidade com os parâmetros recomendados pelos órgãos internacionais e pela legislação sanitária vigente no país;

- A mefloquina e seu metabólito apresentaram estabilidade quando adicionadas as alíquotas de sangue total adsorvidas em papel de filtro, o que demonstra sua aplicabilidade na coleta de material biológico de pacientes;

- A extração líquido-líquido, conferiu ao método validado baixo custo operacional e a possibilidade de ser implementado na maioria dos laboratórios de médio porte dos países nos quais a doença é endêmica, justificando a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AYRES, Manuel; AYRES Jr., Manuel; AYRES, Daniel Lima; SANTOS, Alex de Assis dos Santos. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém; Sociedade Civil Mamirauá: MCT-CNPq, 2007.

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

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**, 45, p.282-287, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Terapêutica da Malária**. Brasília, 2001.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica da Malária no Brasil 2004**. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica da Malária no Brasil 2006**. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica da Malária no Brasil 2007**. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Integração da atenção básica eo programa nacional de controle da malária**. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica da Malária no Brasil 2008**, Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**, Brasília, 2010.

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

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

BRUCE-CHWATT, L. J. MALARIA AND ITS CONTROL: Present Situation and Future Prospects. **Ann. Revist Public. Health**, v.8, p. 75-110, 1987.

CAMARGO E. P. **Malária, maleita, paludismo**. **Ciência e Cultura**, vol. 55, n.1, São Paulo, Jan./Mar, 2003.

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

CHAART SENSOR EVALUATION: **MALÁRIA** Disponível em: <<http://www.128.102.124.15/sge/health/sensor/diseases/malaria/html>>. Acesso em: 07 agosto 2005.

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

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

CORNEJO, O. E.; ESCALANTE, A. A. The origin and age of *Plasmodium vivax*. **Trends in Parasitology**, Vol.22 No.12, 2206.

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

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

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

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

DE OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; TEVA, A. et al. Natural malaria infections in Anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. **Hygiene American Journal of Tropical and Medical**, 43 (1), 6-10, 1990.

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

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

DUTRA, A. P. Malária – Profissionais de saúde, 2001. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/malari.html>>. Acesso em: 11 de abril 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Cloridrato de Mefloquina**. 2006. Disponível em: <<http://www.farmacopeia.org.br/geral/forum/docs/forum02/cloridrato%20de%20mefloquina.pdf>>. Acesso em: 21 de janeiro de 2010.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-**Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation**, may 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance>>. Acesso em: 12 de setembro de 2009.

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.

FORATTINI O. P. Família Culicidae. In: **Entomologia Médica Forattini**. Editor: EDUSP, São Paulo, p. 123-301, 1962.

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

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

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

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

GREENWOOD, B. M.; FIDOCK D.A., KYLE E. D., KAPPE H. I. S., et al. Malária: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation** <http://www.jci.org> Volume 118 Number 4 April 2008.

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

KAGER, P. A.; Malaria control: constrains and opportunities, **Tropical Medicine and International Health**, v.7, n. 12, p. 1042-1046, 2002.

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

LARIAM PRODUCT MONOGRAPH. **Mefloquine hidrocloreto tablets – Antimalarial Agent. 2004**. Disponível em: <http://www.rochecanada.com/pdf/lariampmE.pdf>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2009.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. Editora Átomo, 4. ed., 2002.

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

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

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

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

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

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

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.

PHILLIPS, R. S. Current status of malaria and potential for control. **Clínical microbiology reviews**, vol. 14, nº 01, p. 208-226, 2001.

PÓVOA, M. M. et al. Malária trasmission. **Ci Cult**. São Paulo, v. 52, n. 4/5, p. 208-212, 2000.

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.

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

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.

RUSSEL P. F., WEST L. S., MANWELL R. D. **Prática Malariology**. W. B. Saunders Company, Philadelphia e London, 1946.

SALLES, J. M. C.; SALLES, M. J. C. **Antimicrobianos (Antibacterianos, Antifúngicos, antivirais, Antiparasitários):** Quando indicar, como usar. Belém: Editora de UFPA, p. 472-473, 2000.

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

SCHLITZER, M. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. **Chemotherapy Medical Chemo**, v 2, n 7, p. 944-986, 2007.

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

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

SILVA, L. H. P.; OLIVEIRA, V. E. G. The malaria challenge: the Brazilian case and what can be expected from progress in genomics. **Ciência e saúde coletiva**, v.7, n 1, Rio de Janeiro, 2002.

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

SOURI E, FARSAN H, JAMALI F. Stereospecific determination of mefloquine in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography B**, 700, 215-222 1997.

SUCEN. **Histórico, situação atual e Plano de Identificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal.** Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/malaria>. Acesso em: 02 de março de 2009.

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.

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

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

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

TUTEJA R. Malaria – an overview. **FEBS Journal**, 274 4670-4679, 2007 VILLALÓN, J.M. Overview of Malaria: A first Step to a Cure. Disponível em: <<http://ecology.cwru.edu/malaria/Malaria%20Tutorial.htm>>. Acesso em 14 novembro 2009.

VILLALÓN, J.M. **Overview of Malaria: A first Step to a Cure**. Disponível em: <<http://ecology.cwru.edu/malaria/Malaria%20Tutorial.htm>>. Acesso em 14 novembro 2009.

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

WALKER, F.N.; NADJM, B.; WHITTY, C. J. M. Malaria, **Medicine**, v. 38, n. 1, p. 41-46, 2009.

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

WERNSDORFER W. H. The development and spread of drug resistant malaria. **Parasitology Today** v.7, p. 297-303, 1991.

WHITTY, C.J.M; ROWLAND, M.; SANDERSON, F.; MUTABINGWA, T. K. Science, medicine, and the future: Malaria. **Biologic Molecular Journal**, v. 325, p. 1220-1224, 2008.

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

ANEXO A
Termo de consentimento livre e esclarecido

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE MEFLOQUINA E CARBOXIMEFLOQUINA EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL ADSORVIDAS EM PAPEL DE FILTRO, POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE), EM PACIENTES COM MALÁRIA *FALCIPARUM* NÃO COMPLICADA.

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, enjoo 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 Lariam[®], composto de mefloquina.

Essa pesquisa é para sabermos a quantidade de mefloquina que permanece no seu sangue, depois de ter tomado os remédios. Para isso, haverá a necessidade de coleta de sangue, através de uma injeção no seu braço. Após coleta, realizada no Instituto Evandro Chagas, 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. Cópias dos resultados serão entregues aos respectivos participantes.

A presente pesquisa não acarreta riscos mínimos à vida dos pacientes, bem como assegura total e gratuita assistência, e será realizada em ambiente seguro, com materiais limpos, 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: Patrícia Marques de Ataíde
End: Rua Augusto Correa nº01; Fone: 2017733/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