



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E TECIDUAIS DE  
ITRACONAZOL EM PACIENTES COM CROMOBLASTOMICOSE**

**DANIELLA PATERNOSTRO DE ARAÚJO**

**Belém-Pará**  
**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DANIELLA PATERNOSTRO DE ARAÚJO**

**DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E TECIDUAIS DE  
ITRACONAZOL EM PACIENTES COM CROMOBLASTOMICOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, com requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira.

Belém-Pará

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará

---

***Araújo, Daniella Paternostro.***

Determinação das Concentrações Plasmáticas e teciduais de itraconazol em pacientes com cromoblastomicose/ Daniella Paternostro de Araújo - Belém, 2008. 86p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Linha de Pesquisa: Avaliação Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Vieira, José Luiz Fernandes.

Descritores: 1. Cromoblastomicose. 2. Itraconazol. 3. Concentrações plasmáticas e teciduais

UFPA/ICS/PPGCF/2008

---

**Autor:** Daniella Paternostro de Araújo

**Título:** Determinação das concentrações plasmáticas e teciduais de itraconazol em pacientesn com cromoblastomicose.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêutica.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

APROVADO EM: 01/09/2008

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva - ICS/UFPA

Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado - ICB/UFPA

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira - ICS/UFPA

Belém-Pará

2008

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Anselmo e Filomena, por estarem sempre presentes na minha vida.

Aos meus irmãos Giovanni, GianLuca e Deborah por todo apoio.

Ao Alan, pela sua paciência, carinho e amor na realização deste trabalho.

## DEDICATÓRIA ESPECIAL

A alguém muito significativo na minha trajetória que mostrou que por maior que seja isso, que chamamos de viver, ainda é muito pequeno para conter os sonhos e planos de quem veio para transformar vidas, pessoas assim nunca morrem, sim renascem toda vez que um de seus alunos realiza seus sonhos, obrigado Prof. Dr. José Carlos da Silva Rocha, "*In Memoriam*", esse trabalho é mais um dos frutos das inúmeras árvores de sonhos que você plantou em nossos corações.

## AGRADECIMENTOS

Á Deus por ter iluminado todos meus caminhos.

A Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêutica pela oportunidade de aprendizado.

Ao prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira, pela brilhante orientação, oportunidade, confiança, amizade e agradável convivência.

A minha Vó, Josefina Paternostro, tias e primos pela paciência e carinho do todos os dias.

As minhas amigas do Laboratório de Toxicologia, Tânia, kariane, Margareth, Larissa e Glaécia pelo incentivo e colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Cláudio Salgado e Dr. Jorge Pereira da Silva pelo apoio e cooperação para a realização deste trabalho.

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



## RESUMO

Cromoblastomicose é micose subcutânea causada pela implantação transcutânea de diversas espécies de fungos demáceos, isto é, fungos melanizados. Considerando a incidência desta doença no estado do Pará e a conseqüente morbidade dos pacientes afetados, com repercussões sociais e econômicas, fez-se necessário a otimização dos esquemas terapêuticos adotados, objetivando o melhor conhecimento da relação dose x resposta. O itraconazol é um dos poucos fármacos disponíveis para o tratamento, que apresenta marcada variabilidade cinética intra e inter individual, que compromete o estabelecimento da relação dose e resposta, bem como as concentrações plasmáticas e teciduais alcançadas. Neste sentido, este trabalho objetivou a validação da metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e posterior determinação de itraconazol em amostras de plasma e tecido em 20 pacientes com cromoblastomicose, atendidos no laboratório de Dermato-Imunologia Dr. Marcello Candia, Marituba, Pará, que utilizaram o medicamento nas doses de 200mg/dia e 400mg/dia. A técnica validada demonstrou resultados adequados de acordo com a legislação vigente. As concentrações plasmáticas e teciduais de itraconazol na dose de 200mg/dia foram  $121.3 \pm 87.9$  ng/mL e  $5.36 \pm 5.9$  µg/g a concentração plasmática média de itraconazol em pacientes usando 400mg/dia foi de  $290 \pm 234$  ng/mL, e as concentrações plasmáticas e teciduais médias de itraconazol nos pacientes que não apresentaram evolução clínica favorável, nas doses de 200mg, tornando-se necessário o aumento para 400mg foram  $217 \pm 216$  e  $304 \pm 173$  ng/mL ;  $14.87 \pm 12.94$  e  $21.80 \pm 6.62$  µg/g. A média das relações entre as concentrações teciduais e plasmáticas nos pacientes que apresentaram evolução clínica favorável nas doses de 200mg/dia foi  $44.29 \pm 67.12$  e as que não apresentaram evolução clínica favorável nas doses de 200mg/dia, sendo necessário o aumento para 400mg/dia foram  $68.52 \pm 59.90$  ;  $71.71 \pm 38.26$  respectivamente.

**Palavras Chaves:** Cromoblastomicose, itraconazol, concentrações plasmáticas e teciduais.

## ABSTRACT

Chromoblastomycosis is a subcutaneous mycosis caused by deployment transcutaneous of several species of dematiaceous fungi, that is, melanized fungi. Considering the incidence of this disease in the state of Pará and the resulting morbidity of patients affected, with economic and social repercussions, it was made to the optimization of therapeutic schemes adopted, to the best knowledge of the relation dose x response. The itraconazole is one of the few drugs available for treatment, which has marked variability kinetic intra and inter individual, which compromises the establishment of the relation dose and response, as well as tissue and plasma concentrations achieved. In this sense, this work aimed at validation of analytical methodology by High Performance Liquid Chromatography and subsequent determination of itraconazole in samples of plasma and tissue in 20 patients with chromoblastomycosis, assisted in the laboratory of dermatology Dr. Marcello Candia, Marituba, Pará, who used the drug in doses of 200mg/day and 400mg/day. The technique employed was validated and proved adequate results in accordance with applicable law. Concentrations of plasma and tissue of itraconazole in the dose of 200mg/day were  $121.3 \pm 87.9$  ng/mL and  $5.36 \pm 5.9$  µg/g. The average plasma concentration of itraconazole in patients using 400mg/day was  $290 \pm 234$  ng/mL, and the plasma and tissue mean concentrations of itraconazole in patients who showed no clinical favourable, at doses of 200mg, making it necessary to increase to 400mg were  $217 \pm 216$  and  $304 \pm 173$  ng/mL;  $14.87 \pm 12.94$  e  $21.80 \pm 6.62$  µg/g. The average of relation between tissue and plasma concentrations in patients who had positive developments in clinical in the doses of 200mg/day was  $44.29 \pm 67.12$  and those that did not show positive developments in clinical in the doses of 200mg/day, making necessary to increase to 400mg/day were  $68.52 \pm 59.90$  and  $71.71 \pm 38.26$  respectively.

**Keywords:** Chromoblastomycosis, itraconazole, plasma and tissue concentrations.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Aspectos clínicos das lesões de cromoblastomicose.....	16
<b>Figura 2.</b>	Células escleróticas (A), formação de hifas e células conidiógenicas(B).....	18
<b>Figura 3.</b>	Distribuição geográfica mundial dos casos de cromoblastomicose.....	19
<b>Figura 4.</b>	Mapa do Brasil com distribuição dos casos de cromoblastomicose.....	21
<b>Figura 5.</b>	Estrutura química dos derivados triazóis.....	27
<b>Figura 6.</b>	Concentrações plasmáticas de itraconazol (200 mg/dia) observadas após a alimentação e jejum.....	29
<b>Figura 7.</b>	Local de ação do itraconazol.....	32
<b>Figura 8.</b>	Fluxograma do procedimento analítico para determinação do itraconazol no plasma.....	41
<b>Figura 9.</b>	Fluxograma do procedimento analítico para determinação do itraconazol no tecido.....	42
<b>Figura 10.</b>	Cromatograma do plasma branco adicionado de cetoconazol (A) e itraconazol (B), na concentração de 100µg/mL e 1µg/mL, submetido ao procedimento de preparo da amostra e injeção no cromatógrafo, segundo metodologia validada.....	46
<b>Figura 11.</b>	Representação gráfica da linearidade do itraconazol.....	48
<b>Figura 12.</b>	Curva de calibração do itraconazol no plasma.....	49
<b>Figura 13.</b>	Curva de calibração do itraconazol no tecido.....	50
<b>Figura 14.</b>	Evolução clínica dos pacientes que usaram 200mg/dia de itraconazol.....	57
<b>Figura 15.</b>	Evolução clínica dos pacientes que usaram 400mg/dia de itraconazol.....	58

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b>	Medicamentos que podem interagir com itraconazol.....	31
<b>Tabela 2.</b>	Limite de detecção e quantificação do itraconazol.....	47
<b>Tabela 3.</b>	Linearidade do itraconazol.....	47
<b>Tabela 4.</b>	Curva de calibração do itraconazol no plasma.....	48
<b>Tabela 5.</b>	Curva de calibração do itraconazol no tecido.....	49
<b>Tabela 6.</b>	Recuperação do itraconazol.....	50
<b>Tabela 7.</b>	Precisão intra ensaio e inter ensaio do itraconazol, expressa como coeficiente de variação.....	51
<b>Tabela 8.</b>	Concentrações plasmáticas de itraconazol nos pacientes com cromoblastomicose fazendo uso de 200 mg ao dia.....	52
<b>Tabela 9.</b>	Concentrações plasmáticas de itraconazol nos pacientes com cromoblastomicose fazendo uso de 400 mg ao dia.....	53
<b>Tabela10.</b>	Concentrações plasmáticas de itraconazol nos pacientes com cromoblastomicose fazendo uso de 200 mg/dia que não apresentaram evolução favorável sendo necessário o aumento da dose para 400 mg/dia.....	54
<b>Tabela11.</b>	Concentrações teciduais de itraconazol nos pacientes com cromoblastomicose fazendo uso de 200 mg/dia.....	55
<b>Tabela12.</b>	Concentrações teciduais de itraconazol nos pacientes com cromoblastomicose fazendo uso de 200 mg/dia que não apresentaram evolução favorável sendo necessário o aumento para 400 mg/dia.....	56

**LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de Variação
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonization
LQ	Limite de Quantificação
M	Molar
mg/Kg	miligrama/kilo
mg/mL	miligrama/mililitro
MTBE	Éter metil-terc-butílico
NaOH	Hidróxido de Sódio
µg/mL	micrograma/mililitro
Nm	Nanômetro
PI	Padrão interno
pKa	- log da constante de ionização de um ácido
RPM	rotações por minuto
UEPA	Universidade Estadual do Pará
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Ultravioleta
ng/ml	nanograma/mililitro
µg/L	micrograma/litro
MC	Marcello Candia
µg/g	micrograma/grama

URE	Unidade de referência estadual
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
L/kg	Litro/quilograma
mL/min	miligrama/minuto
R	Coefficiente de correlação
$\mu\text{L}$	microlitro
NaOH	Hidróxido de Sódio
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de Zinco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1. CROMOBLASTOMICOSE: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
1.2. ETIOLOGIA E ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	17
1.3. HABITAT.....	18
1.4. EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.5. PATOGENIA.....	23
1.6. TRATAMENTO DA CROMOBLASTOMICOSE.....	24
1.7. ITRACONAZOL.....	26
<b>1.7.1. Estrutura química e características físico-química</b> .....	26
<b>1.7.2. Aspectos farmacológicos do itraconazol</b> .....	27
<b>1.7.3. Indicações terapêuticas</b> .....	28
<b>1.7.4. Propriedades farmacocinéticas do itraconazol</b> .....	28
<b>1.7.5. Mecanismo de ação do itraconazol</b> .....	32
<b>1.7.6. Reações adversas</b> .....	33
<b>1.7.7. Efeitos tóxicos</b> .....	33
<b>1.7.8. Determinação das concentrações plasmáticas e teciduais do itraconazol</b> .....	33
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	36
3.1. GERAL.....	36
3.2. ESPECÍFICOS.....	36
<b>4. MATERIAL E METODOS</b> .....	37
4.1. POPULAÇÃO ALVO.....	37
4.2. AMOSTRAS.....	37
4.3. ESQUEMA TERAPÊUTICO.....	38
4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	38
4.5. APARELHOS E EQUIPAMENTOS.....	38
4.6. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	39
4.7. PADRÕES DE REFERÊNCIA E REAGENTES.....	39
4.8. SOLUÇÕES PADRÃO, CALIBRADORES E CONTROLES.....	39
<b>4.8.1. Soluções de trabalho</b> .....	39

4.8.2. Calibradores e controle.....	40
4.8.3. Procedimento de extração de itraconazol do plasma.....	40
4.8.4. Procedimento de extração de itraconazol do tecido.....	42
4.9. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	43
4.9.1. Limite de detecção e quantificação.....	43
4.9.2. Linearidade.....	43
4.9.3. Curva de calibração.....	43
4.9.4. Precisão intraensaio e interensaio.....	44
4.9.5. Recuperação absoluta.....	44
4.9.6. Avaliação estatística.....	45
4.9.7. Aspectos éticos.....	45
5. RESULTADOS.....	46
5.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	46
5.1.1 Tempo de retenção.....	46
5.1.2 Limite de detecção e quantificação.....	47
5.1.3 Linearidade.....	47
5.1.4 Curva de calibração no plasma.....	48
5.1.5 Curva de calibração no tecido.....	49
5.1.6. Recuperação.....	50
5.1.7. Precisão intra ensaio e inter ensaio.....	51
5.2. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMATICAS DE ITRACONAZOL EM PACIENTES COM CROMOBLASTOMICOSE.....	51
5.3. EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES.....	57
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXO.....	83



## 1. INTRODUÇÃO

---

---

### 1.1. CROMOBLASTOMICOSE: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os fungos são organismos diversificados, eucariotos, heterotróficos e osmotróficos. Estima-se que existam entre 100.000 e 1.000.000 de espécies fúngicas habitando o planeta. A convivência com os fungos tem levado a evolução nos animais multicelulares de mecanismos inatos e adaptativos de defesa. Poucas espécies causam regularmente doenças invasivas em humanos, pois a maioria atua como agentes oportunistas nos indivíduos com deficiências imunes específicas (LEVITZ, 2004).

As micoses subcutâneas representam um grupo heterogêneo de infecções, resultantes, geralmente, da penetração direta do fungo na pele através de traumatismo, espalhando-se pelos tecidos próximos a área de implantação (RIVITTI & AOKI, 1999).

Dentre as micoses subcutâneas de interesse médico, se destaca a cromoblastomicose, que é causada pela implantação transcutânea de diversas espécies de fungos demáceos, isto é, fungos melanizados. É também conhecida como: cromomicose, micose de Carrión, micose de Lane – Pedroso, dermatite verrucosa e blastomicose negra (MASLIN et al., 2001).

Estas espécies fúngicas são denominadas de fungos escuros ou demáceos, por apresentarem pigmentação escura da parede celular e pela presença de melanina (NEIVA et al., 2002) que é um polímero multifuncional de alto peso molecular, formado a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos (SILVA et al., 2007).

Tal pigmento, além da ação fotoprotetora, que permite ao fungo se desenvolver nos ambientes ensolarados, também atua como fator de virulência (RIVITTI & AOKI, 1999).

A sobrevivência de um fungo demáceo no hospedeiro humano, o qual é considerado um habitat hostil, é favorecida pela presença de melanina na parede celular, pelos lipídios das diversas estruturas celulares e pela termotolerância a 37°C (RIBEIRO et al., 2006).

Os agentes causadores da cromoblastomicose são saprófitas, e a infecção ocorre após inoculação percutânea dos conídios ou hifas, os quais crescem na matéria orgânica em decomposição, farpas de madeira, gravetos e espinhos de plantas vivas ou mortas (RUBIN et al., 1991; SALGADO et al., 2004; ZEPPENFELD et al., 1994).

A cromoblastomicose apresenta aspecto clínico diversificado, sendo encontradas lesões nodulares, verrucosas, tumorais, em placas, cicatriciais e tricofitóides, variando desde lesões localizadas até as disseminadas, que caracterizam a cromoblastomicose cutânea disseminada (SALGADO et al., 2005) (Figura 1).



**Figura 1:** Aspecto clássico das lesões de cromoblastomicose. A) lesão vegetante com fibrose acentuada), B) Lesão verucosa, C) Lesão tricofitóide. D) Lesão crostosa, E) Caso de cromoblastomicose cutânea disseminada.

Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia UEPA/UFGA/MC.

As lesões se localizam, geralmente, nos membros inferiores e raramente em outros locais da superfície cutânea. Em alguns casos, pode ocorrer a disseminação da doença com o comprometimento dos órgãos internos (SAMPAIO & RIVITTI, 2000).

A cromoblastomicose é de caráter endêmico e prevalece, basicamente, na população rural das zonas de climas tropical e subtropical. Acomete indivíduos

adultos do sexo masculino na proporção de 15:1 em relação ao feminino. O que se justifica pelo fato de que os traumatismos que propiciam a implantação transcutânea do fungo resultam das atividades rurais, as quais são exercidas principalmente pelos homens (RIBEIRO et al., 2006).

## 1.2. ETIOLOGIA E ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Os agentes etiológicos mais comuns são: *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrionii* e *Phialophora verrucosa*. Poucos casos são associados à *Fonsecaea compacta*, *Rhinocladiella aquaspersa* e espécies diferentes de *Exophiala* (SEVERO, 2005).

*F. pedrosoi* é o agente etiológico mais freqüente. Pertence ao reino fungi, filo ascomiceta, classe euascomiceta, ordem chaetothyriales, família herpotrichiellaceae e gênero *Fonsecaea* (RIBEIRO et al., 2006).

Os fungos que causam cromoblastomicose se assemelham na pigmentação, estrutura antigênica, morfologia, propriedades fisiológicas e formação de conídios. Nos tecidos se transformam da forma filamentosa, para o estágio parasitário característico da doença, exibindo estruturas esféricas ou ovóides de 4 a 12 µm de diâmetro que se multiplica por septos ou trabéculas, em um ou dois planos distintos, acompanhada de uma reação inflamatória, granulomatosa e purulenta, denominada célula esclerótica (célula muriformes ou fumagóides) (MARTÍNEZ & TOVAR, 2007).

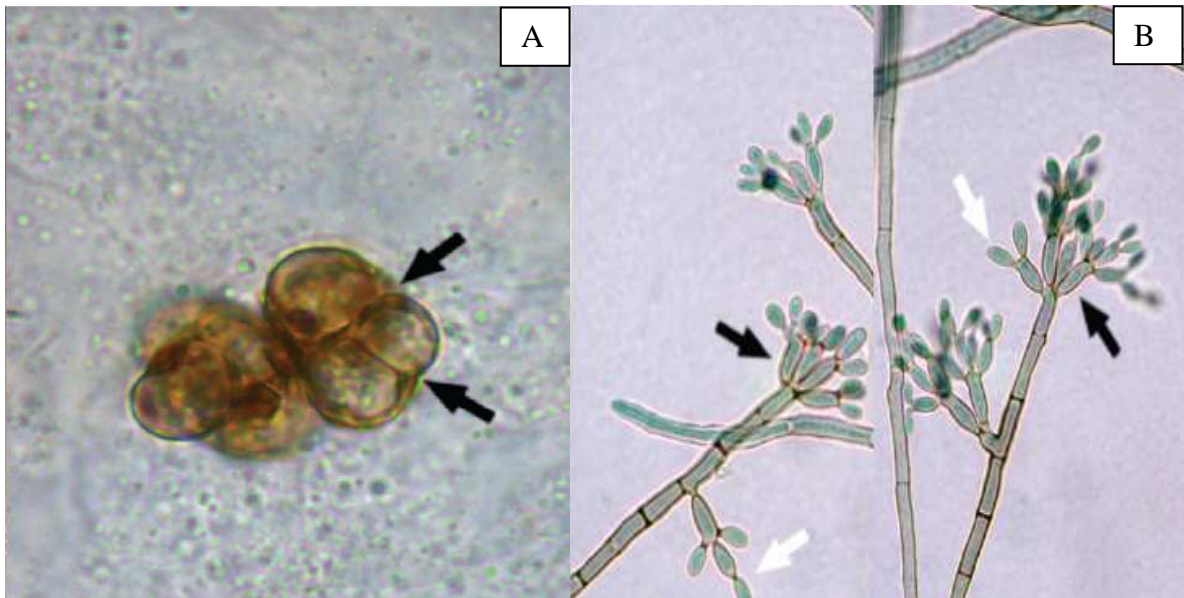
Este dimorfismo, que é a habilidade de alguns fungos em mudar da forma de levedura ou filamentosa para outras, é encontrado na fase parasitária, funcionando como resposta às alterações das condições naturais de crescimento para o novo ambiente, ou seja, o hospedeiro (MADHANI & FINK, 1998).

Tais células constituem as formas fúngicas presentes no hospedeiro e representam uma forma vegetativa intermediária entre o conídio e a hifa (MC GINNIS, 1983) (Figura 2A).

Ressalte-se que a diferenciação das hifas ou conídios em células escleróticas ou “células muriformes”, no tecido do hospedeiro, é um aspecto biológico interessante, cujo mecanismo ainda não está totalmente esclarecido (WALTER et al., 1982).

A presença destas células no tecido parasitado confirma o diagnóstico de cromoblastomicose, mas não identifica o agente, o que somente é obtido após a

visualização microscópica das várias características morfológicas. Como por exemplo, *F. pedrosoi* é reconhecido pela produção de septos ou hifas marrons escuras e conidióforos que se ramificam em ápices, os quais são marrons pálidos, eretos, septados e simpodiais, com zonas conidiógenicas confinadas a parcela superior. Os conídios são marrons e em forma de barril (RIBEIRO et al., 2006) (Figura 2B).



**Figura 2:** Células escleróticas (A), Formação de hifas e células conidiógenicas (B).

Fonte: SALGADO, 2004.

### 1.3. HABITAT

Os fungos causadores da cromoblastomicose se encontram em saprofitismo na natureza, ocorrendo, provavelmente, na vegetação, no solo e no ar (AZULAY & AZULAY, 2004).

Estudos demonstraram o isolamento dos diversos tipos de fungos dermatíaceos de várias espécies vegetais. No Brasil, estudo realizado por SALGADO et al. (2004), identificou *F. pedrosoi* nos espinhos de *Mimosa pudica*, popularmente conhecida como dormideira ou maria-fecha-a-porta.

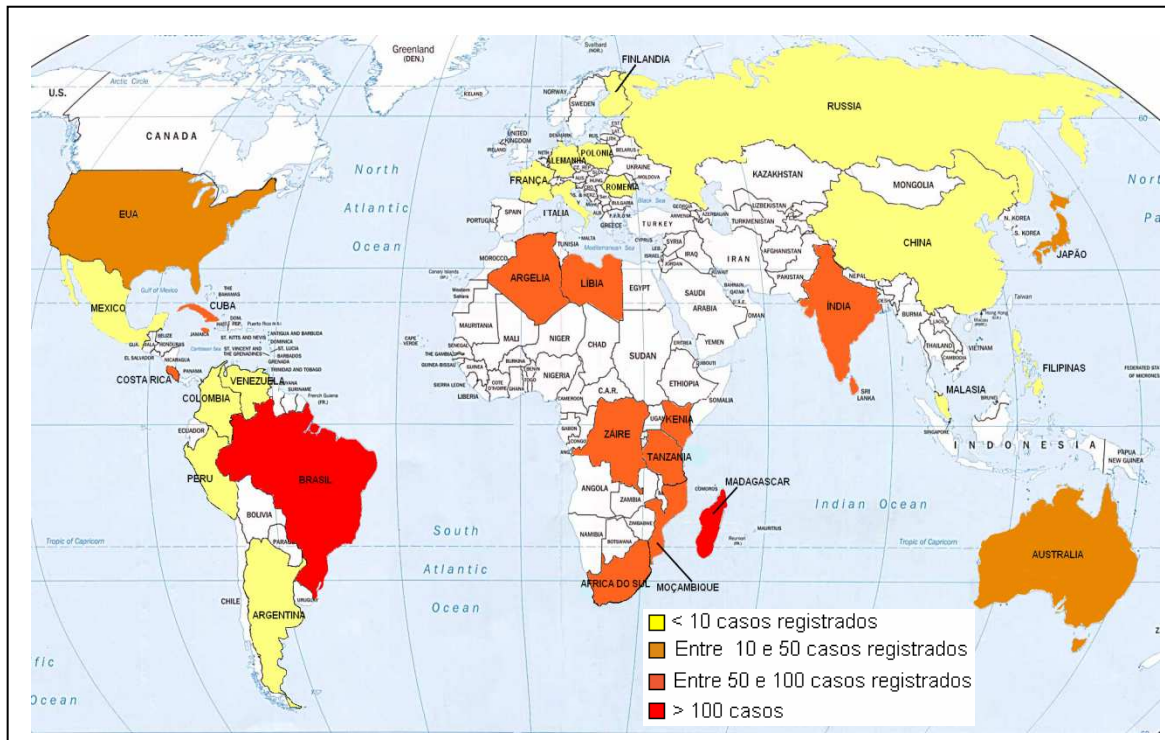
No estado do Maranhão SILVA et al. (1995), sugeriram a ligação entre a ocorrência de lesões nas nádegas e o hábito da população de sentar nas cascas de babaçu (*Orbignya phalerata*). O isolamento de *F. pedrosoi* tem sido demonstrado,

também, em diferentes amostras desta espécie vegetal, como troncos e folhas em decomposição.

De acordo com QUEIROZ-TELLES (1992), *P. verrucosa*, tem sido isolado em diversos países, de materiais como plantas, gramas e solo como por exemplo, *C. carrionii* foi isolado de cactos e espinhos de uma zona endêmica semi-árida da Venezuela (ZEPENFELDT, 1994).

#### 1.4. EPIDEMIOLOGIA

A cromoblastomicose é uma doença de distribuição universal, descrita nas Américas, Europa, Ásia, Austrália, Oceania e África, com maior frequência nas zonas rurais das regiões de clima quente e úmido (BURSTEIN, 2004). Os países com maior prevalência são Madagascar, África do Sul, Brasil e Costa Rica (Figura 3).



**Figura 3** : Distribuição geográfica mundial dos casos de cromoblastomicose.

Amarelo (países com menos de 10 casos registrados) marrom (entre 10 e 50 casos registrados) laranja (entre 50 e 100 casos catalogados) e vermelho (acima de 100 casos).

Fonte: SILVA, 2006.

Na América do norte foram descritos casos nos Estados Unidos e México, principalmente nos estados de Oaxaca e Veracruz (MARTINEZ & TOVAR, 2007).

Na Venezuela, as lesões são comuns nos ombros, tórax e troncos, sendo nestes casos o *C. carrionii* o principal agente. Ocorre nas regiões de baixa umidade e semi-áridas como nos estados de Lara, Falcon e Zulia. A população mais afetada é composta por homens cuja ocupação é a criação de caprinos (YEGRES, 1985).

Na Colômbia, especialmente nas áreas rurais de Medelin e Córdoba, a maioria dos casos (75%) associa-se a *F. pedrosoi*, e o restante a *P. verrucosa* (VELÁSQUEZ et al., 1976).

Em Cuba, no ano de 1998, SIMON acompanhou 49 pacientes no período de oito anos e encontrou maior frequência de *F. pedrosoi*. MACOLA et al. (1984), relataram que em 35 pacientes com cromoblastomicose, diagnosticados em Cuba, entre 1976 e 1981, predominou *F. pedrosoi* e apenas um caso de *F. compactum*.

Na Europa, foram relatados casos de cromoblastomicose em diversos países, como França (LE GALL et al., 1993), Rússia (MALKINA & DARCHENKOVA, 1977) e Finlândia (SOUCK, 1988). Na Ásia, foram diagnosticados na China, Filipinas (AL DOORY, 1972), Malásia (JAYALAKSHIMI et al., 1990), Índia, onde até 1954 eram conhecidos 30 casos (RAJENDRAN et al., 1997) e no Sri Lanka, onde foram registrados 71 casos (ATTAPATTU, 1997).

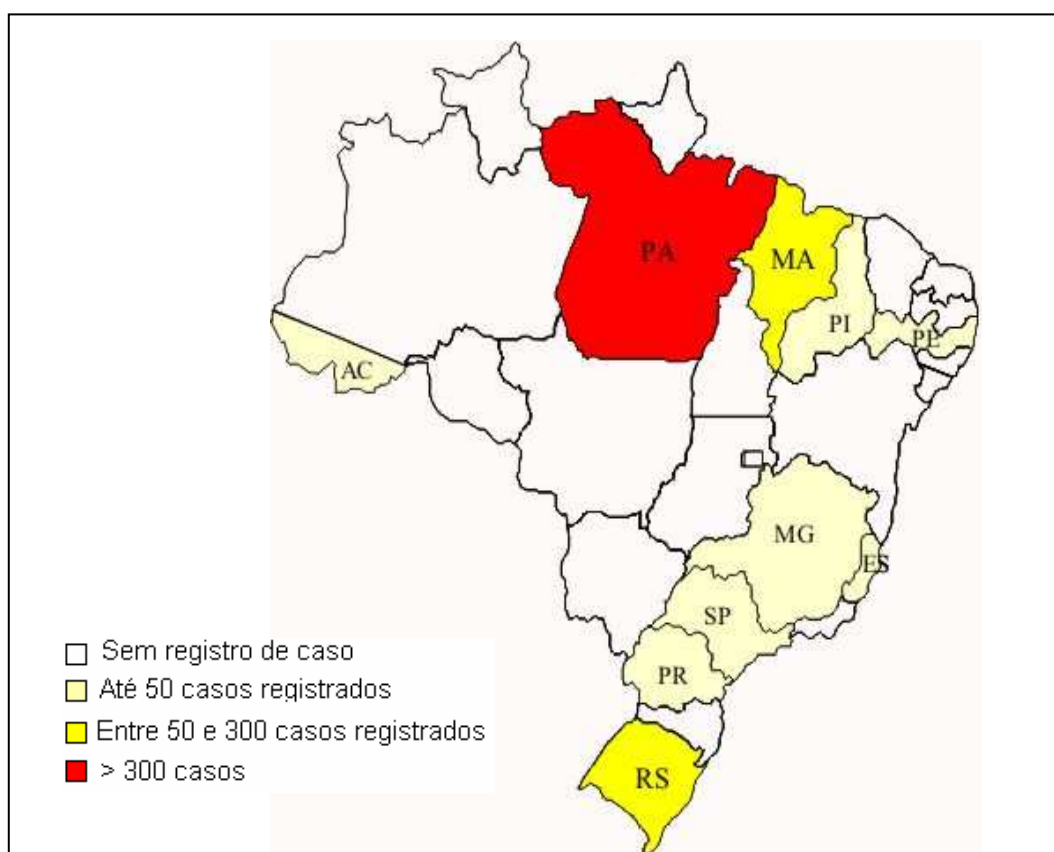
No Japão, desde 1955, o número de casos tem aumentado anualmente. Até 1983 foram observados 290 casos com isolamento de 275 amostras. O agente etiológico em 215 casos (86%) foi *F. pedrosoi*, e ao contrário de outras regiões mundiais, em mais de 50% dos casos, as lesões eram localizadas na extremidade superior do corpo, na face e no pescoço (FUKUSHIRO, 1983). Uma revisão de casos deste País destacou um adicional de 212 casos até o ano de 2001 (KONDO et al., 2005).

Na Austrália, na maioria dos casos relatados, o principal agente etiológico principal é *C. carrionii* (LESLIE & BEARDMORE, 1979). Sua predominância está relacionada ao clima continental, quente e seco daquele País, onde a precipitação pluvial é escassa, pois apenas 11% do território recebe mais de 1000 mm<sup>3</sup> de chuvas, enquanto 2/3 recebe menos de 500 mm<sup>3</sup> de chuvas ao ano.

No Continente Africano, a cromoblastomicose foi relatada no Quênia, Tanzânia (AL DOORY, 1974), Zaire (BANKS, 1985), Líbia (BHAKTAVIZIAM et al., 1983) e Moçambique (MAGALHÃES & MEYER, 1970).

Em Madagascar, o principal local de ocorrência da cromoblastomicose no mundo, foram registrados 1343 casos no período de 1955 a 1994. A maioria dos pacientes eram trabalhadores rurais e lenhadores, atividades que justificam a localização das lesões, 75% nas pernas e pés, sendo que 87% dos pacientes são do sexo masculino e 98% com idade superior a 16 anos. Dos casos isolados e identificados por cultivo, o agente etiológico foi *F. pedrosoi* em 61,8%, das lesões dos pacientes oriundos das regiões de floresta e em 38,2% o *C. carrionii* foi isolado daqueles oriundos das regiões semi - desérticas do País (ESTERRE et al., 1996).

No Brasil, a cromoblastomicose ocorre em vários estados, com casos distribuídos por todas as regiões geográficas (Figura 4). Estudos realizados no Maranhão, Rio Grande do Sul e na Amazônia mostram que estas áreas podem ser consideradas endêmicas da doença (MARQUES et al., 2006; MINOTTO et al., 2001; SILVA et al., 1989).



**Figura 4:** Mapa do Brasil com distribuição de casos dos cromoblastomicose no país: Branco (sem registro de caso), amarelo-claro (até 50 casos registrados), amarelo vivo (entre 50 e 300 casos registrados) e vermelho (mais de 300 casos).

Fonte: Silva, 2006.

A Amazônia é considerada a principal área de ocorrência da doença, pois as condições climáticas, incluindo precipitação anual média de 1500-1700 mm<sup>3</sup>, temperatura de 24 - 26 °C e umidade anual relativa de aproximadamente 83% parecem contribuir, decisivamente, para o crescimento do fungo na natureza (MARQUES et al., 2006).

O Estado do Maranhão ocupa o terceiro lugar no registro da doença no Brasil e a maioria dos casos ocorre na região denominada “baixada maranhense”. Recentemente dois casos de cromoblastomicose causados por *F. pedrosoi* foram relatados neste estado, com lesões situadas na região do glúteo o que provavelmente está associado, associado à importante atividade ocupacional dos residentes que é quebrar o côco babaçu (*Orbignya phalerata*). Os autores chamam atenção para a possibilidade da infecção ocorrer durante a extração deste produto. (MARQUES et al., 2006).

O Babaçu é uma árvore nativa desta região, com ocorrência nordeste-sudeste em direção ao Maranhão, chamada de floresta de coco ou zona de babaçu. O Estado contém 54,2% das árvores desta espécie, no país com 2/3 destas, localizadas na “baixada maranhense”. Aproximadamente 300 famílias rurais estão envolvidas na extração das sementes do babaçu, por um processo manual no qual o indivíduo senta no chão ou na casca do coco, batendo a fruta com uma vara de madeira de encontro a uma faca ou machado, um procedimento que freqüentemente causa ferimentos. Aproximadamente 76.9% dos pacientes com cromoblastomicose são originários desta área, caracterizando assim, a ocupação como importante via de exposição ao fungo (MARQUES et al., 2006).

No Rio Grande do Sul, MINOTTO et al. (2001), revisaram 100 casos de pacientes entre 1963 e 1998. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados acima, com predominância da doença no sexo masculino, entre lavradores com lesões nos membros inferiores. A maioria dos casos foi encontrada na região norte do estado.

MATTE et al. (1997), associaram a presença do fungo no Rio Grande do Sul, aos fatores climáticos, revestimento e composição do solo, os quais favoreceriam a proliferação dos fungos. Os autores destacam ainda, que nesta região predomina a pequena propriedade rural, sendo hábito do agricultor trabalhar diretamente na terra, descalço e, usualmente, de calças arregaçadas. O tempo médio entre o



aparecimento da doença e o diagnóstico médico foi de 14 anos e *F. pedrosoi* foi encontrado em 96% dos casos.

Aspectos epidemiológicos semelhantes foram observados por SILVA et al. (1998) na região amazônica, cujo estudo demonstrou que o estado do Pará apresenta alta prevalência de cromoblastomicose, registrando mais de 300 casos nos últimos 40 anos. CASTRO & SCHWARTZ (2003), em recente estudo na Amazônia Brasileira divulgaram uma incidência elevada de cromoblastomicose (16 casos para 10.000 habitantes) em uma vila chamada Monte Negro, no estado de Rondônia.

O Estado do Pará é a principal área endêmica do País com 325 casos registrados em 55 anos (SILVA et al., 1998). Entre os anos de 2001 a 2006, foram diagnosticados na Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcelo Candia” (URE Marcello Candia), localizada no município de Marituba no estado do Pará, mais de 80 novos casos de cromoblastomicoses (Dados Não Publicados-URE- Marcello Candia).

## 1.5. PATOGENIA

A infecção geralmente ocorre após traumatismo da pele e inoculação percutânea dos conídios ou hifas. Geralmente os pacientes não se recordam dos traumas ou injúrias na pele, uma vez que as manifestações da doença ocorrem algum tempo após a exposição ocupacional (SALGADO et al., 2004).

A infecção avança lentamente no transcorrer dos anos, à medida que o agente etiológico se adapta as condições do hospedeiro. Uma vez no tecido, o fungo converte-se da forma filamentosa no estágio parasitário, caracterizado por estruturas multicelulares de paredes espessas e de cor negra, denominadas de células muriformes ou células escleróticas (QUEIROZ-TELLES et al., 2003).

As células escleróticas maduras desenvolvem septos paralelos e perpendiculares. De cada fragmento, uma nova célula esclerótica madura é formada. Ressalte-se que as células fagocitárias (macrófagos polimorfonucleares) são incapazes de destruir esta forma (MARTINEZ & TOVAR, 2007).

ESTERRE et al. (1992), demonstraram em exame histológico de lesão, uma resposta neutrofílica granulomatosa associada a células multinucleadas, abscessos neutrofílicos e hiperplasia pseudo-epiteliomatosa.

Há uma resposta fibrosa densa no tecido dérmico e no subcutâneo, que foram inicialmente atribuída a um mecanismo de defesa do hospedeiro para prevenir a progressão da doença. As células escleróticas de *F. pedrosoi* podem permanecer viáveis por mais de 18 meses, após o tecido infectado ter sido coletado do paciente. (MARTINEZ & TOVAR, 2007; BURSTEIN, 2004).

A extensiva fibrose, associada ao infiltrado inflamatório crônico e a susceptibilidade aumentada às infecções secundárias, compromete o fluxo linfático causando, eventualmente, linfadenia abaixo dos locais afetados. A deterioração da circulação, causada pela linfadenia crônica, conduz, por sua vez, a atrofia da pele e deformidade anquilosante das juntas, que podem acarretar incapacidade permanente (MARTINEZ & TOVAR, 2007).

As lesões que se desenvolvem no sítio da inoculação, ocasionalmente podem se propagar pela via linfática para locais remotos, apresentando aspecto polimórfico, como: nodulares, papilomatoso, coliforme, verruciforme, hiperqueratósico, cicatricial, em placas ou combinados (BURSTEIN, 2004).

## 1.6. TRATAMENTO DA CROMOBLASTOMICOSE

A cromoblastomicose é uma das micoses mais recalcitrantes em termo de tratamento. A terapia é longa e podem ocorrer recidivas, em alguns casos, e dependendo da situação clínica e da extensão das lesões, os procedimentos terapêuticos podem variar (RIBEIRO et al., 2006).

Diferentes esquemas terapêuticos, como o uso da anfotericina B, 5 – fluorcitosina, fluconazol, tiabendazol, e cetoconazol, foram utilizados nas últimas décadas, entretanto com baixa taxa de cura e muitas recidivas (CASTRO, 1992), outras terapias incluem métodos físicos, cirurgias convencionais ou a laser, termoterapia e crioterapia (HIRUMA et al., 1992)

Segundo BEDOUT et al. (1997), o tratamento desta micose é difícil pelos seguintes fatores: escassez de antifúngicos eficazes, necessidade de período prolongado de tratamento, dificuldade de acompanhamento clínico dos pacientes que moram nas áreas rurais distantes e caráter recrudescente da doença.

O sucesso terapêutico depende: da diversidade dos agentes etiológicos, da suscetibilidade às drogas e da natureza hiperqueratolítica das lesões nodulares, que

dificulta a distribuição dos antifúngicos para os tecidos nos quais os fungos estão alojados (MARTINEZ & TOVAR, 2007).

A escolha do tratamento deve considerar várias condições tais como: agente causal, (pois os diversos tratamentos apresentam suscetibilidade diferenciada em função do agente), extensão das lesões, topografia clínica e estado de saúde do paciente (BONIFAZ et al., 2004; QUEIROZ-TELLES et al., 1992).

Associação de terapias têm apresentados bons resultados, como por exemplo, a combinação de itraconazol com a terbinafina (GUPTA et al., 2002), anfotericina-B com 5-fluorocitosina, raspagem e crioterapia (POIRREZ et al., 2000), 5-fluorocitosina e itraconazol, empregada para redução máxima das lesões, seguida de termoterapia (BONIFAZ et al., 2004).

Muitos antifúngicos orais e sistêmicos vêm sendo utilizados e diversos autores indicam o itraconazol como a melhor escolha, o qual, empregado nas doses diárias de 200 a 400 mg, é eficaz e bem tolerado pelos pacientes. UNGAKORN e REANGCHAINAM (2006), demonstraram que o uso pulsado de 400 mg deste medicamento é mais econômico e apresenta melhores resultados do que o regime diário convencional de 200 ou 400 mg, embora a duração do tratamento dependa dos casos individuais.

Até o presente momento, nenhum dos medicamentos ou procedimentos conhecidos para o tratamento da cromoblastomicose apresentou eficácia absoluta. Segundo CASTRO & SCHWARTZ (2003), o itraconazol produz melhora após alguns meses, entretanto a cura completa dificilmente é alcançada, especialmente nos casos severos.

SHEISHIMA et al. (2004) demonstraram que o itraconazol é eficaz para pacientes com cromoblastomicose em doses de 100, 200 e 400 mg/dia administrado isoladamente ou associado a criocirurgia.

Estudo de susceptibilidade *in vitro* de *F. pedrosoi* para diversos antifúngicos (anfotericina B, 5-fluocitosina, fluconazol e itraconazol) demonstrou que nenhum dos isolados apresentou resistência ao itraconazol na determinação da concentração inibitória mínima. No entanto, apesar deste medicamento ser uma droga efetiva, na determinação da concentração letal mínima, 41,7% dos isolados não foram mortos na presença do itraconazol (BEDOUT et al., 1997).

A proporção de falha observada com este antifúngico correlaciona com a experiência clínica, que mostra que 10% dos pacientes com cromoblastomicose não

são curados apesar do curso prolongado de até 20 meses de terapia. (BEDOUT et al., 1997). Contudo, o itraconazol é o medicamento mais empregado no tratamento da cromoblastomicose no Brasil (SEVERO, 2005).

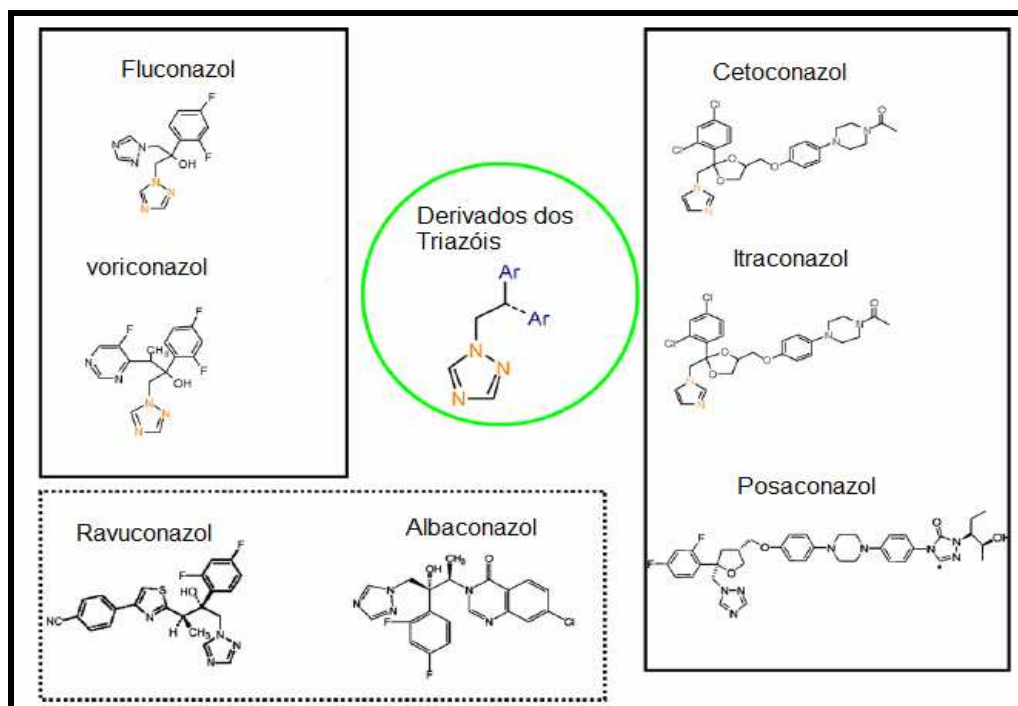
## 1.7. ITRACONAZOL

### 1.7.1. Estrutura química e características físico-químicas

A unidade estrutural básica dos antifúngicos azóis é a presença de cinco membros no anel azol, unidos por uma ligação do nitrogênio com o carbono aos outros anéis aromáticos (Figura 5). Os imidazóis (cetoconazol, miconazol e clotrimazol) apresentam dois átomos de nitrogênio no anel azol, e os triazóis (fluconazol e itraconazol) contém três átomos de nitrogênio no mesmo anel (SAAG & DISMUKES, 1988).

O fluconazol possui três átomos de nitrogênio no anel azol, que resulta na maior afinidade pelo citocromo P450, entretanto possui uma cadeia lateral hidrofílica, que o diferencia do itraconazol, que é altamente lipofílico (BEULE, 1996; HEYKANTS et al., 1989) permitindo uma melhor penetração no tecido, prolongando a meia-vida e aumentando a especificidade para enzimas fúngicas. (PRENTICE & GLASMACHER, 2005)

O itraconazol é uma mistura racêmica 1:1:1:1 de quatro diastereoisômeros (dois pares enantioméricos), cada um possuindo três centros quirais. Apresenta fórmula molecular de  $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$  e peso molecular de 705,64. É um pó branco ligeiramente amarelado, insolúvel na água, ligeiramente solúvel nos álcoois e altamente solúvel em diclorometano; possui pKa 3.70 e coeficiente de partição de 5.66 em pH de 8.1 (BEULE, 1996).



**Figura 5:** Estrutura química dos derivados dos triazóis.

Fonte: BILLAUD, 2007.

### 1.7.2. Aspectos farmacológicos do itraconazol

Os antifúngicos azólicos incluem duas classes amplas – os imidazóis (cetoconazol, miconazol e clotrimazol) e os triazóis (itraconazol e fluconazol). Com exceção do cetoconazol, o uso dos imidazóis é limitado ao tratamento das micoses superficiais, enquanto que os triazóis possuem largo espectro de uso no tratamento das infecções fúngicas superficiais e sistêmicas (CAZADEY et al., 2007).

Os triazóis sistêmicos são biotransformados mais lentamente e têm efeito menor sobre a síntese dos esteróides humanos, quando comparados aos imidazóis, conferindo assim, maior segurança para o paciente. Tendo em vista estas vantagens, os congêneres modernos de desenvolvimento correspondem, em sua maioria, aos triazóis, ao invés dos imidazóis (CAZADEY et al., 2007).

### 1.7.3. Indicações terapêuticas

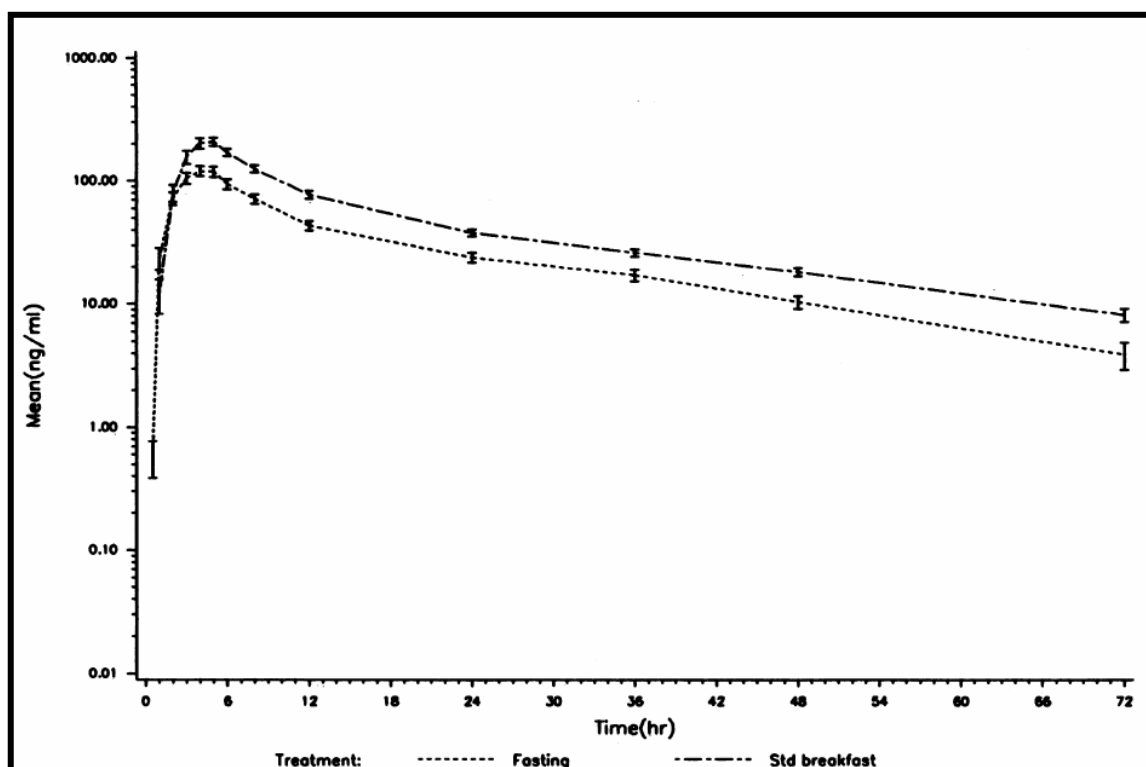
Apresenta amplo espectro de ação, sendo empregado no tratamento das micoses sistêmicas, como: aspergilose, blastomicose, candidíase, cromomicose, esperotricose, histoplasmosse e paracoccidioidomicose. Nas micoses superficiais é empregado no tratamento da candidíase oral e vulvovaginal, ceratite micótica, dermatofitoses, onicomicoses, pitiríase versicolor, *Tinea cruris*, *Tinea manuum* e *Tinea pedis* (CAZEDEY et al., 2007).

### 1.7.4. Propriedades farmacocinéticas do itraconazol

O itraconazol apresenta biodisponibilidade média de 55% com pico de concentração plasmática de 150 ng/ml, em cerca de 3 a 4 horas após a administração oral de uma dose única de 100 mg (SILVA, 2002). A absorção é significativamente reduzida nos pacientes com acloridria, cuja atividade gástrica está diminuída, ou naqueles que fazem uso de antiácidos ou supressores da secreção ácida gástrica (BEULE, 1996).

A absorção do itraconazol em cápsula é significativamente aumentada pela presença de alimentos, devendo ser ingerido durante as refeições para assegurar maior biodisponibilidade (Figura 6). De acordo com BARONE et al. (1993), a absorção em formulações de “pellets”, após estado de jejum foi cerca de 60% daquela após refeição. O itraconazol é lipossolúvel, e a presença de alimento pode aumentar a solubilidade, favorecendo a absorção sistêmica (BARONE et al., 1993).

Nos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) a absorção em cápsulas do itraconazol foi reduzida em 50%, quando comparada as pessoas saudáveis, o que está associado à hipocloridria e ao pH gástrico elevado, que são freqüentes nas infecções pelo HIV. (KOKS et al., 2002)



**Figura 6:** Concentrações plasmáticas de itraconazol (200 mg/dia) observadas após a alimentação e jejum.

Fonte: BARONE et al., 1993.

O itraconazol se distribui amplamente pelo organismo humano e se acumula nos tecidos em concentrações 3 a 20 vezes superiores aquelas do plasma (NEGRONI & ARRECHAVALA, 1993). É altamente lipofílico, se liga 99.8% às proteínas plasmáticas especialmente a albumina, e apresenta volume de distribuição médio de 11 L/kg (POIRIER & CHEYMOL, 1998; PRENTICE & GLASMACHER, 2005).

A concentração média de itraconazol na dose de 200mg/dia no estado de equilíbrio é de  $1.881 \pm 448$  ng/mL, atingida após 14 a 15 dias do tratamento prolongado, quando é alcançada a amplitude de resposta terapêutica (DUCHARME et al., 1995).

SEISHIMA et al. (2004), quantificaram itraconazol no plasma e tecido de pacientes com cromoblastomicose, que iniciaram tratamento com 100 mg/dia de itraconazol e logo em seguida a dose foi aumentada para 200mg até atingir o estado de equilíbrio no 15 dia. Foram encontrados 793.7 ng/mL no plasma e 1127.7 ng/mL

no tecido afetado após 3 horas da ingestão do medicamento; 355.6 ng/mL e 236.9 ng/mL após 12 horas e 43.7 ng/mL, 66.3 ng/mL após 24 horas, respectivamente.

Possui alta afinidade por tecidos queratinizados e, desta forma, se adere ao citoplasma lipofílico dos queratinócitos na unha, podendo permanecer nesta região, em concentrações terapêuticas, até seis meses após a descontinuação do tratamento (LEYDEN, 1998).

Concentrações elevadas do itraconazol foram detectadas na saliva, após 8 horas da administração de solução oral, porém nenhuma quantidade de hidroxitraconazol foi encontrada (KOKS et al., 2002).

Teores elevados também foram observados no fígado, tecido adiposo, osso, endométrio, muco cervical e vagina. O fármaco também pode ser encontrado em baixa quantidade nos fluídos corporais como: líquido cefalorraquidiano, humor vítreo e saliva (BEULE, 1996).

Em experimento clínico, foram determinadas as concentrações de itraconazol no tecido vaginal, pele e unha. O resultado demonstrou que concentrações terapêuticas efetivas de são mantidas por três dias, duas semanas e de três a seis meses após o término do tratamento para candidíase vaginal, dermatomicose e onicomicose, respectivamente (BEULE, 1996).

O itraconazol é biotransformado extensivamente no fígado, predominantemente pelo citocromo P450 3A4, resultando na formação de vários metabólitos (BEULE, 1996; NEGRONI & ARRECHAVALA; 1993). Dentre estes, o hidroxitraconazol, formado pela oxidação do grupo 1-metilpropil, é de particular interesse pela sua atividade antifúngica *in vitro*, com concentrações plasmáticas duas a três vezes superiores ao fármaco original, contribuindo, provavelmente, para o efeito terapêutico (POIRIER & CHEYMOL, 1998).

Este medicamento apresenta marcada variabilidade cinética inter e intrapaciente devido, principalmente, a incompleta biodisponibilidade oral e significativo metabolismo de primeira passagem (DUCHARME et al., 1995).

Em contribuição, a administração concomitante de itraconazol com outros fármacos biotransformados pela mesma via metabólica pode aumentar ou diminuir a concentração plasmática deste, promovendo sérios efeitos adversos ou diminuindo sua eficácia terapêutica (LEYDEN, 1998). Os principais agentes clinicamente importantes que interagem com itraconazol, especificamente na biotransformação, estão apresentados na Tabela 1.



**TABELA 1:** Medicamentos que podem interagir com Itraconazol

<b>Concentração plasmática de Itraconazol diminuída</b>	
Fenobarbital	Fenitoína
Carbamazepina	Rifampicina
Cisaprida	Tacrolimus
Ciclosporina	Terfenadina
Didanosina	Isoniazida
Antagonizantes do receptor H <sub>2</sub>	Antiácidos
<b>Concentração Plasmática de Itraconazol aumentada</b>	
Antibióticos Macrolídeos	Eritomicina, claritomicina
Inibidores de Proteases	Indinavir, ritonavir

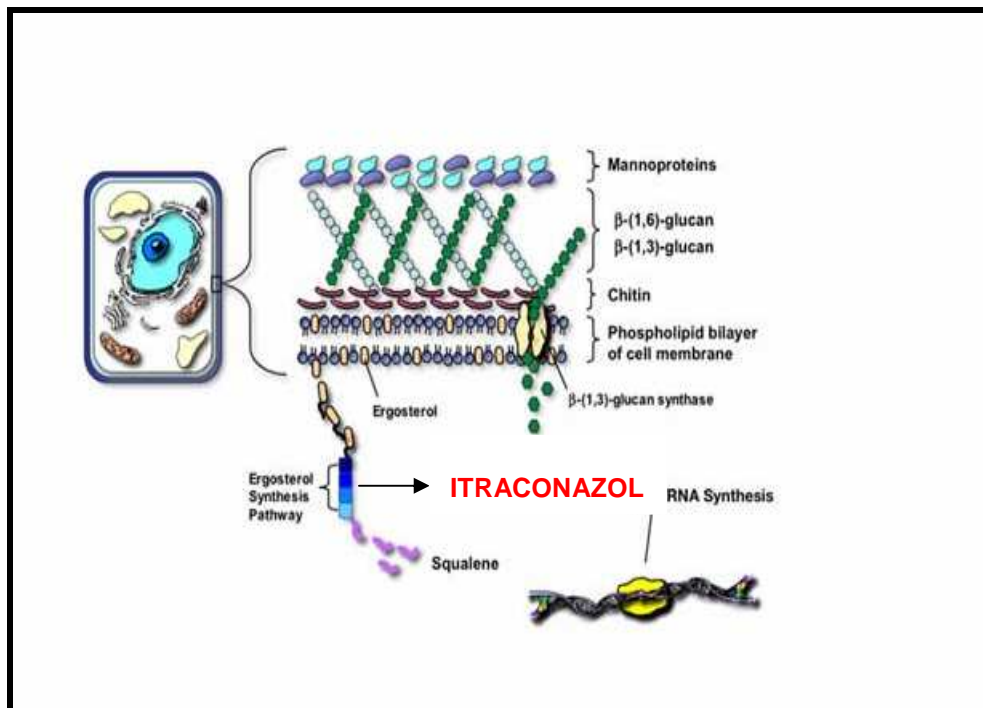
Fonte: LEYDEN, 1998.

O itraconazol é inibidor do citocromo P450 3A4, podendo interferir na cinética de outros medicamentos, fato observado com o próprio itraconazol uma vez que sua meia vida terminal é de 20 horas, aumentando para 30 horas após duas a quatro semanas de tratamento (POIRIER & CHEYMOL, 1998).

A excreção fecal inalterada de itraconazol varia entre 3 a 18% da dose administrada. Pelos rins, a fração da droga não biotransformada é insignificante, sendo menor que 0,03% da dose ingerida. Cerca de 40% da dose administrada é excretada na urina, sob a forma de metabólitos inativos, no período de uma semana. O clearance médio de itraconazol total no plasma é de  $381 \pm 95$  mL/minuto, após administração intravenosa (SILVA, 2002).

### 1.7.5. Mecanismo de ação do itraconazol

Baseia-se na inibição do sistema do citocromo P-450, responsável pela 14-desmetilação do lanosterol, precursor do ergosterol, um componente vital da membrana celular do fungo. (SAAG, DISMUKES, 1988) (Figura 7). Deste modo, o medicamento prejudica a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e conduz ao acúmulo de lanosterol e 14-alfa-metilesteróis, os quais podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acíclicas dos fosfolipídios, comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a ATPase e enzimas do sistema do transporte de elétrons, inibindo, conseqüentemente, o crescimento dos fungos (BEULE,1996; KOKS et al., 2002).



**Figura 7:** Local de ação do Itraconazol.

Fonte: [www.doctorfungos.org](http://www.doctorfungos.org). Acessado em 20 de maio de 2007.

### **1.7.6. Reações adversas**

Apesar das reações adversas não serem comuns, podem ser relatados: mal estar estomacal, vômitos, diarreia, cefaléia, náuseas, perda de apetite, febre, hiperemia cutânea, prurido, diminuição da libido, sonolência, hipertensão, hipercalemia, albuminúria e fadiga (KOKS, 2002).

### **1.7.7. Efeitos tóxicos**

O itraconazol foi associado com casos sérios de hepatotoxicidade, incluindo falência hepática e óbito, cujo mecanismo ainda permanece desconhecido, no entanto, sabe-se que é dose-dependente. Com o aumento da dose podem ser observados níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), além de necrose hepatocelular, degeneração dos hepatócitos, hiperplasia do ducto biliar e cirrose (SOMCHIT et al., 2004). O itraconazol também pode ocasionar efeitos sérios e raros envolvendo baço, pele e sangue (BRADBURY & JICK, 2002).

Este medicamento é classificado pelo *Food and Drug Administration (FDA)* como um agente da categoria C, ou seja, contra indicado para pacientes que estão grávidas, haja vista ser teratogênico em ratos e camundongos, ocasionando má formação óssea, encefaloceles e macroglossia. (BRADBURY & JICK, 2002).

### **1.7.8. Determinação das concentrações plasmáticas e teciduais do itraconazol.**

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), por sua sensibilidade e especificidade, é a principal técnica para determinação de itraconazol em diferentes fluidos biológicos (soro, plasma e tecido) (SRIVATSAN, et al., 2004; CAVAZOS-ROCHA, et al., 2007).

Desde 1989, HEYKANTS et al., descreveram estudo de farmacocinética sobre o itraconazol usando a CLAE para determinar os níveis plasmáticos deste fármaco.

COX et al. (1997), publicaram um método para análise de itraconazol e hidroxitraconazol em tecido e plasma por CLAE. Já GUBBINS et al. (1998), desenvolveram uma rápida e sensível metodologia para determinação de itraconazol em soro humano.

A avaliação da distribuição tecidual de itraconazol, de fluconazol e de griseofulvina, usou como metodologia de escolha a CLAE (SOBUE et al., 2004).

SRIVASTSAN et al. (2004), publicaram um método simultâneo de determinação de itraconazol e hidroxitraconazol em plasma humano. Também, CAZEDEY et al. (2007), descreveram o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE.

No estudo de investigação do itraconazol e de seu metabólico, em pacientes com cromoblastomicose, SEISHIMA et al. (2004) quantificaram as concentrações plasmáticas destas substâncias usando a CLAE como metodologia padrão.

## **2. JUSTIFICATIVA**

---

---

Considerando-se a incidência de cromoblastomicose no estado do Pará e a conseqüente morbidade dos pacientes afetados, com repercussões sociais e econômicas, fez-se necessário a otimização dos esquemas terapêuticos adotados, objetivando o melhor conhecimento da relação dose x resposta.

Neste sentido, o itraconazol, que é um dos poucos medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento desta doença, apresenta marcada variabilidade inter e intra – individual na sua farmacocinética, o que compromete o estabelecimento da relação dose, concentração plasmática e eficácia clínica, portanto a monitorização de suas concentrações plasmáticas e teciduais é indispensável, de modo a assegurar que as concentrações terapêuticas sejam alcançadas.

### 3. OBJETIVOS

---

---

#### 3.1. GERAL

- Determinar as concentrações plasmáticas e teciduais de Itraconazol em pacientes com Cromoblastomicose por *Fonsecaea pedrosoi*.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Validar a metodologia analítica para determinação de Itraconazol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), nas amostras de tecido e plasma;

- Determinar as concentrações plasmáticas e teciduais de Itraconazol em pacientes com Cromoblastomicose por *Fonsecaea pedrosoi*;

- Relacionar às concentrações teciduais e as plasmáticas de Itraconazol nas referidas amostras.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

---

### 4.1. POPULAÇÃO ALVO

A população alvo consistiu de 20 pacientes com diagnóstico de Cromoblastomicose por *Fonsecaea pedrosoi*, atendidos no Centro de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará Dr. Marcello Candia (MC), sediado no município de Marituba, Pará.

### 4.2. AMOSTRAS

O universo amostral foi composto por 37 amostras de tecido e plasma (com consentimento prévio) de cada paciente, fornecidas pelo Laboratório de Dermatologia e Imunologia UEPA/UFGPA/MC, Universidade do Estado do Pará (UEPA), Universidade Federal do Pará (UFPA). Foram selecionados para o estudo indivíduos de ambos os sexos, com idade superior a 15 anos, domiciliados na cidade de Belém ou interior do estado do Pará, com diagnóstico positivo de cromoblastomicose por *F. pedrosoi* e fazendo uso de itraconazol. Todas as amostras foram coletadas 24 horas após a ingestão da dose diária do medicamento e antes da próxima dose.

Para determinação de itraconazol nas amostras de plasma foram coletados cerca de 4 mL de sangue total em tubos tipo Vacuotainer, empregando-se EDTA como anticoagulante. A seguir, foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos, e o plasma foi separado e armazenado em tubo tipo Eppendorf a 5 °C até o processamento.

A biopsia foi realizada por um profissional habilitado na área médica (dermatologista) e o material coletado foi armazenado em tubo tipo Eppendorf a 5 °C até o processamento.

As amostras foram transferidas e analisadas no Laboratório de Toxicologia do Instituto de Ciência da Saúde da Universidade Federal do Pará - UFPA. O tempo decorrido entre a coleta e a análise das amostras foi inferior a 30 dias.

#### 4.3. ESQUEMA TERAPÊUTICO

O esquema terapêutico empregado foi o itraconazol, por via oral, em doses diárias de 200mg/dia ou 400mg/dia. Os comprimidos foram administrados durante as refeições para assegurar uma boa absorção. Ressalte-se que 11 pacientes utilizaram dose de 200mg e três de 400mg, entretanto como não houve evolução clínica favorável, foi necessário o aumento da dose para 400mg, de seis pacientes que utilizavam doses de 200mg.

#### 4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo, pacientes que apresentarem doença crônica ou infecciosa concomitante, aqueles com histórico de hipersensibilidade ao itraconazol ou a algum componente da formulação, gestantes, lactantes ou que recusaram a assinar o Termo de Consentimento (Anexo 1) e/ou discordaram de qualquer etapa da pesquisa.

#### 4.5. APARELHOS E EQUIPAMENTOS

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian-USA), composto de módulo de bombeamento isocrático ProStart 300 e detector Ultravioleta ProStar 220. A injeção foi manual com alça de amostragem de 20µl, modelo 772i (Rheodyne, USA). Para aquisição dos dados foi utilizado o sistema Star Chromatography Workstation versão 6.0 (Varian, USA).

A coluna analítica empregada foi a X-Tera LC18 (Waters, Saint Quentin-en-Yvelines, France), com 15 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partícula de 5 µm, com temperatura de operação de 25 °C .

Também foram utilizados: Ultra-som, modelo Q-335D, (Quimis, Brasil), agitador de tubos vórtex, modelo Q-22OB1, (Quimis, Brasil), centrífuga, modelo 2K15, (Sigma Laborzentrifugen, Germany), medidor de pH, modelo PHS-EB, (Phtek, Brasil), balança analítica modelo FA - 2104N (Bioprecisa, Brasil), geladeira (consul, Brasil) e sistema de purificação de água AQUAPUR, modelo AQ 0010 (Aquapur, Brasil).



#### 4.6. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para otimização dos parâmetros cromatográficos foram utilizadas soluções padrões de itraconazol e cetoconazol, em concentrações de 1µg/mL e 100µg/mL, respectivamente. As condições ideais para separação do itraconazol e do cetoconazol foram obtidas com fase móvel constituída por acetonitrila e água (60:40 v/v), ajustado o pH 3,0 com solução de ácido fosfórico a 50%. A vazão da fase móvel foi 1mL/min, a detecção em 258nm e o tempo de desenvolvimento cromatográfico de 15 minutos.

#### 4.7. PADRÃO DE REFERÊNCIA E REAGENTES

O padrão de itraconazol foi adquirido da Sigma (Sigma-Aldrich, Inc. St Louis, Mo) e cetoconazol, utilizado como padrão interno, da Sigma (Sigma-Aldrich, Inc. St Louis, Mo)

Os reagentes de grau analítico usados foram: Hidróxido de sódio (Vetec, Brasil), sulfato de zinco (Vetec, Brasil), ácido orto-fosfórico (Vetec, Brasil). A acetonitrila (J.T.Baker, Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ), metanol e éter metil terc butílico (Vetec, Brasil) foram de grau UV/HPLC.

#### 4.8. SOLUÇÕES PADRÃO, CALIBRADORES E CONTROLE

##### 4.8.1 Soluções de trabalho

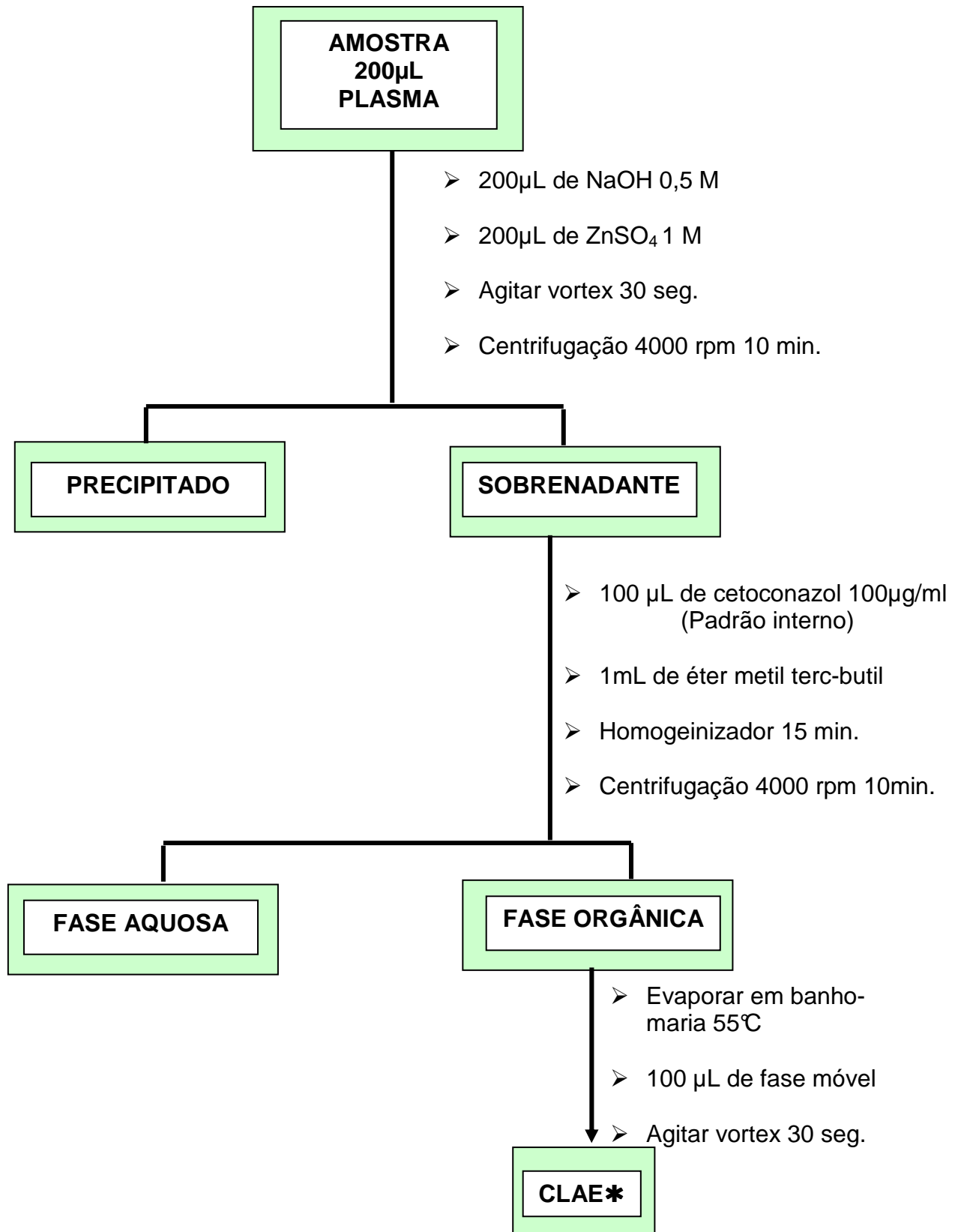
As soluções estoques de itraconazol em concentração de 1mg/mL, e do padrão interno, cetoconazol de 2mg/mL, foram preparadas pela dissolução dos respectivos antifúngicos em metanol e armazenadas a -20 °C. Duas soluções de trabalho (1µg/mL de itraconazol e 100µg/mL cetoconazol) foram preparadas imediatamente antes do uso, por diluições apropriadas em metanol.

#### **4.8.2 Calibradores e controle**

Os calibradores utilizados na validação da metodologia analítica foram preparados a partir da coleta de plasma e tecido, oriundo de pessoas que nunca fizeram uso de antifúngicos, aos quais foram adicionadas diluições sucessivas das soluções padrões de itraconazol em concentrações de 62.5ng/mL a 500ng/mL (plasma) e 4.51 µg/g a 48.78 µg/g (tecido).

#### **4.8.3 Procedimento de extração de Itraconazol do plasma**

A 200 µL de plasma, foram adicionados 200µL de solução de NaOH 0,5 M e 200ul de ZnSO<sub>4</sub> 1M, a seguir agitou-se em vórtex por 30 segundos e centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante, foi adicionada uma alíquota de 100 µL de cetonaazol em concentração de 100 µg/mL e 1 mL de éter metil terc butílico, homogeneizou-se por 15 minutos e centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi descartada e a orgânica evaporada em banho de água a 55°C. O resíduo foi ressuspendido com 100µL da fase móvel, agitado em vórtex por 30 segundo e injetado no cromatógrafo líquido (GUBBINS et al.,1998) (Figura 8).



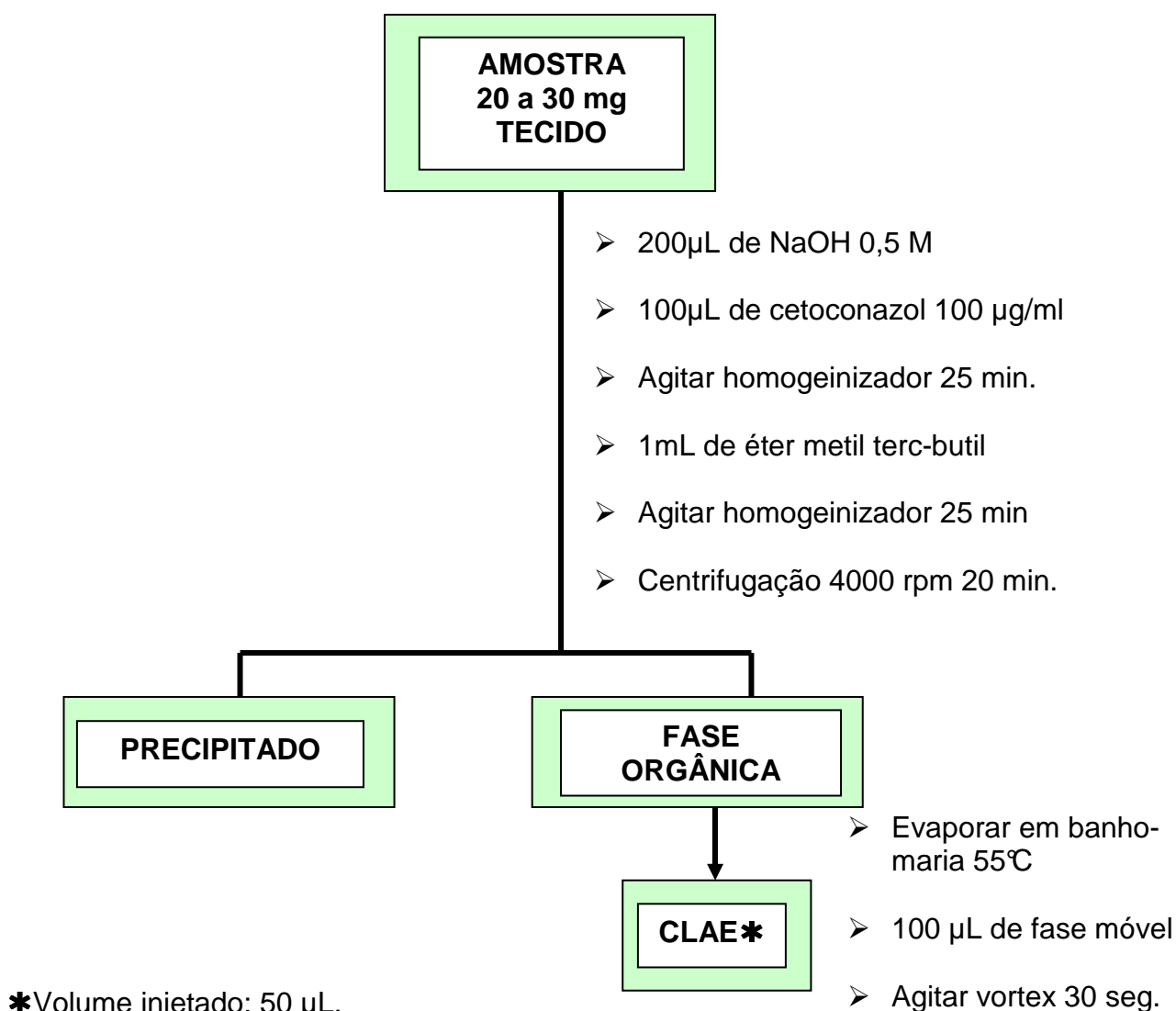
\*Volume injetado: 50 µL.

**Figura 8:** Fluxograma do procedimento analítico para determinação do itraconazol no plasma.

#### 4.8.4 Procedimento de extração de Itraconazol do tecido.

Em tubo tipo Eppendorf de 2 mL foram adicionados 20 a 30 mg de tecido, 100  $\mu$ L de cetoconazol, padrão interno, na concentração de 100  $\mu$ g/mL, e homogeneizados por 15 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de éter metil terc butílico e homogeneizado por 15 min e centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos.

A fase aquosa foi descartada e a orgânica evaporada em banho de água a 55°C. O resíduo foi ressuspensionado com 100 $\mu$ L da fase móvel, agitado em vórtex por 30 segundo e injetado no cromatógrafo líquido (DAROUICHE et al., 1995) (Figura 9).



**Figura 9:** Fluxograma do procedimento analítico para determinação de itraconazol no tecido.

## 4. 9. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

### 4.9.1 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi determinado a partir da injeção no cromatógrafo das diluições sucessivas das soluções de trabalho de itraconazol. Foram realizadas dez injeções de cada solução diluída no cromatógrafo. O limite de detecção foi considerado 3 vezes o desvio padrão da linha de base (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

O limite de quantificação foi determinado com calibradores contendo itraconazol nas concentrações de 31.25 a 1000ng/mL respectivamente, os quais foram submetidos ao procedimento de extração descrito em 4.8.3. As relações das área do itraconazol e do padrão interno nas diversas concentrações avaliadas foram empregadas para obtenção dos coeficientes de variação. E o limite de quantificação foi considerado aquele que apresentou coeficiente de variação inferior a 15% (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

### 4.9.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método, alíquotas da solução de trabalho de itraconazol, diluídas na fase móvel, em concentrações de 500, 250, 125, 62.5, 31.2 µL, juntamente com o padrão interno (100 µL na concentração de 100 µg/mL) foram transferidas para tubos cônicos, e injetadas no cromatógrafo em quintuplicata. As relações de área do itraconazol e do padrão interno (cetoconazol) foram plotados no eixo das ordenadas e as concentrações no eixo das abscissas. O coeficiente de pearson e a regressão linear foram calculados para obtenção do coeficiente de correlação e da equação da reta (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

### 4.9.3. Curva de calibração

A curva de calibração foi elaborada a partir dos calibradores, contendo itraconazol, em concentração variando de 62.5 ng/mL a 500 ng/mL (plasma) os quais foram submetidos ao procedimento de extração descrito em 4.8.3. Já a curva de calibração em tecido, em concentração variando de 609 µg/g a 3636 µg/g, foi elaborada conforme o item 4.8.4. As relações de área do itraconazol e do padrão

interno foram projetadas no eixo da ordenada e as concentrações na abscissa. A regressão linear foi feita para obtenção da equação da reta e o coeficiente de Pearson para avaliar a correlação entre a concentração e a relação das áreas. Os ensaios foram realizados em quintuplicata por três dias consecutivos (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

#### **4.9.4. Precisão intra ensaio e inter ensaio**

Para avaliação da precisão do método, foram empregadas amostras controle contendo itraconazol, em concentrações de 62.5 ng/mL a 500 ng/mL, as quais foram submetidas ao procedimento de extração conforme descrito no item 4.8.3. As amostras foram analisadas em triplicata durante 05 dias consecutivos. Para o cálculo da precisão intra ensaio foi obtida a média do coeficiente de variação das concentrações do fármaco das três amostras diárias analisadas. Já para a precisão inter ensaio foi obtido o coeficiente de variação dos teores do fármaco na amostras nos cinco dias de estudo (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

#### **4.9.5. Recuperação absoluta**

No estudo da recuperação absoluta do método, foram empregadas amostras controles contendo itraconazol em concentrações de 62.5 ng/mL a 500 ng/mL. As relações das áreas do itraconazol e do padrão interno nas diversas concentrações das amostras controle obtidas após o procedimento de extração, foi comparada com aquelas resultante da injeção direta no cromatógrafo da solução de itraconazol e do padrão interno, nas respectivas concentrações. Os resultados foram expressos em porcentagem da área da amostra extraída, em relação aquela da solução injetada diretamente no cromatógrafo, que representa 100%. As amostras foram analisadas em quintuplicata durante três dias consecutivos (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

#### **4.9.6. Avaliação estatística**

O coeficiente de “Pearson” ( $r$ ) e a regressão linear foram empregados na estimativa das correlações entre os diversos resultados obtidos no estudo.

O teste  $t$  de student foi empregado na comparação das médias e qui quadrado para avaliar a evolução clínica dos pacientes.

Os testes estatísticos mencionados foram realizados com auxílio dos programas *EXCEL®* E *INSTAT®*. O nível de significância aceito foi de 5%.

#### **4.9.7. Aspectos éticos**

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará sob o protocolo nº081//07 CEP-ICS/ UFPA (Anexo 2)

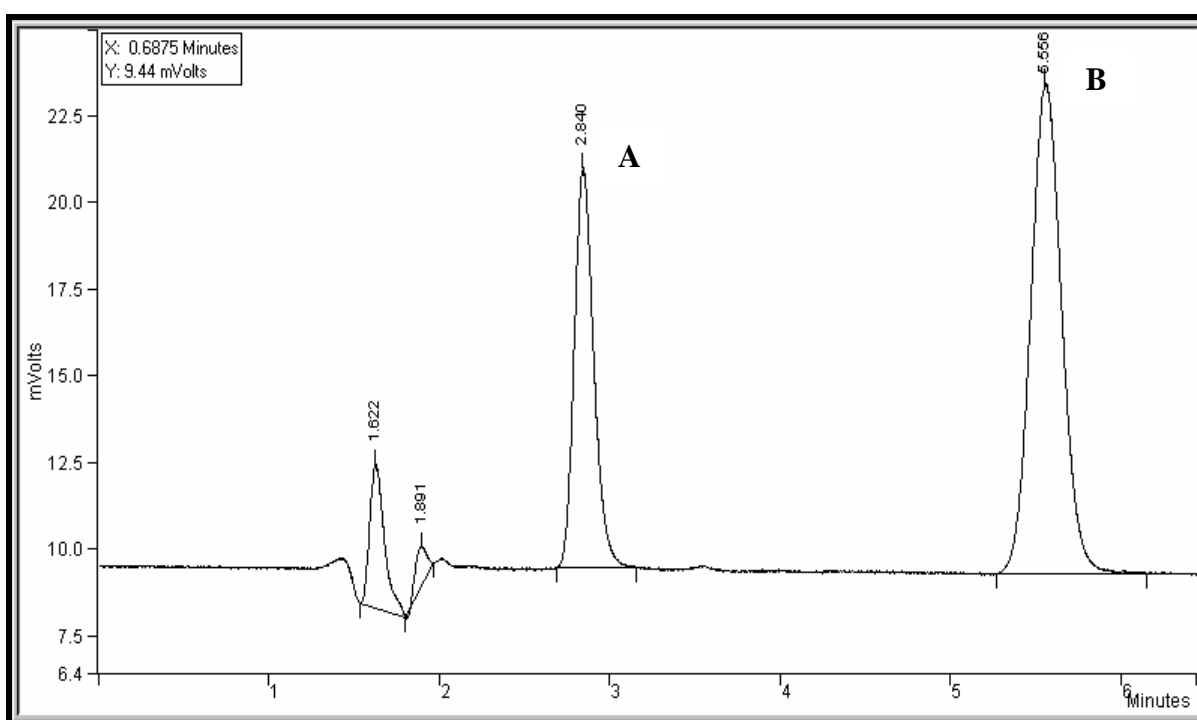
Os pacientes participantes do estudo foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecidos (Anexo 1).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. VALIDAÇÃO

#### 5.1.1. Tempo de retenção

Após avaliação dos diversos parâmetros cromatográficos foi estabelecido como fase móvel ideal acetonitrila a 60% em solução aquosa de trietilamina, pH 3,0, ajustado com ácido fosfórico a 50%. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 258 nm. A Figura 10 fornece o cromatograma resultante da injeção da solução padrão do cetoconazol (100µg/mL) e do itraconazol (1µg/mL) com os seus respectivos tempos de retenção em minutos.



**Figura 10:** Cromatograma do plasma branco adicionado de cetoconazol (A) e itraconazol (B), na concentração de 100µg/mL e 1µg/mL, submetido ao procedimento de preparo da amostra e injeção no cromatógrafo, segundo metodologia validada.



### 5.1.2 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação do método, conforme o item 4.9.1, estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Limites de detecção e de quantificação do Itraconazol

Limite de detecção	27 ng/mL
Limite de quantificação	31.25 ng/mL

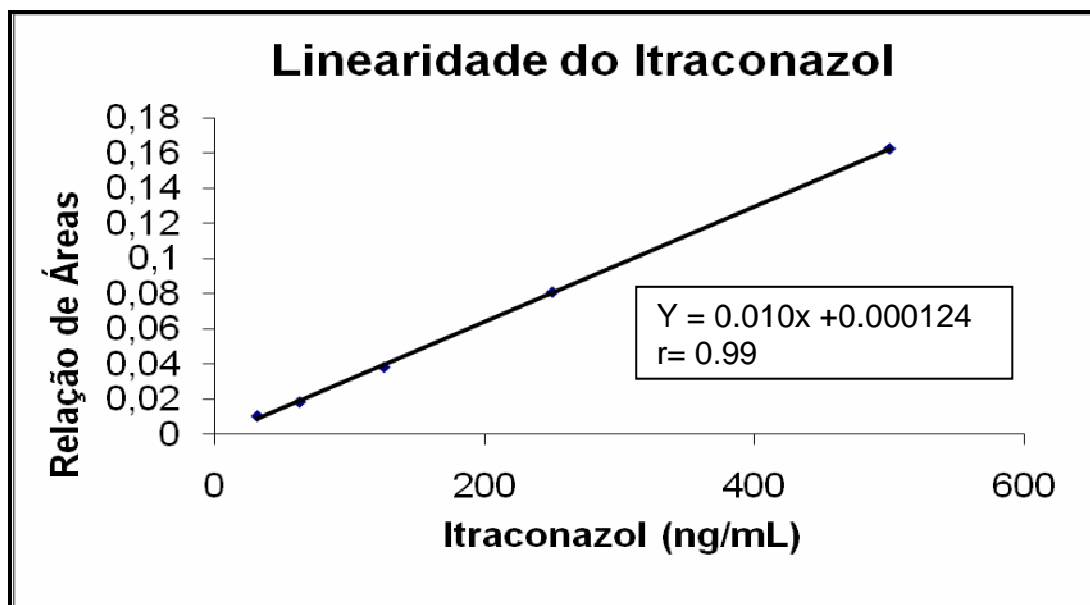
### 5.1.3. Linearidade

A linearidade da resposta do detector frente às diversas concentrações de itraconazol, conforme 4.9.2, está descrita na Tabela 3 e a representação gráfica na Figura 11.

**TABELA 3:** Linearidade do itraconazol

Itraconazol ng/mL	n	Relação de áreas Amostra/Padrão interno
500	5	0.096
250	5	0.048
125	5	0.0207
62.5	5	0.01104
31.25	5	0.00721

n= número de determinações



**Figura 11:** Representação gráfica da linearidade do itraconazol

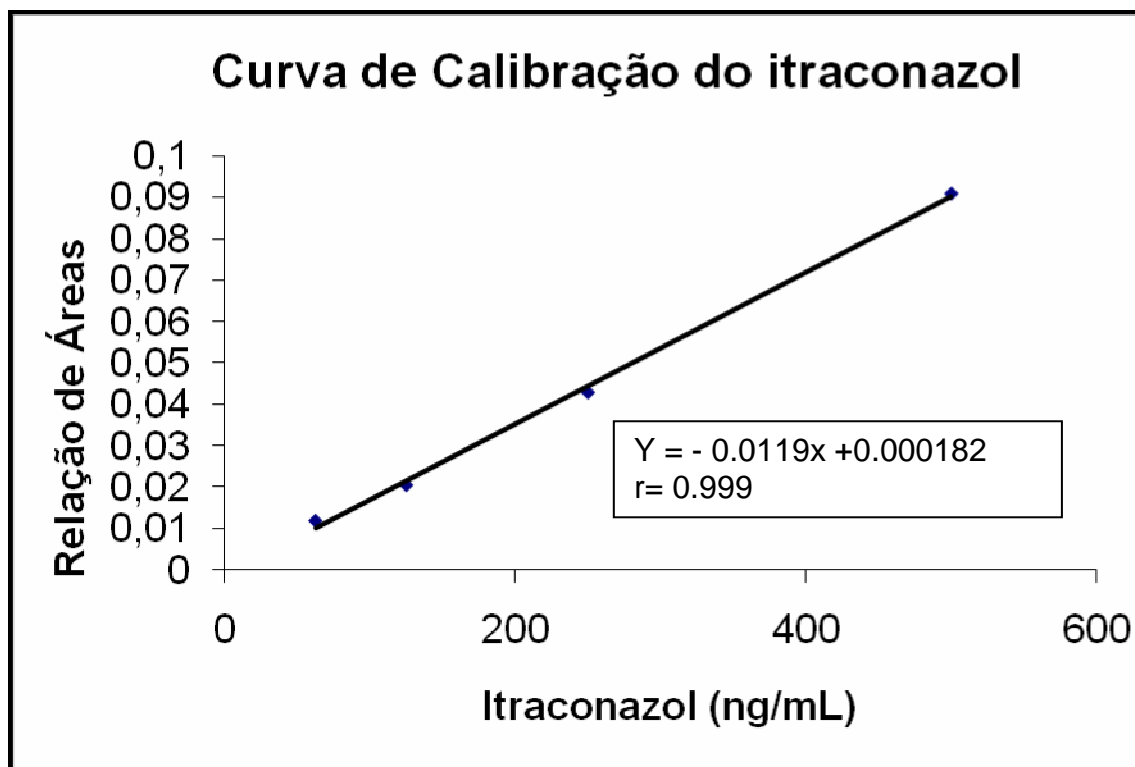
#### 5.1.4. Curva de calibração no plasma

A curva de calibração nas amostras de plasma, conforme 4.9.3, está apresentada na Tabela 4 e representada graficamente na Figura 12.

**TABELA 4:** Curva de calibração do itraconazol no plasma.

Itraconazol ng/mL	n	Relação de áreas Amostra/padrão interno
500	5	0.091
250	5	0.043
125	5	0.0206
62.5	5	0.012

n= número de determinações



**Figura 12:** Curva de calibração do itraconazol no plasma.

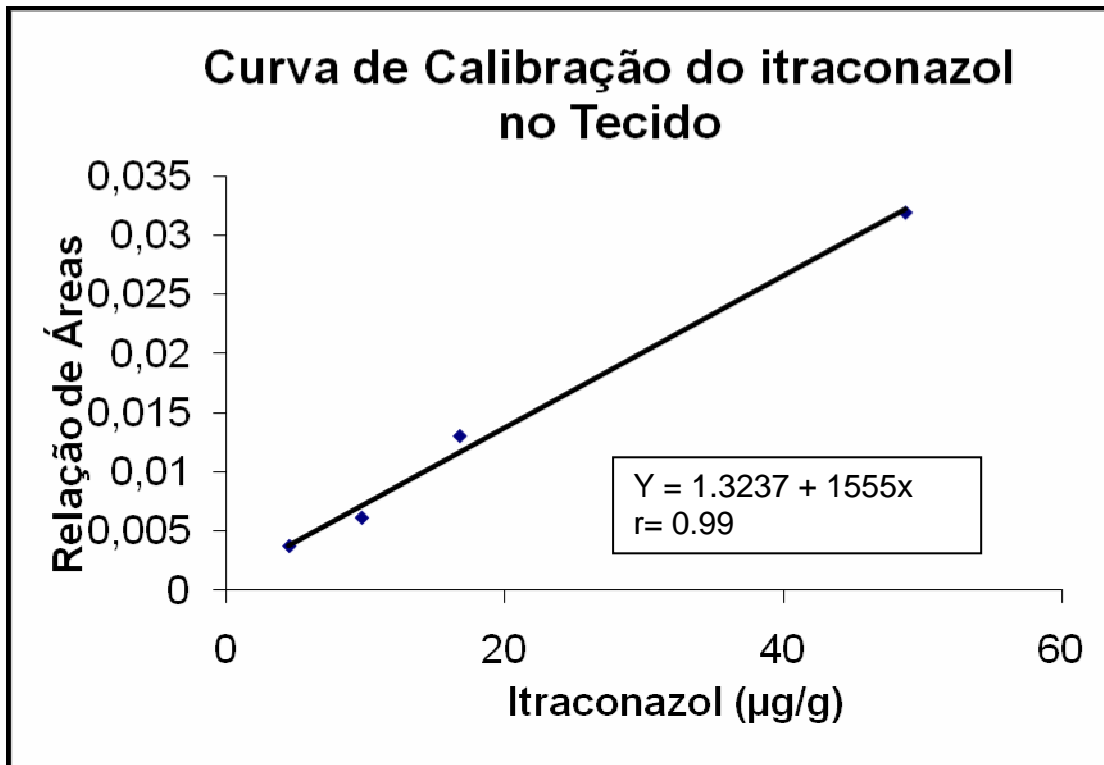
#### 5.1.5. Curva de calibração no tecido

A curva de calibração nas amostras de tecido, conforme 4.9.3 está apresentada na Tabela 5 e representada graficamente na Figura 13.

**TABELA 5:** Curva de Calibração do Itraconazol no tecido.

Itraconazol µg/g	n	Relação de áreas Amostra/padrão interno
48.78	5	0.0319
16.77	5	0.0130
9.72	5	0.0061
4.51	5	0.0037

n= número de determinações



**Figura 13:** Curva de calibração do itraconazol no tecido

#### 5.1.6. Recuperação

A recuperação do itraconazol, em porcentagem, nas diversas concentrações estudadas, conforme 4.9.5, encontra-se descrito na Tabela 6.

**TABELA 6:** Recuperação do itraconazol

Itraconazol ng/mL	n	Recuperação (%)
500	15	90.31
250	15	100.54
125	15	94.38
62.5	15	89.51

n= número de determinações.

### 5.1.6 Precisão intra ensaio e inter ensaio

A precisão intra ensaio e a inter ensaio, expressos como coeficiente de variação, conforme descritos em 4.9.4 está descrita na Tabela 7.

**TABELA 7:** Precisão intra ensaio e inter ensaio do itraconazol, expressa como coeficiente de variação.

Itraconazol ng/mL	n	Coeficiente de Variação INTRA ENSAIO (%)	n	Coeficiente de Variação INTER ENSAIO (%)
500	5	9.42	25	10.30
250	5	10.43	25	12.85
125	5	9.78	25	11.24
62.5	5	10.65	25	16.50

n= número de determinações.

## 5.2. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E TECIDUAIS DE ITRACONAZOL NOS PACIENTES COM CROMOBLASTOMICOSE.

Os resultados da determinação de itraconazol nas 11 amostras de plasma dos pacientes com cromoblastomicose que fizeram uso de 200 mg ao dia, obtido conforme 4.2 e analisados conforme 4.8.3, estão descritos na Tabela 8. As concentrações variaram de 31 a 272 ng/mL, com valor médio de  $121.3 \pm 87.9$  ng/mL e coeficiente de variação de 72.48 %.

**TABELA 8:** Concentrações plasmáticas de itraconazol nos pacientes com cromoblastomicose fazendo uso de 200 mg ao dia.

<b>Pacientes</b>	<b>n</b>	<b><math>\bar{X}</math> ng/mL</b>
Paciente 34420	3	175
Paciente 33345	3	234
Paciente 37966	3	31
Paciente 33932	3	272
Paciente 38823	3	60
Paciente 21507	3	158
Paciente 9975	3	76
Paciente 39034	3	196
Paciente 38616	3	35
Paciente 29349	3	52
Paciente 25985	3	45
$\bar{X}$		121.3 ± 87.9

n = número de determinações realizadas; X=média das determinações.

Os resultados da determinação do itraconazol nas 3 amostras de plasma dos pacientes com cromoblastomicose que fizeram de 400 mg ao dia, obtido conforme 4.2 e analisado conforme 4.8.3, estão descritos na Tabela 9. As concentrações variaram 52 a 524 ng/mL, com valor médio de 293 ± 236 ng/mL e coeficiente de variação de 80.48%

**TABELA 9:** Concentrações plasmáticas de itraconazol nos pacientes com cromoblastomicose fazendo uso de 400 mg ao dia.

<b>Pacientes</b>	<b>n</b>	<b><math>\bar{X}</math> ng/mL</b>
Paciente 17875	3	524
Paciente 22957	3	52.5
Paciente 27515	3	303
$\bar{X}$		290 ± 234

n = número de determinações realizadas; X=média das determinações.

Os resultados da determinação do itraconazol nas 6 amostras de plasma dos pacientes com cromoblastomicose que estavam fazendo de 200 mg ao dia que não apresentaram evolução favorável sendo necessário o aumento da dose para 400 mg ao dia, obtido conforme 4.2 e analisado conforme 4.8.3, estão descritos na Tabela 10. Na dose de 200 mg, as concentrações variaram de 32 a 500 ng/mL, com valor médio de 217 ± 207.1 ng/mL e coeficiente de variação de 95.14% e na dose de 400 mg, variaram de 155 a 558 ng/mL, com valor médio de 304 ± 173 ng/mL e coeficiente de variação de 56.93%.

**TABELA 10:** Concentrações plasmáticas de itraconazol nos pacientes com cromoblastomicose fazendo uso de 200 mg/dia que não apresentaram evolução favorável sendo necessário o aumento da dose para 400 mg/dia.

<b>Pacientes</b>	<b>n</b>	<b>Concentrações dose-200 mg (ng/mL)</b>	<b>Concentrações dose- 400 mg (ng/mL)</b>
Paciente3636	3	500	470
Paciente34470	3	260	558
Paciente8117	3	50	155
Paciente30782	3	419	300
Paciente34122	3	32	165
Paciente32591	3	45	177
$\bar{X}$		217 ± 216	304 ± 173

n = número de determinações realizadas; X=média das determinações

Apesar das concentrações plasmáticas médias dos pacientes que utilizaram itraconazol em doses de 200mg/dia, que não apresentaram evolução clínica favorável ter sido superior aqueles com evolução desejada, utilizando a mesma dose diária, não foi observada diferença estatística significativa entre as concentrações médias dos dois grupos ( $t = -1.362$ ;  $p = 0.1932$ ).

Em relação aos pacientes que fizeram uso apenas da dose de 400mg/dia, ou aqueles que utilizaram tal dose no seguimento da dose de 200mg/dia, foi observado que as concentrações médias de itraconazol foram semelhantes, bem como não foi observada diferença estatística significativa em relação aos teores médios de itraconazol nos dois grupo que utilizaram doses de 400mg. ( $t = -0.0806$ ;  $p = 0.9380$ )

Os resultados da determinação de itraconazol nas 11 amostras de tecido dos pacientes com cromoblastomicose que fizeram uso de 200 mg ao dia, obtido conforme 4.2 e analisado conforme 4.8.4, estão descritos na Tabela 11. As



concentrações teciduais de itraconazol variaram 0.170 a 15.96  $\mu\text{g/g}$ , com valor médio de  $5.36 \pm 5.9 \mu\text{g/g}$  e coeficiente de variação de 110.11%.

**TABELA 11:** Concentrações teciduais de itraconazol nos pacientes com cromoblastomicose fazendo uso de 200 mg/dia.

Pacientes	n	$\bar{X}$ $\mu\text{g/g}$
Paciente34420	3	1.88
Paciente33345	3	1.45
Paciente37966	3	4.6
Paciente33932	3	0.17
Paciente38823	3	5.12
Paciente21507	3	11.95
Paciente9975	3	15.96
Paciente39034	3	14.45
Paciente38616	3	1.55
Paciente29349	3	1.40
Paciente25985	3	0.41
— X		$5.36 \pm 5.9$

n = número de determinações realizadas; X=média das determinações.

Os resultados da determinação do itraconazol nas 6 amostras de tecido de pacientes com cromoblastomicose que estavam fazendo de 200 mg que não apresentaram evolução favorável sendo necessário o aumento das doses para 400 mg ao dia, obtido conforme 4.2 e analisado conforme 4.8.4, estão descritos na Tabela 12. As concentrações teciduais de itraconazol na dose de 200 mg variaram 0.19 a 31.25  $\mu\text{g/g}$ , com valor médio de  $14.87 \pm 12.94 \mu\text{g/g}$  e coeficiente de variação

de 87.03% e na concentração de 400 mg/dia, variaram de 14.2 a 28.70 µg/g, com valor médio de  $21.80 \pm 6.62$  e coeficiente de variação de 30.40%.

**TABELA 12:** Concentrações teciduais de itraconazol nos pacientes com cromoblastomicose fazendo uso de 200 mg/dia que não apresentaram evolução favorável sendo necessário o aumento da dose para 400 mg/dia.

Paciente	n	Concentrações	Concentrações
		teciduais de ITZ na dose de 200 mg/dia. (µg/g)	teciduais de ITZ na dose de 400 mg/dia. (µg/g)
Paciente3636	3	0.44	15
Paciente34470	3	0.19	28.7
Paciente 8117	3	12.6	18.72
Paciente30782	3	18.65	28.2
Paciente34122	3	26.11	25.98
Paciente32591	3	31.25	14.2
$\bar{X}$		$14.87 \pm 12.94$	$21.80 \pm 6.62$

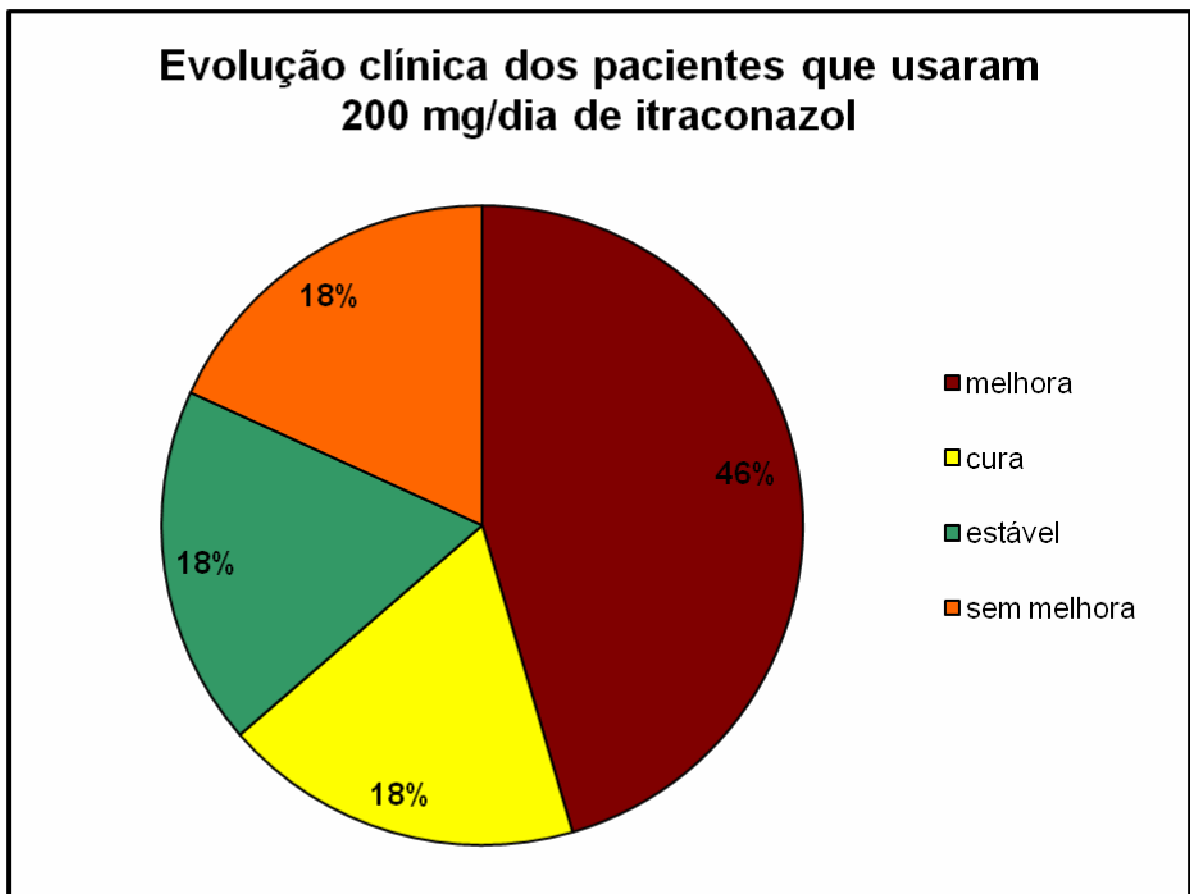
n = número de determinações realizadas; X= média das determinações.

Não houve diferença estatística significativa entre os teores médios de itraconazol nos tecidos entre aqueles pacientes que utilizaram doses de 200mg/dia e que apresentaram evolução favorável e entre aqueles que necessitaram o aumento da dose para 400mg/dia.

### 5.3. EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES

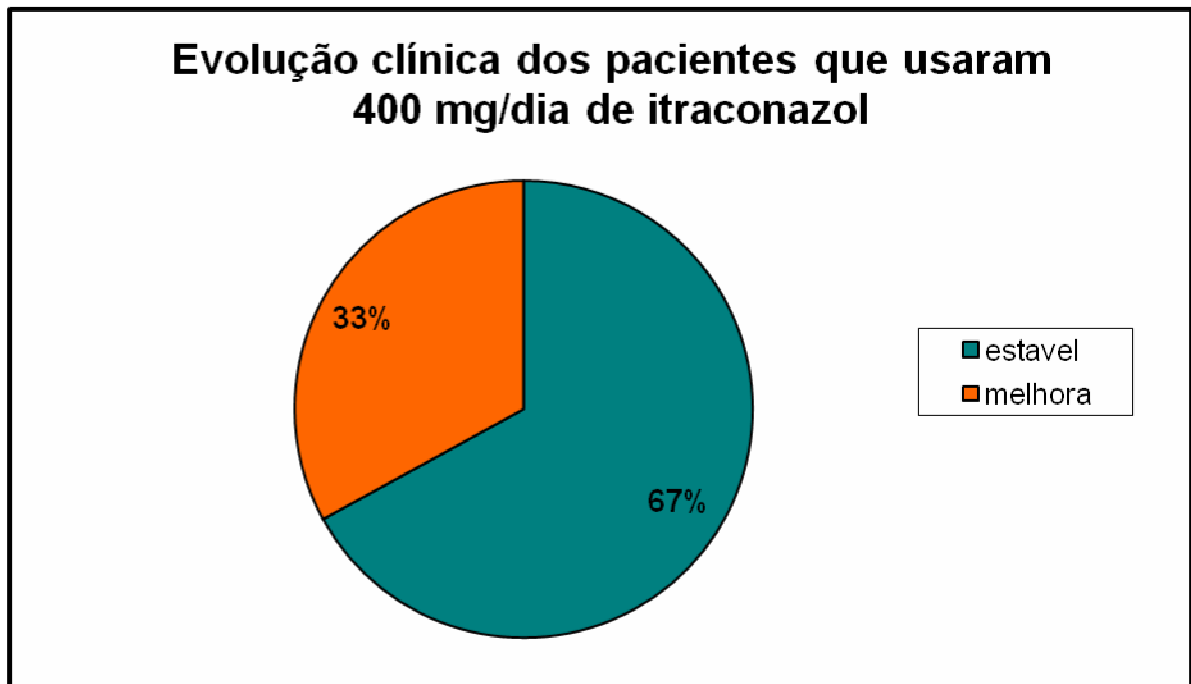
Foi observado que nos pacientes que utilizaram doses de 200 mg/dia, 46% (5) apresentaram evolução favorável, 18% (2) cura, 18% (2) sem melhora e 18% (2) permaneceram estáveis (Figura 14).

O emprego do qui-quadrado não demonstrou diferenças estatísticas significativas entre o número de pacientes, em porcentagem, que tiveram melhora ou cura, em relação aqueles que permaneceram estáveis ou que pioraram. ( $\chi^2=0.36$ ;  $p=0.5485$ ).



**Figura 14:** Evolução clínica dos pacientes que usaram 200 mg/dia de itraconazol.

Dentre os pacientes que utilizaram 400 mg/dia de itraconazol foi observado que 67% (2) de itraconazol permaneceram estáveis e 33% (1), evoluiu de maneira favorável.



**Figura 15:** Evolução clínica dos pacientes que usaram 400 mg/dia de itraconazol

Ao se comparar a evolução clínica dos pacientes, em porcentagem, que fizeram uso de itraconazol nas doses de 200mg/dia e 400 mg/dia, percebe-se que 46% dos pacientes da menor dose apresentaram evolução favorável, ao passo que naqueles com doses de 400mg/dia, se observou melhora em 33%. Não foi observada diferença estatística significativa na melhora clínica entre os dois grupos ( $X^2 = 0.36$ ,  $p = 0.5485$ ).

## 6. Discussão

---

---

A cromoblastomicose é uma importante infecção fúngica no estado do Pará e um dos poucos medicamentos disponíveis para seu tratamento é o itraconazol que apresenta marcada variabilidade farmacocinética inter e intra-individual, refletindo-se nas concentrações plasmáticas e teciduais, o que pode comprometer a eficácia terapêutica, portanto, torna-se relevante a monitorização de suas concentrações em fluídos biológicos a fim de otimizar os esquemas terapêuticos disponíveis.

A cromatografia líquida de alta eficiência é considerada a técnica ideal para determinação do Itraconazol nos fluídos biológico. Neste sentido, para assegurar a confiabilidade do método utilizado neste trabalho, foi realizada sua validação seguindo recomendações da legislação vigente. Conforme descrito no *Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos* (FDA, 2001) para determinação quantitativa de drogas e/ou metabólitos em diferentes matrizes biológicas (por exemplo, sangue total, soro, plasma, urina e tecido), os parâmetros fundamentais para validação incluem: exatidão, precisão, seletividade, sensibilidade e estabilidade.

A fase móvel foi otimizada envolvendo estudos relacionados à alteração da proporção dos solventes utilizados e variação do pH, de forma a proporcionar as condições ideais de separação do analito de interesse, favorecendo análise rápida para ser aplicada na rotina. Foram fixados os seguintes parâmetros: fase móvel constituída de acetonitrila/água v/v (60:40 v/v), pH 3,0 vazão de 1mL/min, tempo de desenvolvimento cromatográfico de 15 minutos e detecção a 258 nm. Nestas condições, o cetoconazol e o itraconazol demonstraram excelente resolução, eluindo em 2.8 e 5.5 minutos respectivamente.

Estudo anterior, relata condições cromatográficas diferentes, com fase constituída de tampão fosfato pH 6.0/acetonitrila/metanol (35:45:20 v/v/v) com fluxo de 1,7 mL/min (KHOSCHSORUR et al.; 2005). Entretanto, outros trabalhos, utilizaram água/acetonitrila/dietilamina (42:58:0.05 v/v/v), fluxo de 1,5 mL/min. e pH de 2.45 ou acetonitrila/tampão fosfato pH 6,7/metanol (47:45:80.05 v/v/v), fluxo de 1,0 mL/min.(COX et al.; 1997; GUBBINS et al.; 1998).

Os valores dos limites de detecção e quantificação obtidos segundo 4.9.1 foram 27 ng/mL e 31.25 ng/mL, respectivamente os quais indicam que a detecção na região do ultravioleta, com comprimento de onda de 258nm é perfeitamente

aplicável na monitorização terapêutica do itraconazol, demonstrando que este trabalho tem uma sensibilidade maior quando comparado com o trabalho KHOSCHSORUR et al. (2005), onde o limite de detecção foi 0.03 µg/mL e o limite de quantificação foi de 0.1 µg/mL.

A linearidade foi avaliada através da adição de concentrações conhecidas do analito em fase móvel, obtida através de concentrações que variaram entre 31.25 a 500 ng/mL, apresentadas na Figura 11 e Tabela 3. A análise da regressão linear foi realizada para obtenção da equação da reta o coeficiente de correlação (r) de 0,9999, indicando excelente correlação entre as concentrações do itraconazol e as respectivas relações de áreas, conforme preconizado por órgãos como a ANVISA e o INMETRO que recomendam coeficiente de correlação linear acima de 0.90.

A equação da reta foi estabelecida ( $y = -0.0119x + 0.000182$ ) para a quantificação do analito de interesse, através da construção da curva de calibração, obtida conforme 4.9.3 e apresentados na Figura 12 e na Tabela 4, na faixa de concentração de 62,5 a 500,0 ng/mL, apresentou coeficiente de correlação  $r=0,99$ .

Os resultados dos estudos de intra ensaio e de inter ensaio, expressos como coeficiente de variação, apresentados na Tabela 7, demonstraram que o método possui boa precisão quando analisado no mesmo dia e em dias diferentes. Uma vez que são considerados aceitáveis os valores do coeficiente variação igual ou abaixo de 15%. Resultados semelhantes foram obtidos na validação de método para determinação de itraconazol e hidroxitraconazol em amostras de tecido e plasma por cromatografia líquida de alta eficiência (COX et al.,1997).

A recuperação do itraconazol, em porcentagem, nas diversas concentrações estudadas apresentada na Tabela 6, variou de 89.55% a 100.54%, demonstrando boa recuperação no intervalo de concentrações avaliadas, de acordo com os limites aceitáveis de recuperação para análise de fármacos em amostras biológicas, que estão situados entre 85% a 115% (ANVISA e INMETRO).

Os resultados da determinação de itraconazol nas 11 amostras de plasma dos pacientes com cromoblastomicose, que fizeram uso de 200 mg/dia, variaram de 31 a 272 ng/mL, com valor médio  $121.3 \pm 87.9$  (Tabela 8).

Foi observada considerável variação inter individual nas concentrações plasmáticas de itraconazol, com coeficiente de variação (CV) em torno de 72.48 %. Dados semelhantes foram descritos BRADFORD et al. (1991), comparando a dose de 200 mg/dia administrada em duas apresentações farmacêuticas diferentes

(cápsula e solução oral), observaram larga variação intra e inter pacientes nas concentrações plasmáticas em ambas as preparações. Tal fato justifica-se tanto pela elevada lipossolubilidade deste fármaco, que favorece sua ampla distribuição tecidual, reduzindo sua permanência no compartimento plasmático, quanto pela variabilidade na biodisponibilidade oral do fármaco, sujeita a interações medicamentosas e com alimentos (BEULE, 1996).

Corroborando tais achados, SEISHIMA et al. (2004), quantificaram o itraconazol em amostras de plasma de pacientes com cromoblastomicose, que iniciaram tratamento com 100 mg/dia, em seguida aumentado para 200 mg/dia, até alcançar o estado de equilíbrio, em torno do 14º dia, nos quais foram encontrados 793.67 ng/ml após 3 horas; 355.6 ng/ml após 12 horas e 43.7 ng/ml após 24 horas respectivamente.

Na evolução clínica dos pacientes que fizeram uso de 200 mg/dia de itraconazol foram observados: melhora clínica em cinco pacientes (46%); cura em dois (18%); dois não apresentaram melhora clínica (18%) e dois permaneceram estáveis (18%).

Os pacientes deste estudo que obtiveram melhora das lesões (46%), assim como, a cura clínica (18%) apresentaram concentrações plasmáticas médias de Itraconazol de  $147.4 \pm 94.5$  ng/mL e  $103 \pm 101.8$  ng/mL, respectivamente (Figura 14). Tais valores foram 89.82% e 85.43% superiores a concentração inibitória mínima (MIC) que é 0.015 µg/mL (JOHNSON et al., 1998), inferindo-se portanto, que o esquema terapêutico adotado originou concentrações plasmáticas efetivas para o tratamento da cromoblastomicose e estão de acordo com dados da literatura (BONIFAZ et al., 2001, QUEIROZ-TELLES et al., 1992; KULLAVANIJAYA & ROJANAVANICH, 1995).

Dois pacientes (18%) não apresentaram melhora clínica aparente, inclusive com o surgimento de novas lesões, assim como, mudança do padrão histológico das lesões verrucosas para nodulares, dois (18%) permaneceram estáveis (Figura 14). Destaca-se que a média da concentração plasmática neste grupo foi  $147 \pm 123$  ng/mL e  $48.5 \pm 4.9$  ng/mL respectivamente, 89.80% e 69.07% acima da concentração inibitória mínima. Ressalte-se que não foi observada diferença estatística significativa entre os teores plasmáticos de itraconazol entre os pacientes que apresentaram resposta clínica adequada e aqueles que não responderam a terapia da maneira esperada, ao ser empregada dose de 200mg/dia.

Neste sentido, sabe-se que a resposta terapêutica é complexa e depende de vários fatores, tais como: perfil imunológico dos pacientes, adesão ao tratamento, condições socioeconômicas, tipo de lesão e aspectos farmacotécnicos do medicamento (CASTRO-CARDONA et al., 1996, MARTÍNEZ et al., 2007, RIBEIRO et al., 2006).

Soma-se a possibilidade do surgimento de cepas do fungo resistentes ao itraconazol, pois seu uso prolongado promove o aparecimento de resistência, e os pacientes deste presente estudo fizeram uso do medicamento por dois ou três anos (LAMB et al., 1999).

Os resultados da determinação de itraconazol nas 3 amostras de plasma, dos pacientes que utilizaram exclusivamente 400 mg/dia, apresentaram média de  $290 \pm 234$  ng/mL, variando de 52 a 520 ng/mL, o coeficiente de variação deste grupo foi de 80.48%. Percebe-se que a média das concentrações plasmáticas deste grupo de pacientes representa, aproximadamente, o dobro daqueles que utilizaram doses de 200mg/dia, confirmando o seguimento do esquema terapêutico proposto.

Estes resultados corroboram BARONE et al., (1993), que quantificaram as concentrações plasmáticas de itraconazol em pacientes utilizando a mesma dose diária do fármaco, obtendo valor médio de 0.239  $\mu$ g/mL.

POIRRIEZ et al. (2000), quantificaram a concentração plasmática (1.70  $\mu$ g/mL) em um paciente com cromoblastomicose fazendo uso de 400 mg/dia, e relataram aumento das lesões e presença de reações inflamatórias, bem como, testes *in vitro* demonstraram o aparecimento de resistência ao fármaco. Entretanto, outros estudos, em pacientes acometidos por doenças fúngicas e tratadas com o mesmo esquema terapêutico (400mg/dia), relataram níveis plasmáticos de 5.9  $\mu$ g/mL (HOSTETLER et al., 1992) e 3.5  $\mu$ g/mL (PATTERSON et al., 1996), demonstrando assim, variabilidade nas concentrações plasmáticas do fármaco.

O amplo intervalo de concentrações plasmáticas de itraconazol, é um fator que dificulta predizer os teores do fármaco no estado de equilíbrio, prejudicando o estabelecimento da correlação entre as concentrações plasmáticas, dose e a resposta terapêutica. Neste sentido, pode-se inferir que a utilização de plasma como amostra biológica para monitorização terapêutica do itraconazol deve ser avaliada com cautela (POIRIER & CHEYMOL, 2000).

Dentre os fatores responsáveis por esta variabilidade se destaca: a cinética não linear do itraconazol, presença de antiácidos ou antagonista dos receptores  $H_2$ ,



ingestão do fármaco sem alimentos, presença de doenças gastrintestinais e medicamentos que possam aumentar o metabolismo hepático (HARDIN et al., 1988).

Na evolução clínica dos pacientes que fizeram uso de 400 mg/dia de itraconazol, foi observado melhora clínica em apenas um (33.33%), confirmando dados da literatura (KULLAVANIJAYA, ROJANAVANICH; 1995), os outros dois, (66.66 %) mantiveram-se estáveis ao tratamento, isto é, não foi observado aumento no número, tamanho e severidade das lesões. Nestes a concentração plasmática média de itraconazol foi 288 ng/mL, o qual é 94.80% superior a concentração inibitória mínima (MIC) (RESTREPO et al., 1988).

Os pacientes que não apresentaram evolução favorável com 200 mg/dia foram submetidos a mudanças no esquema terapêutico, passando a utilizar 400 mg/dia, que elevou as respectivas concentrações plasmáticas do fármaco, em aproximadamente 40%, entretanto não foi proporcional a dose ingerida. Ressalte-se que as concentrações plasmáticas nestes pacientes, quando faziam uso de 200mg/dia, apesar de sem significância estatística, foram superiores aquelas dos pacientes que utilizaram a mesma dose, entretanto apresentaram evolução clínica favorável.

Portanto, este trabalho indica a necessidade de estudos posteriores para a caracterização dos fatores que levaram a presença de concentrações efetivas do fármaco sem resposta clínica adequada, tais como, a presença de cepas de *F.pedrosoi* com menor sensibilidade ao itraconazol, uma vez que a elevação dos níveis plasmáticos promoveu a melhora clínica de todos os pacientes.

Neste sentido, sabe-se que a resistência fúngica pode ocorrer quando as alterações na rota da biossíntese dos esteróis e da expressão do gene ERG 11 envolvidos na síntese da enzima 14 alfa – desmetilase (14 DM) reduzem o acúmulo intracelular do fármaco ou provocam sua inativação (MORSCHHAUSER, 2002).

Descartando-se as questões referentes a absorção do fármaco, uma vez que foram alcançadas níveis plasmáticos efetivos, e a sua distribuição, pela elevada ligação às proteínas plasmáticas, outra possibilidade ia ser considerada seria a importância da ação anti-fúngica do hidróxi-itraconazol, e até que ponto a concentração plasmática aumentada do fármaco original, poderia estar associada a redução de sua biotransformação e conseqüente formação deste metabólito. Entretanto, esta possibilidade parece ser pouco provável, uma vez que a adição de

grupos hidroxila a molécula do fármaco lipossolúvel, limitaria sua distribuição por difusão simples aos tecidos orgânicos.

Tais achados reforçam as flutuações das concentrações plasmáticas de itraconazol e a relevância da monitorização terapêutica deste fármaco. Vale ressaltar, que tal comportamento cinético foi anteriormente descrito (BRADFORD et al., 1991, WILLEMS et al., 2001).

As concentrações teciduais dos 11 pacientes que fizeram uso de 200 mg/dia, variaram de 0.170 a 15.96  $\mu\text{g/g}$  com valor médio de  $5.36 \pm 5.9 \mu\text{g/mL}$ . Por outro lado, os seis pacientes que necessitaram aumento da dose de 200mg/dia para 400mg/dia, por não apresentarem evolução clínica favorável, demonstraram concentrações teciduais médias de  $14.87 \pm 12.94 \mu\text{g/g}$  e  $21.8 \pm 6.62 \mu\text{g/g}$ , respectivamente.

Foi observado nos pacientes que necessitaram aumentar a dose de 200mg/dia para 400mg/dia que, de maneira semelhante às concentrações plasmáticas, os teores teciduais de itraconazol foram superiores quando comparados, embora sem significância estatística, aquele grupo que evoluiu favoravelmente apenas com o uso de doses de 200mg/dia, reforçando a suspeita da diminuição da sensibilidade de *F. pedrosoi* ao fármaco. Ressalte-se que a ausência de significância estatística nestes dois grupos pode ser creditada ao pequeno número de pacientes do segundo grupo, isto é, apenas seis.

A relação entre as concentrações plasmáticas, expressa em volume de plasma em mL e teciduais referentes, expressas em grama de tecido, demonstrou que no grupo com evolução favorável nas doses de 200mg/dia, a relação média foi de 44.29. Por outro lado, aqueles pacientes que necessitaram o aumento das doses de 200mg/dia para 400mg/dia, as relações médias foram 68.52 e 71.71, respectivamente.

Os resultados deste estudo corroboram JR et al., (2004), os quais demonstraram que a alta lipossolubilidade e a afinidade pela queratina favorecem o acúmulo tecidual do fármaco. Bem como por SOBUE et al., 2004 ao quantificarem a distribuição tecidual do itraconazol em ratos, observaram que a relação média entre as concentrações no tecido adiposo e no plasma foi 60.

Neste sentido, estudo *in vitro* realizado por SOBUE et al., (2004) demonstrou que o itraconazol tem uma afinidade de cerca de 97% pela queratina, superior a outros antifúngicos, podendo permanecendo no tecido por mais tempo, quando

comparado ao plasma. Adicionalmente SEISHIMA et al. (2004) demonstraram que nos tecidos com processo inflamatório, como a quantidade de proteínas era maior, o fármaco se acumulava, pela elevada afinidade por estes compostos.

De maneira semelhante as concentrações plasmáticas, foram observados elevados coeficientes de variação nas concentrações teciduais de itraconazol, sugerindo novamente a necessidade da monitorização terapêutica deste medicamento.

## 7. CONCLUSÕES

---

---

- A metodologia analítica validada para determinação das concentrações plasmáticas e teciduais de itraconazol demonstrou resultados adequados de acordo com a legislação vigente.
- A concentração plasmática média de itraconazol nos pacientes usando 200mg/dia, que apresentaram evolução clínica favorável foi  $121.3 \pm 87.9$  ng/mL e de 400mg/dia foi  $290 \pm 234$  ng/mL, respectivamente.
- As concentrações plasmáticas médias de itraconazol nos pacientes que não apresentaram evolução clínica favorável, nas doses de 200mg, tornando-se necessário o aumento para 400mg foram  $217 \pm 216$  ng/mL e  $304 \pm 173$  ng/mL, respectivamente.
- Não foi observada diferença estatística significativa entre os teores médios de itraconazol no plasma quando comparados os grupos que apresentaram evolução favorável nas doses de 200mg/dia e aquele que necessitou o aumento das doses para 400mg/dia.
- A concentração tecidual média de itraconazol nos pacientes usando 200mg/dia é que apresentaram evolução clínica favorável foi  $5.36 \pm 5.9$  µg/g.
- As concentrações teciduais médias de itraconazol nos pacientes que não apresentaram evolução clínica favorável, nas doses de 200mg/dia, sendo necessário o aumento para 400mg/dia foram  $14.87 \pm 12.94$  µg/g e  $21.80 \pm 6.62$  µg/g.
- Não foi observada diferença estatística significativa entre os teores médios de itraconazol nos tecidos, quando comparados o grupo que apresentou evolução favorável nas doses de 200mg/dia e naquele que necessitou o aumento da dose para 400mg/dia.

- A média das relações entre as concentrações teciduais e plasmáticas nos pacientes que apresentaram evolução clínica favorável nas doses de 200mg/dia foi  $44.29 \pm 67.12$ .
- A média das relações entre as concentrações teciduais e plasmáticas nos pacientes que não apresentaram evolução clínica favorável nas doses de 200mg/dia, sendo necessário o aumento para 400mg/dia foram  $68.52 \pm 59.90$  e  $71.71 \pm 38.26$  respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ATTAPATU, M.C. Chromoblastomycosis-A clinical and Mycological study of 71 cases from Sri Lanka. **Mycopathologia**, v.137, p.145-151,1997.

AZULAY, R. D; AZULAY, D. R. **Dermatologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

AL DOORY, Chromomycosis. **Mountain Press Publishing Company**, Misoula, Mout, 1972.

BANKS, I.S. Chromoblastomycosis in Zaire. **Int. J. Dermatol.** v.24, 302-307,1985.

BHAKTAVIZIAM, C; SHAFI, M; MEHTA, M.C & BHAKTAVIZIAM, C.A. Chromoblastomycosis: Report of a case from Trípoli, Libya. **Mycopathologia**, v. 82, p. 111-113, 1983.

BEDOUT, C; GOMEZ, B. L; RESTREPO, A. *In vitro* susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. **Rev. Inst. Med. Trop**, v. 39, n. 3, p. 145 -148, 1997.

BARONE, A. J; BIERMAN, R. H; COLAIZZI, J. L; SWANSON, K. A; GAFFAR, M. C; MOSKOVITZ, B. L; MECHILINSKI, W; LELDE, V. V. Food Interaction and Steady-state pharmacokinetics of Itraconazole Capsules in Healthy Male volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, n.4, p. 778-784, 1993.

BEULE, D. K. Itraconazole: pharmacology , clinical experience and future development. **International journal of Antimicrobial Agents**, v.6, p. 175-178,1996.

BILLAUD, E. M. Interactions metaboliques des antifongiques azoles Metabolic drug-drug interactions of the azole antifungal drugs. **Journal de Mycologie Medicne**, v. 17, p.168-176, 2007.

BURSTEIN, Z. Cromomicosis: clinica y tratamiento; situación epidemiológica en latinoamérica, v. 21, n.3, p. 167-175, 2004.

BONIFAZ , A; CARRASCO-GERARD, E; SAUL, A. Chromoblastomycosis : clinical and mycologic experience of 51 cases. **Mycoses**, v.44, p.1-7, 2001.

BONIFAZ, A; PAREDES-SOLIS V; SAUL A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. **Expert Opin Pharmacother**, v. 5, n. 2, p. 247-254, 2004.

BRADBURY, B. D; JICK, S. S. Itraconazole and Fluconazole and certain rare, serious adverse events. **Pharmacotherapy**, v. 22, n. 6, p. 697-700, 2002.

BRADFORD, C. R; PRENTICE, A. G; WARMOCK, D.W. Comparison of the multiple dose pharmacokinetics of two formulations of itraconazole during remission induction for acute myeloblastic leukaemia. **J. Antimicrob Chemother**, v.28, p. 555-560, 1991.

CARDONA-CASTRO, AGUDELO-FLOREZ, MOLINA-RESTREPO.  
Chromoblastomycosis Murine Model and *In vitro* Test to Evaluate the Sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to Ketoconazole, Itraconazole and Saperconazole. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.91, n.6, p.779-7847.1996.

CAVAZOS-ROCHA, N; VERA-CABRERA; WELSH-LOZANO, O; WAKSMAN-DE-TORRES, N; SALAZAR-CAVAZOS, M.D.L.L. Simultaneous determination and validation of antimicrobials in plasma and tissue of actinomycetoma by high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, p. 1775-1781, 2007.

CASTRO, L. G. M. Chromomycosis: a therapeutic challenge. **Clin Infect Dis**, v.15, n. 3, p. 553-554, 1992.

CASTRO, L. G. M; SCHWARTZ, R. Chormoblastomycosis. **Emedicine**, 2003.



CAZEDEY, E. C. L; AZEVEDO , R. C. P; SILVA, E; ARAUJO, M. B; Desenvolvimento e validação de Metodologia Analítica para determinação de Itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. **Química nova**, v. 30 , n. 4 , p. 774 – 776, 2007.

COX, S. K; OROSK, S; BURNETTE, J; FRAZIER, D. Microassay for determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in plasma and tissue biopsies. **Journal of Chromotography B**, v.702, p.175-180, 1997.

ESTERRE, P; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A; RAMARCEL, E. R; PECARRERE, J, L. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. **Rev. Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n. 1, p. 45-47, 1996.

DAROUICHE, R. O; SETOODEH, A; ANAISSIE, E. J. Potential Use of a Simplified Method for Determination of Itraconazole Levels in Plasma and Esophageal Tissue by Using High-Performance Liquid Chromotography. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.39, n.3, p.757-759,1995.

DUCHARME, M. P; SLAUGHTER,R. L; WARBASSE,L. H; CHANDRASEKAR, P. H; VELDE,V. V; MANNENS,G.; EDWARDS, D. J. Itraconazole and hydroxyitraconazole serum concentration are reduced more than tenfold by phenytoin. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.58, n.6, p.617-624,1995.

ESTERRE, P; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A, RAHARISOLO, C. Natural history of chromoblastomycoses in Madagascar and the Indian Ocean. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 90, n. 5, p. 312 – 319, 1997.

ESTERRE, P; PEYROL, S; GUERRET, S; SAINTE-MARIE, D; PRADINAUD,R; GRIMAUD, J, A; Cell-matrix patterns in the cutaneous lesion of chromomycosis. **Pathol Res Pract**, v.900, p.188-894, 1992.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION- **Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation**, 2001.

FUKUSHIRO, R. Chromomycosis in japan. **Int.J.Dermatol.** v.22, p. 221-229, 1983.

GUBBINS, P. O; GURLEY, B. J; BOWMAN, J. Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of itraconazole and its hydroxy-metabolite in human serum. **J Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16. p. 1005 -1012, 1998.

GUPTA, A. K; TABORDA, P. R & SANZOVO, A. D. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brasil, **Med Mycol.** v. 40, p. 529-534, 2002.

GUINEA, J; SANCHEZ-SOMOLINOS, M; CUEVAS, O; PELÁEZ, T; BOUZA, E. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida Krusei* : the contribution of efflux-pumps. **Med. Mycol.**, v. 44, p. 575 - 578, 2006.

HARDIN, C, T; GRAYBILL, J, R; FETCHICK, R; WOESTENBORGHS, R; RINALDI; M.G. KUHN, J.G. Pharmacokinetics of itraconazole following oral administration to normal volunteers, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.32, n.9, p.1310 - 1313, 1988.

HIRUMA, M; OHNISHI, Y; OHATA, H; CHIKAKANE, K; TAKAHASHI, H; KAWADA, A; ISHIBASHI, A. Chromomycosis of the breast. **Int J Dermatol**. v.31, p. 184 – 185, 1992.

HEYKAN,J;A.V.PEER.;V.V.VAN.;PV.ROOY.;W.MEULDERMANS.;K.LAVRIJSEN.;R. WOESTENBORGHS.;J.V.CUSTEN.;G.CAUWENGERGH. The clinical pharmacokinetics of itraconazole: an overview. **Mycoses**.v.32, p.67-87,1989.

HOSTETLER, J.S; HEYKANTS, K. V., CLEMONS, R., WOESTENBORGHS, L. H., Discrepancies in bioassay and chromatography determinations explained by metabolismo f itraconazole to hydroxyitraconazole: studies of interpatient variations in concentrations. **Antimicrob Agents Chemother**.v.37, p.2224 - 2227, 1993.

HOF, H., Is there a sérios risk of resistance development to azoles among fungi due to the widespread use and long-term application of azole antifugals in medicine ? **Drug Resistance Updates**, 2008.

Instituto Nacional de Meterologia , Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO): **Orientações sobre validação de Métodos de Ensaio Químicos**, 2003.

JAYALAKSHMI, P ; LOOI, L. M. & SOO-HOO, TS. Chromoblastomycosis in Malaysia. **mycophatologia**, 109, p. 27- 31, 1990.

JR, J.E.C.; GOLDEN, J.A.; KIPPS, J.; McIVER, M.; ZURLINDEN, E., Intrapulmonary Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Itraconazole and 14-Hydroxyitraconazole at Steady State. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n. 10, p.3823 - 3827, 2004.

JOHNSON, E. M; SZEKELY, A; WARNOCGINST, K, D. W. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and anphotericin B against filamentous fungi. **J.Antimicrob Chemother**, v.11, p.135-149,1998.

KOKS, C.H.W; MEENHORST, P.L; BULT, A; BEIJNEN, J.H. Itraconazole solution: of pharmacokinetic features and review of activity in the treatment of fluconazole-resistant oral candidosis in HIV- infected persons. **Pharmacological Research**, v. 46, n.2, p.195 - 2000, 2002.

KONDO, M; HIRUMA, M; NISHIOKA, Y; MAYUZUMI, N; IKEDA, S; OGAWA, H. A. case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. **Mycoses**, v. 48, n. 3, p. 221 - 226, 2005.

KHOSCHSORUR, G. A; FRUEHWIRTH, F; ZELZER, S. Isocratic High-Performance Liquid Chromatographic Method with Ultraviolet Detection for Simultaneous

Determination of Levels of Voriconazole and Itraconazole and Its Hydroxy Metabolite in Human Serum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n. 8, p. 3569-3571, 2005.

KULLAVANIJAYA, P; ROJANAVANICH, V. Successful treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* by the combination of itraconazole and cryotherapy. **Int J Dermatol**, v.34, n. 11, p.804 - 807,1995.

LAMB, D; KELLY, D; KELLY, S. Molecular aspects of azole antifungal action and resistance. **Drug Resistance Updates**, v.2, p.390 - 402, 1999.

LE GALL , F ; LULIN, COUTATARMANACH, A; COTTON,F.; CHEVRANTBRETON, J. & RAMME ,M.P. Une parasitose cutanée rarement observée en France:la chromomycose.**Ann.Pathol**.v.13 p. 123 -127,1993.

LESLIE, D. F. & BEARDMORE, G. L. Chromoblastomycosis in Queensland:a retrospective study of 13 cases at the royal brisbane hospital. **Aust.j.Dermatol**, v.20, p.23 - 30, 1979.

LEVITZ, S.M. Interactions of Toll-like receptors with fungi. **Microbes and Infection** v.6, p. 1351-1355, 2004.

LEYDEN, J. Pharmacokinect and pharmacology of terbinafine and itraconazole. **J Amer. Acade Dermat**, v. 38, n. 5, p. 542 - 547,1998.

MACOLA, S; RODRIGUEZ, D.P; FONT, E; VALENCIA, G. BARRIOS, A. Cromomicosis: hongos dematiaceos que intervienen en su etiologia. **Rev Cubana Med**, v.36, n.3, p.136-14,1984.

MADHANI, D.H. & Fink, G. R .The control of filamentous of differentiation and virulence in fungi.**Trends in cell biology**, v. 8 ,p. 348 – 353, 1998 .

MAGALHAES, M.J.C ; MEYER, H.A. The cases of chromoblastomycosis in Mozambique . **First South African International Congress of Dermatology, Johannesburg**. 1970.

MALKINA, A. Y; DARCHENKOVA, N. N. Distribution of chromoblastomycosis in the world.**Vestn.Dermatol.venerol**,v.1 ,p. 41 - 45,1977.

MATTE, S . M, W; LOPES, J, O; MELO, I, S; ESPADIM, L. E, R; PINTO, M, S. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul : Relato de 12 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 30, n. 4, p. 309 - 311,1997.

MASLIN, j; MORAND, J. J. & CIVATTE, M. Chromomycosis (Chromoblastomycosis). **Med. Trop**, v. 61, p 459-461, 2001.

MARQUES, S. G; SILVA, C. M. P; SALDANHA, P. C; REZENDE, M. A; VICENTE, V. A; QUEIROZ- TELLES, F; COSTA, J, M, L. Isolation of *Fonseceae pedrosoi* from the Shell of the babassu Coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brasil. **J. Med. Mycol**, v. 47, p. 305 - 311, 2006.

MARTINEZ, R. L; TOVAR, L. J. M. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v.25, p.188 -194, 2007.

MENON, T. Efficacy of fluconazole and itraconazole in the treatment of oral candidiasis in HIV patients. **Acta Tropica**, v.80, p.151-154, 2001.

MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: New concepts diagnosis and mycology. **J . Am. Acad. Dermatol** , v. 8 , p. 1 – 16 . 1983 .

MCGINNIS, M. R. & HILGER, E. A. Infections caused by black fungi. **Arch.Dermatol.** v. 123, p.1300-1302,1987.

MINOTTO, R; BERNARDI, C. D. V; MALLMANN, L. P; EDELWEISS, M. I. A; SCROFERNEKER, M. L. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **J Am. Acad Dermatol**, v. 44, n. 4, p. 585 - 592, 2001.

MORSCHHAUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochem Biophys Acta**, p .240 - 248, 2002.

NEIVA, C. L. S; SOUZA, V. A ; FREITAS, C. M. R.; SANTIAGO, T.S.A.M.; RESENDE, A. M.; PADUA, M. P. Chromomycosis caused by *Fonseceae pedrosoi* in a patient with systemic lupus erythematosus. **Rev. Bras. Reumatol**, v.42, n.5, 2002.

NEGRONI, R; ARECHAVALA, A. I; itraconazole: pharmacokinetics and indications.

**Arch med Res.** v. 24 , n. 4, p.387 – 393. 1993.

PATTERSON, T. F; PETERS, J; LEVINE, S. M; ANZUETO A; BRYAN, C; SAKO,

E,Y; MILLER, L; CALHOON, J, H; RINALDI, M. G. Systemic Availability of

Itraconazole in Lung Transplantation, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.

40, n.9, p.2217-2220, 1996.

POIRIER, J. M; CHEYMOL, G. Optimisation of itraconazole therapy using target

drug concentrations.**Clin Pharmacokinet.** v.35, n.6, p. 461 – 473, 1998.

POIRREZ, J; BREULLIARD, F; FRANCOIS, N; FRUIT, .; SENDID, B; CROSS, S &

DEI-CAS, E. A Case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy,

shaving, oral 5- fluorocytosine, and oral amphotericin B. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**

v.63, p.61-63,2000.

PRENTICE, G. A; GLASMACHER, A. Making sense of itraconazole

pharmacokinetics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v.56, p.i17-i22, 2005.

QUEIROZ-TELLES, F; PURIM, K. S; FILLUS, J. N ; BORDIGNON, G. F ; LAMEIRA,

R. P; VAN CUTSEM J ; CAUWENBERGH, G. Itraconazole in the Treatment of

Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. **Int J Dermatol.**, v. 31, n. 11, p.

805-812,1992.



QUEIROZ-TELLES, F; MCGINNIS, M. R; SALKIN, I; GRAYBILL, J, R. Subcutaneous mycoses., **Infect Dis Clin North Am.**, v. 17, n. 1, p. 59-85, 2003.

RAJENDRAN, C; RAMESH; MISRA, R. S; KANDHARI, S; UPRETI, H. B. DATTA, K. K. DATTA. Chromoblastomycosis in **India.Int.J.Dermatol.**v.36,p. 29 – 33,1997.

RIBEIRO, E. L; SOARES, A. J, FERREIRA, W. M; CARDOSO, C. G; NAVES, P. L. F; DIAS, S. M. S. Cromoblastomicose: Doença presente na realidade populacional brasileira , **RBAC**, v. 38, p. 189 -192, 2006.

RIVITTI, E. A; AOKI, V ; Deep fungal infections in tropical countries. **Clinics in Dermatol.** , v. 17, p. 171-190, 1999.

RESTREPO, A; GONZALEZ, A, GOMEZ, I., ARANGO, M., BEDOUT, C. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 544, p. 504 - 516, 1988.

RUBIN, H. A; BRUCE, S; ROSEN, T. & MC BRIGE,M. Evidence for 'percutaneous inoculation as the mode of transmission for chromoblastomycosis. **J. Am Acad Dermatol.**, v.25, p.951 - 954, 1991.

SAAG, M.S; DISMUKES, W. E; Azoles Antifungal Agents: Emphasis on New Triazoles. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.32, n. 1, p.1 - 8, 1988.

SILVA, J. P; SILVA, B. M; SALGADO, I. U; DINIZ, P. A. J; ROSENTAL, S; SALGADO, G. C. Phagocytosis of *Fonseceaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression, **Immunol Med Microbiol.**; v.50, p. 104 - 111, 2007.

SAAG, M. S; DISMUKES, W. E. Azole Antifungal Agents: Emphasis on New Triazoles. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.** v.32, n.1, p.1-8, 1988.

SALGADO C. G; SILVA, J. P; DINIZ, J. A. P; SILVA, M. B; COSTA, P. F; TEIXEIRA, C; SALGADO, U. I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. **Rev Inst Med Trop, Sao Paulo**, v. 46, n. 1, p. 33-36,2004.

SALGADO, C. G; SILVA, J. P; SILVA, M. B; FAGUNDES, P. C. & SALGADO, U. I. **L Lancet Infect.Dis.** v.8, 528, 2005.

SAMPAIO, S. A. P; RIVITTI, E. A. **Dermatologia.** 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000.

SOUBE, S; SEKIGUCHI, ; NABESHIMA, T. Intracutaneous Distributions of Fluconazole, Itraconazole, and Griseofulvin in Guinea Pigs and Binding to Human Stratum Corneum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.216 - 223, 2004.

SEVERO, L. C. Micoses. In: Veronesi. **Tratado de infectologia.** 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 79, p. 1305- 1306.

SEISHIMA, M; OYAMA. Z; ODA.M; ISHIGO,S. Distribution of na antifungal drug, itraconazole, in pathological and non-pathological tissues.**Eur. j. Dermatol** , v.14, p. 24-27, 2004.

SILVA, C. M; ROCHA, R. M; MORENO, J. S; BRANCO, M. R; SILVA, R. R; MARQUES, S. G; COSTA, J. M The coconut babaçu (*Orbignya phalerata martins*) as a probable risk of human infection by the agent of chromoblastomycosis in the State of Maranhão, Brazil. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, v. 28, n. 1, p. 49-52, 1995.

SILVA J. P; DE SOUZA, W; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). **Mycopathologia**, v. 143, n. 3, p. 171-176. 1998-99.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SOMCHIT, N ; NORSHAHIDA, A. R; HASIAH, A. H; ZURAINI, A; SULAIMAN, M. R; NOORDIN, M. M. Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats: a comparative in vivo study. **Hum Exp Toxicol**, v. 23, n. 11, p. 519 - 525, 2004.

SRIVATSAN, V; DASGUPTA, A. K; PRASHANT, K; DATLA, R. R; SONI, D; PATEL, M; PATEL, R; MAVADHIYA, C. Simultaneous determination of itraconazol and hydroxyitraconazol in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1031, p. 307- 313, 2004.

UNGPAKORN R, REANGCHAINAM S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. **Clin Exp Dermatol.**, v. 31, n. 2, p. 245 - 247,2006.

VELASQUEZ, L. F; RESTREPO, A & CALLE, G. Chromomycosis: experiencia de doce anos. **Acta Medica Colombiana.**v.1, p.165-171, 1976.

WALTER, P; GARIN, Y; RICHARD-LENOBLE, D. Chromoblastomycosis, a morphological of the host- parasite interaction. **Virchows Archives**, v. 397, p. 203-214,1982.

WILLEMS, L; GEEST, R; BEULE, K. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics** , v.26, p.159 -169, 2001.

YEGRES, F. Cromomycosis por *Cladosporium carrionii* em criadores de caprinos Del Estado Falcon. **Investigacion Clinica**,v.26, p.235-246,1985.

ZEPPENFELDT, G; RICHARD-YEGRES, N; YEGRES, F. *Cladosporium carrionii*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomycosis en Venezuela. **Rev. iberoamer. Micol.**, n. 11, p. 61 - 63, 1994.

# ANEXOS

## ANEXO 1



Universidade Federal do Pará



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

Carta: 096/07 CEP-ICS/UFPa

Belém, 03 de outubro de 2007

À: Prof. Dr. José Luis Fernandes Vieira,

Senhor Pesquisador,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa intitulado: "Correlação entre as concentrações plasmáticas e frequência de litocessal em parturientes com cranioblastomiose" sob o protocolo nº 081/07 CEP-ICS/UFPa, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará no reunião do dia 22 de agosto de 2007.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar o relatório do mesmo até o dia 30 de dezembro de 2007, no CEP-ICS/UFPa, situado no Campus Universitário de Guamá, Campus profissional, no Complexo de sala de aula do ICS - sala 13 (Altos).

Atenciosamente,

*Prof. M. Sc. Maria da Conceição S. Fernandes*  
Coordenadora do CEP-ICS/UFPa

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará  
(CEP-ICS/UFPa) - Complexo de Sala de Aula ICS - Sala 13 - Campus Universitário de Guamá, nº 111, Guamá -  
CEP: 66075-110 - Belém-Pará; Tel./Fax: (51) 4008/3301-7355 E-mail: coge@ufpa.br

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Determinação das concentrações plasmáticas e teciduais de Itraconazol em pacientes com cromoblastomicose.

#### Esclarecimento da Pesquisa

A proposta consiste na medição da quantidade de itraconazol através da quantidade deste medicamento no sangue de pacientes com cromoblastomicose causado pelo fungo *Fonsecaea pedrosoi*. Para isto é necessário a sua autorização para coletarmos amostra de sangue e tecido do local afetado pela doença no Centro de Dermato-Imunologia UEPA/UFPA/MC, Universidade do Estado do Pará (UEPA), Universidade Federal do Pará (UFPA) e Centro de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará Dr. Marcello Candia (MC), sediado no município de Marituba, Pará, com a finalidade de se verificar se existe associação entre a quantidade do medicamento no sangue e a quantidade presente no local da lesão. Para isto, utilizaremos também alguns dados contidos no seu prontuário.

Destaca-se que a realização deste estudo não incorrerá em riscos ou prejuízos físicos e morais para os pacientes, já que as informações relatadas serão de uso exclusivamente científico, e as identificações pessoais serão mantidas em segredo.

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

O conhecimento da quantidade de itraconazol no sangue e tecido durante o tratamento da cromoblastomicose constituirá um benefício à população, na medida que tais informações forem usadas com o intuito de aperfeiçoar o tratamento, no controle médico e criação de medidas terapêuticas que procurem melhorar a recuperação do portador desta doença.

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

Projeto: Determinação das concentrações plasmáticas e teciduais de Itraconazol em pacientes com cromoblastomicose causado por *Fonsecaea pedrosoi*.

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

Os principais pesquisadores são a farmacêutica Daniella Paternostro de Araújo e o professor Dr. José Luiz Fernandes Vieira, orientador desta pesquisa.

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

Nome: Daniella Partenostro da Araújo

End: Av. Serzedelo Corrêa nº 999 apt 702

Fone: 88813815

#### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Belém, \_\_/\_\_/2007

---

Assinatura do sujeito da pesquisa ou do responsável



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)