

5

Materiais e Métodos

5.1.

Instrumentação principal utilizada neste trabalho

5.1.1.

Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

Os equipamentos utilizados no presente trabalho foram o modelos ELAN 5000 e ELAN 6000, ambos da firma PerkinElmer-Sciex (EUA). Os dois aparelhos estavam equipados com uma câmara de nebulização ciclônica, mod. Tracey (Glass Expansion, Austrália) e um nebulizador concêntrico, mod. “conikal” (Glass Expansion, Austrália), operado com uma bomba peristáltica (modelo Minipulse, Gilson, França). As condições operacionais relevantes do ICPMS, utilizadas em todos os ensaios realizados, encontram-se resumidas na Tabela 15. As condições especiais de cada ensaio serão mencionadas posteriormente, no capítulo 6. Interferências espectrais (simples ou poliatômicas) nas massas dos isótopos medidos (^{121}Sb , ^{123}Sb e ^{133}Cs), causadas pelas matrizes das amostras utilizadas neste estudo, não foram significativas nesta região de massas e, conseqüentemente, não foram necessárias correções matemáticas.

Diariamente, o desempenho do ICPMS foi otimizado pela aspiração de uma solução analítica contendo antimônio na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Os parâmetros ajustados durante o processo de otimização diária (*daily set up*) foram o alinhamento e distância tocha-amostrador, assim como, a vazão do gás nebulizador. A otimização tinha a finalidade de se obter sinais analíticos altos e estáveis para os isótopos ^{121}Sb e ^{123}Sb , associados à baixa formação de óxidos de antimônio ($^{121}\text{Sb}^{16}\text{O}$ e $^{123}\text{Sb}^{16}\text{O}$) e reduzida emissão de fundo ($m/z=220$).

Na geração de hidreto foi empregado um sistema de injeção em fluxo, mod. FIAS-200, acoplado a um amostrador automático AS-90, ambos da PerkinElmer (EUA) e conectado ao espectrômetro Elan 5000.

Tabela 15: Equipamentos e parâmetros operacionais utilizados em ICPMS.

Espectrômetro de massa	tipo quadrupolar	
Isótopos medidos	^{121}Sb , ^{123}Sb , ^{133}Cs , ^{103}Rh , ^{115}In	
Amostrador/ <i>skimmer</i>	Platina	
Vazão de argônio do plasma	15,0 L min ⁻¹	
Vazão de argônio auxiliar	1,00 L min ⁻¹	
Vazão de argônio do nebulizador	otimizado diariamente (0,800 - 0,950 L min ⁻¹)	
	<i>ELAN 5000</i>	<i>ELAN 6000</i>
Potência (W)	1400	1300
% de Óxidos (CeO/Ce ⁺)	< 3,0 %	< 2,5 %
% de Íons bivalentes (Ba ²⁺ /Ba ⁺)	< 1,5 %	< 1,2 %
Sensibilidade típica para ^{103}Rh	70.000 cps /10 µg L ⁻¹	160.000 cps /10 µg L ⁻¹
Sensibilidade típica para ^{121}Sb	25.000 cps /10 µg L ⁻¹	60.000 cps /10 µg L ⁻¹
Fundo (<i>background</i>) em m/z =220	250 cps*	20 cps

* com detector já muito antigo (1993)

5.1.2.

Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

A grande maioria das determinações de antimônio foi realizada por ICPMS, entretanto, algumas amostras com concentração mais elevada do elemento foram analisadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). O equipamento utilizado foi o modelo Optima 4300 DV (PerkinElmer, EUA), equipado com uma câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Austrália) e um nebulizador concêntrico tipo Meinhard, operando com uma bomba peristáltica (modulo Minipulse, Gilson, França). As condições operacionais relevantes do ICP OES, utilizadas em todos os ensaios, encontram-se resumidas na Tabela 16.

Tabela 16: Parâmetros operacionais utilizados em ICP-OES.

Potência	1500 W	
Vazão de argônio do plasma	15,0 L min ⁻¹	
Vazão de argônio auxiliar	0,20 L min ⁻¹	
Vazão de argônio do nebulizador	0,800 L min ⁻¹	
Shear gas	Ar comprimido	
Taxa de aspiração	1,50 mL min ⁻¹	
Replicatas	3	
	antimônio (Sb)	enxofre (S)
Linhas analíticas (nm)	206,836; 217,582; 231,146	181,975

**5.1.3.
Cromatografia iônica**

As experiências de cromatografia iônica foram realizadas empregando-se, inicialmente, uma coluna de troca aniônica PRP-X100 (150 mm x 4,1 mm d.i., Hamilton, EUA). Esta coluna, confeccionada em aço inoxidável, é preenchida por uma resina de poliestireno divinil benzeno (PSDVB) com grupos funcionais de trimetil amônia. O tamanho médio das partículas em que se compõe à resina é de cerca de 10 µm. Posteriormente, empregou-se a coluna de troca aniônica de maior comprimento PRP-X100 (250 mm x 4,1 mm d.i., Hamilton, EUA).

O sistema de HPLC consistiu de uma bomba cromatográfica isocrática LC-200 (PerkinElmer, EUA), equipada com uma válvula injetora manual (Reodyne modelo 7725i, EUA) e uma alça de amostragem de 100 µL, em aço-inox. A saída da coluna cromatográfica foi acoplada diretamente ao nebulizador do ICPMS. Todas as conexões foram feitas por meio de tubos de PEEK (poliéter-éter-cetona), com diâmetro interno de 0,010 polegadas. Foi utilizado o filtro de linha Upchurch Inline Solvent Filter A-314 (UpChurch Scientific, Inc, EUA) para proteger a coluna contra a entrada de material particulado, freqüente em amostras de urina. As amostras foram introduzidas no injetor por meio de seringa descartável, estéril-atóxica-apirogênica de 1,0 mL (Injex, Brasil). A válvula injetora era acionada, manualmente, após 5s do início da seqüência de medição do

ICPMS. A quantificação da área dos sinais cromatográficos foi realizada com auxílio do *software* Origin 6.0 (Microcal Software INC., EUA).

5.2. Soluções e reagentes

As soluções analíticas foram preparadas a partir de reagentes de alta pureza (no mínimo, qualidade *pro análise*) por diluições adequadas com água deionizada (>16 MΩcm), previamente destilada e deionizada e, quando necessário, acidificadas por HNO₃ (Merck, p.a., bi-subdestilado). Todas as soluções analíticas e amostras injetadas na coluna cromatográfica foram desgaseificadas em banho de ultra-som por 12 minutos, antes da análise.

As soluções utilizadas na confecção de curvas analíticas foram preparadas a partir de uma solução-estoque acidificada (HNO₃ 3%) de 1000 mg L⁻¹ de antimônio (SbCl₃, Merck, Titrisol) e diluída adequadamente com água deionizada no dia da análise. Soluções-estoque de 1000 mg L⁻¹ de ródio (¹⁰³Rh) e índio (¹¹⁵In) foram utilizadas como padrão interno e preparadas a partir da solução padrão monoelementar de cada elemento (Merck) por diluição em HNO₃ (3%) ou água. A solução analítica de 1000 mg L⁻¹ de cério foi preparada a partir de uma solução padrão de carbonato de cério (Merck, prod. no.102610.0100), por diluição adequada com água deionizada e ajuste final da concentração de HNO₃ para 0,5% (v/v) com HNO₃ (bi-subdestilado). As soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ de Sb(III) e Sb(V) foram preparadas em água deionizada, a partir dos sais tartarato de antimônio(III) (C₄H₄KO₇Sb.0,5H₂O) e antimoniato de potássio (KSb(OH)₆), ambos da firma Merck (produtos no. 1.08092.0250 e 1.05110.0100, respectivamente). A solução estoque de 1000 mg L⁻¹ de TMSb foi preparada em água deionizada, a partir do sal dicloreto de trimetilantimônio (Sb(CH₃)₃Cl₂), da firma Sigma-Aldrich (produto no. 557102-15).

As diluições posteriores das soluções analíticas supra citadas (Cs, Sb-III, Sb-V e TMSb) foram realizadas no próprio eluente, e sempre no mesmo dia da análise cromatográfica.

Uma solução de EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) foi o eluente utilizado no método A (vide Tabela 20), preparada a partir da dissolução do reagente Merck Titriplex II

(p.a.). O metanol da firma J. T. Baker (no. 9070-02) foi utilizado como modificador orgânico na fase móvel deste método.

Diversos eluentes e modificadores foram testados na fase de desenvolvimento de uma metodologia cromatográfica para análise de especiação de antimônio, tais como: ácido cianúrico ($C_3H_3N_3O_3$), 98% da firma Aldrich (cód. 18,580-9), acetonitrila (CH_3CN) da Merck (1.00003.1000) e perclorato de potássio ($KClO_4$).

Também foram utilizados como eluentes (método B) uma solução de KHP (potássio hidrogenoftalato, $C_8H_5KO_4$, Merck, cód. 1.01207.0500) e de fosfato monoácido de amônia $[(NH_4)_2HPO_4]$, Merck, cód. 1.01207.0500). Diariamente, o pH dos eluentes foi ajustado com NH_4OH e HNO_3 .

Nas metodologias de decomposição de amostras clínicas e biológicas utilizou-se ácido nítrico (sub-bi-destilado) e peróxido de hidrogênio 30%, Suprapur® (Merck, 1.07298.1000). Empregou-se o borohidreto de sódio ($NaBH_4$, Vetec, cód. 634) como agente redutor, estabilizado com hidróxido sódio ($NaOH$, Merck, 1.06495.0250), na metodologia de HG-ICPMS.

Na validação do procedimento para determinação de antimônio total foram utilizados os seguintes materiais de referência: amostra de urina certificada “*Urine Metals Control 2*” (Lyphocheck®, Bio-Rad, lote 69402), amostra de sangue bovino do programa de ensaios de proficiência para chumbo em sangue do Instituto Adolfo Lutz (2007), amostra de água do teste de proficiência organizado pela National Association of Testing Authorities, NATA, (*Elements in Water*, sub-programa 78, relatório número 476, 2005).

5.3.

Metodologia para determinação de Sb-total em amostras clínicas e biológicas

5.3.1.

Determinação de Sb-total em fluidos biológicos

A metodologia utilizada para a decomposição (digestão) de fluidos biológicos (sangue total, plasma e urina) consistiu em um ataque ácido a quente (Tabela 17). Para amostras de pacientes com leishmanioses e de macacos *Rhesus*, coletadas antes da aplicação da droga, e de voluntários sadios, foi realizada uma diluição mínima de amostra

de 1:10 v/v. Foi adicionado o padrão interno (^{115}In) na diluição final, para posterior determinação de Sb por ICPMS pelo modo quantitativo com calibração externa. Para todas as outras amostras de fluido biológico, as diluições foram feitas conforme a concentração esperada do analito (1:100, 1:1000, ou mais). Cabe ressaltar, que em todas as diluições, o fator de diluição a ser empregado no modo quantitativo do ICPMS foi corrigido pela massa da amostra do fluido biológico (e não pelo volume).

Tabela 17: Metodologia de digestão ácida para amostra de fluidos biológicos.

Etapas no processo de digestão
1) Pesagem de 1,00 mL de amostra em tubo de polipropileno rosqueado com tampa.
2) Adição de 2,00 mL de HNO_3 (65% m/m)
3) Digestão ácida, com tubo fechado, em bloco digestor durante 16 h a 80 °C
4) Resfriamento à temperatura ambiente.
5) Adição de padrão interno e diluição ao volume final de 10,00 mL ou maior (50 mL ou 100 mL), dependendo da concentração do Sb na amostra.

5.3.2.

Determinação de Sb-total em cabelos e unhas

O procedimento utilizado para lavagem e digestão de amostras de cabelos e unhas foi o mesmo que o laboratório de ICPMS da PUC-Rio vem empregando rotineiramente e está resumida na Tabela 18. Para a análise das soluções resultantes foi empregada uma metodologia para determinação quantitativa, por calibração externa, de 39 elementos, incluindo o Sb, já descrita anteriormente (Miekeley *et al.*, 1998; Fortes, 1999; Carneiro *et al.*, 2002). Foram as seguintes razões porque não apenas o Sb foi determinado nestas amostras: (1) os pacientes mostraram um interesse de receber, gratuitamente, uma avaliação completa (mineralograma) da amostra cedida, (2) o conhecimento da composição inorgânica mais abrangente da amostra poderia auxiliar, eventualmente, na avaliação do estado de saúde do paciente, e (3) os resultados do grupo dos pacientes, antes do início do tratamento, serviriam para melhorar os bancos de dados sobre a composição inorgânica de cabelo e unha, especialmente deficiente quanto à última matriz.

Tabela 18: Metodologia de lavagem e digestão de cabelos e unhas.

Etapas na preparação da amostra
1) Lavagem sucessiva do cabelo com acetona/água deionizada/acetona em banho de ultra-som.
2) Secagem a 60 °C em estufa.
3) Digestão de 0,250 g da amostra com 2,5 mL de HNO ₃ (sub-bi-distilado) em tubo de polipropileno fechado (50 mL) por 12 horas à temperatura ambiente.
4) Continuação do processo digestivo por 2h em bloco digestor à 80°C.
5) Adição de 1,0 mL de H ₂ O ₂ (Suprapur®) e aquecimento em bloco digestor à 80 °C por 15 minutos
6) Após resfriamento, diluição ao volume final de 25 mL.
7) Diluição adequada da solução (6), com adição prévia de índio (In) ou ródio (Rh) como padrão interno.

5.3.3.**Determinação de Sb-total em tecidos (órgãos de macacos)**

Todos os tecidos foram liofilizados e macerados. Após digestão ácida (Tabela 19), determinou-se a concentração de Sb total por ICPMS pelo modo quantitativo com calibração externa. Após as diluições necessárias da amostra filtrada (0,45 µm) com água deionizada e adição de padrão interno (¹¹⁵In), a análise foi realizada por aspiração direta e nas condições resumidas na Tabela 15. Cabe ressaltar, que o fator de diluição, a ser utilizado no cálculo das concentrações finais, foi corrigido pela massa da amostra do tecido após liofilização (“base seca”).

Tabela 19: Procedimento para digestão de tecidos.

Etapas no preparo das amostras de tecido biológico
1) Digestão de 0,250 g da amostra com 5,0 mL de HNO ₃ (sub-bidestilado) em tubo de polipropileno rosqueado (50 mL) por 12 horas à temperatura ambiente.
2) Continuação do processo digestivo por 3 h em bloco digestor a 80°C.
3) Adição de 2,0 mL de H ₂ O ₂ (Suprapur®) e aquecimento em bloco digestor a 80 °C por 10 minutos
4) Após resfriamento, diluição a volume final de 20 mL.
5) Diluição adequada da solução (4), com adição prévia de índio (In) ou ródio (Rh) como padrão interno.

5.4.

Metodologias para determinação das espécies de Sb em amostras clínicas

5.4.1.

Metodologias para determinação das espécies de Sb em amostras de plasma e urina

Foram utilizadas duas metodologias de IC-ICPMS para análise de especiação de Sb em amostras clínicas, aqui denominadas: método A ou B. Para análise de amostras de plasma de macacos *Rhesus* utilizou-se o método A, com as suas características resumidas na Tabela 20. Amostras de urina de paciente com leishmaniose tegumentar americana foram analisadas, seguindo-se o método B (Tabela 21). No ultimo caso, as amostras de urina foram coletadas após o final do tratamento, durante quatro dias consecutivos e imediatamente após a micção, estando o paciente no próprio Laboratório de ICPMS da PUC-Rio. Em ambos os métodos, as amostras e as soluções analíticas utilizadas na calibração foram sempre diluídas com o próprio eluente. No mais, foram empregados os parâmetros de operação descritos no sub-capítulo 5.1.3 (página 93).

Tabela 20: Metodologia de análise de especiação de Sb por IC-ICPMS (método A).

Cromatografia iônica	
Coluna	PRP-X100 (150 mm x 4,1 mm d.i., Hamilton, EUA)
Fase móvel	EDTA 4 mmol L ⁻¹ + metanol 2,5% v/v (pH 4,7)
Vazão	1,50 mL min ⁻¹
Volume de Injeção	100 µL
ICPMS	
Instrumento	ELAN 5000 (PerkinElmer-Sciex, EUA)
Isótopos monitorados	¹²¹ Sb, ¹²³ Sb e ¹³³ Cs (marcador do tempo morto)

Tabela 21: Metodologia para análise de especiação de Sb por IC-ICPMS (método B).

<i>Cromatografia iônica</i>			
Coluna	PRP-X100 (250 mm x 4,1 mm d.i., Hamilton, EUA)		
Fase móvel	<u>Eluente A</u> : 20 mmol L ⁻¹ EDTA + 2 mmol L ⁻¹ KHP, pH 4,5 <u>Eluente B</u> : 50 mmol L ⁻¹ (NH ₄) ₂ HPO ₄ , pH 8,3		
Vazão	1,50 mL min ⁻¹		
Volume de Injeção	100 µL		
<i>Programa de eluição</i>			
Etapa	Tempo (minuto)	% eluente A	% eluente B
0	0,0	100	0
1	1,4	100	0
2	8,1	0	100
3	2,0	100	0
<i>ICPMS</i>			
Instrumento	ELAN 5000 (PerkinElmer-Sciex, EUA)		
Isótopos monitorados	¹²¹ Sb, ¹²³ Sb, ¹³³ Cs		

5.4.2. Análise de especiação em antimoniato de meglumina por HG-ICPMS

No presente estudo, todos os pacientes voluntários com leishmaniose tegumentar americana, assim como, os macacos *Rhesus* inoculados com *Leishmania brazilienses* foram tratados com Glucantime® (antimoniato de meglumina, Aventis Farma Ltda., São Paulo, Brasil). A droga, apresentada em ampolas de 5 mL, contém, segundo o fabricante, 0,3 g de antimoniato de N-metil glucamina, equivalentes a 0,081 g de Sb(V) por mL de solução.

A metodologia de HG-ICPMS para a determinação de Sb(III) aplicada em antimoniais pentavalentes está apresentada na Tabela 22. A espécie química Sb(III) foi determinada a partir da reação com o agente redutor borohidreto de sódio (NaBH₄ 0,4% m/v, VETEC cód. 634). Devido às altíssimas concentrações de antimônio no fármaco (cerca de 80.000 mg L⁻¹), e para evitar as incertezas relacionadas com a alta diluição necessária para utilização da técnica de ICPMS, empregou-se a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (Tabela 16) para determinação do antimônio

total. A concentração da espécie Sb(V) foi calculada pela diferença entre o antimônio total e o Sb(III). Os dados de desempenho analítico desta metodologia foram determinados anteriormente (2001a). O limite de detecção para quantificação da espécie de Sb(III) é igual a $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 22: Metodologia para determinação de Sb(III) por HG-ICPMS em Glucantime®.

Etapas/parâmetros do procedimento				
1) Diluição da droga no mínimo 10^6 vezes com água deionizada. 2) Para determinação de Sb(III) utiliza-se como agente redutor o NaBH_4 (0,4%), estabilizado em NaOH (0,05%) e preparado no dia da análise. 3) As vazões do carreador (HNO_3 , 3% v/v) e do redutor são de $10,0 \text{ mL min}^{-1}$ e $6,0 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente. 4) Foi utilizada uma alça de amostragem de $200 \mu\text{L}$ e um separador gás-líquido de membrana (Teflon: $0,2 \mu\text{m}$)				
Programa de operacional do FIAS 200				
Etapa	Duração (s)	Bomba 1 (Amostra)	Bomba 2 (HNO_3 e NaBH_4)	Posição da válvula rotatória
Pré-amostragem	10	120	50	1
1	10	120	0	1
2 (medição)	20	0	120	2
3 (lavagem)	10	60	0	1

5.5.

Testes de estabilidade das espécies de antimônio

Para o teste de estabilidade, em urina, das espécies de Sb disponíveis para este estudo (Sb-III, Sb-V, TMSb), uma amostra de 9.3 mL foi fortificada com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie e com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cério. Esta urina fortificada foi dividida em quatro alíquotas de mesmo volume ($2,5 \text{ mL}$) e estocada em tubo de polipropileno com capacidade para 15 mL . Os tubos foram mantidos dentro do congelador da geladeira (temperatura cerca de -4°C e retirados somente na hora da análise para a diluição adequada (1+9) com o eluente EDTA. As análises por IC-ICPMS (método A) foram realizadas imediatamente após o preparo da urina da fortificada (t_0), 4 horas após o preparo (t_1), 8 horas (t_2) e 24 horas (t_3). Este intervalo de tempo estabelecido para avaliar a estabilidade das espécies nesta matriz foi

considerado suficiente, pois o tempo entre a coleta da(s) amostra(s), em geral no Hospital do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) da FIOCRUZ, e a análise delas no Laboratório de ICPMS da PUC-Rio nunca ultrapassou o tempo máximo de 24 horas, quando se pretendia análises de especiação de antimônio.

5.6.

Grupos de amostragem

Com o objetivo de compreender o metabolismo do antimônio em organismos vivos, realizou-se o monitoramento de antimônio total e de suas espécies químicas antes, durante e após o tratamento com antimonioato de meglumina em macacos Rhesus e pacientes voluntários com leishmaniose tegumentar americana.

5.6.1.

Estudo terapêutico com macacos *Rhesus* inoculados com *Leishmania (V.) braziliensis*

Neste projeto, utilizaram-se 13 macacos *Rhesus (Macaca mulatta)* adultos fêmeas (n=11) e macho (n=1) do Serviço de Primatologia da Fiocruz, pesando de 4,95 a 8,62 kg. Os símios foram infectados com formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A inoculação foi realizada por via intradérmica na região supraocular.

O primeiro grupo de amostragem (n=6) foi constituído por macacos *Rhesus* que receberam uma dose diária de Sb(V) de 20 mg kg⁻¹. (dose alta padrão); o segundo grupo de amostragem (n=6) foi tratado com 5 mg kg⁻¹ g (dose baixa em investigação). Um terceiro “grupo” de amostragem foi constituído por um único macaco, que já tinha sido tratado anteriormente com AM e submetido no presente estudo novamente ao tratamento com dose alta.

Os três grupos de macacos receberam dose diária da droga, administrada por via intramuscular durante 21 dias consecutivos. Durante o projeto, os animais foram alojados individualmente em jaulas. Foram coletadas amostras de sangue e pelos de macacos com leishmaniose antes, durante e após o tratamento. As amostras de pelos foram coletadas a cada 14 dias até a eutanásia do animal. As amostras de sangue foram coletadas no primeiro dia de tratamento 2, 6, 12 e 24 horas após a administração de AM. Após o primeiro dia de

tratamento, as amostras de sangue foram coletadas duas vezes por semana, sempre às segunda-feira e sexta-feira. Porém, após 61 dias do início do tratamento as amostras eram coletadas semanalmente. Cabe ressaltar, que os intervalos entre as coletas foram determinados de forma que estresse imposto aos animais fosse minimizado, obedecendo-se o tempo necessário para a recuperação dos animais entre as coletas de sangue e respeitando-se os dias e horários de manutenção das gaiolas.

A coleta de sangue em tubos *Vacutainer*® heparinizados sempre foi realizada após a anestesia do animal com cloridrato de quetamina por via intramuscular. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos para obtenção de papa de hemácias e plasma, que foram condicionados separadamente em tubos de polipropileno. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o dia da análise.

Órgãos foram coletados após a eutanásia dos animais. As necropsias ocorreram nos dias 75, 75, 78 e 79 após o início do tratamento. Os tecidos removidos foram: adrenais, baço, bulbo, coração, bexiga, cerebelo, cérebro, cólon, estômago, fígado, gânglios axilares e inguinais, pâncreas, pulmões, timo, rins, vesícula, tireóide, dente, medula óssea, músculo (quadríceps), osso (costela), pele, pelo e unhas. Os fragmentos dos tecidos foram pesados e armazenados a -20°C até o dia da análise.

A determinação de Sb-total foi realizada em plasma, papa de hemácias, pelos e órgãos dos macacos por ICPMS. A análise de especiação por IC-ICPMS foi feita em amostras de plasma coletadas 22, 23, 26 e 30 dias após o início do tratamento. Estes dias correspondem aos primeiros pontos de coleta após o final da administração da droga. Estas amostras foram analisadas logo depois da coleta e a preservação foi feita apenas com gelo durante o transporte (caixa de Isopor) até o início das análises.

5.6.2

Estudo terapêutico com pacientes com leishmaniose tegumentar americana

Foram selecionados pacientes do ambulatório do Centro de Referência em Leishmanioses - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Independentemente da dose diária administrada, os pacientes foram agrupados de acordo com o respectivo regime terapêutico determinado pela equipe médica do IPEC.

Grupo de dose alta com tratamento contínuo: O primeiro grupo de amostragem (n=3) foi constituído por pacientes com LTA tratados com dose diária de Sb(V) de 20 mg kg⁻¹ (dose alta padrão) administrada por via intramuscular durante 20 dias consecutivos.

Grupo de dose alta com tratamento em série: O segundo grupo (n=2) foi constituído por pacientes com LTA que receberam também a dose alta padrão por via intramuscular, entretanto em duas séries de aplicações. A primeira série do primeiro paciente ocorreu durante 12 dias consecutivos e a segunda série durante 8 dias consecutivos, com um intervalo entre as séries de 31 dias. A primeira série do segundo paciente ocorreu durante 8 dias consecutivos e a segunda durante 12 dias consecutivos, com um intervalo entre as séries de 24 dias. Originalmente, estes pacientes seriam submetidos ao regime contínuo com dose alta, porém, devido à ocorrência de efeitos adversos, o tratamento foi interrompido na primeira série e posteriormente finalizado.

Grupo de dose baixa com tratamento contínuo convencional: O terceiro grupo (n=6) foi de pacientes tratados com Sb(V) de 5 mg kg⁻¹ d⁻¹ (dose baixa em investigação) de AM por tratamento contínuo, constituído de doses diárias de AM administrado por via intramuscular durante 30 dias consecutivos. Em três dos seis pacientes não foi necessária a aplicação de 30 doses, pois a equipe médica do IPEC considerou que eles entraram no critério de cura em 25, 28 e 29 dias após o início do tratamento.

Grupo de dose baixa com tratamento em série: O quarto grupo de pacientes (n=3) foi tratado com Sb(V) de 5 mg kg⁻¹ d⁻¹ (dose baixa em investigação) por administração de MA em série, constituído de séries compostas de doses diárias de antimoniato de MA administrado por via intramuscular com aplicações em dias consecutivos; com intervalos entre as séries. O primeiro integrante deste grupo foi submetido ao tratamento em série convencional, constituído de 3 séries compostas de doses diárias de MA durante 10 dias consecutivos; com intervalos entre as séries de 10 e 13 dias, respectivamente.

Os outros dois pacientes foram tratados com duas séries. Um deles foi submetido a duas séries compostas de 30 doses diárias consecutivas com um intervalo de 43 dias entre as séries. A primeira série do terceiro paciente também foi de 30 doses diárias, porém a terceira série teve apenas 8 aplicações de MA em dias consecutivos, com um intervalo de 29 dias entre as séries.

Grupo de dose baixa com tratamento contínuo de curta duração: O quinto grupo de amostragem (n=2) foi constituído por pacientes com LTA tratados com 5 mg kg⁻¹ d⁻¹ (dose baixa em investigação) de MA por tratamento contínuo, constituído de doses diárias de MA administrado por via intramuscular durante 10 dias consecutivos. Originalmente, estes pacientes seriam submetidos ao tratamento contínuo em série convencional, porém como a equipe médica do IPEC avaliou que eles já se encontravam dentro do critério de cura, não foi necessária a realização das outras 2 séries subseqüentes.

Sempre que possível, foram coletadas amostras de sangue, urina, cabelos e unhas nestes pacientes antes, durante e após o tratamento. Os intervalos de coleta e os tipos de análise realizados se encontram na Tabela 23.

Cabe ressaltar que nem sempre foi possível seguir rigorosamente o intervalo de coleta estabelecido, devido a problemas “técnicos” (p.ex., feriados, adequação do cronograma de coleta aos dias de atendimento do Ambulatório de LTA do IPEC, falta do paciente no dia da consulta marcada, resistência à coleta de sangue, especialmente em pacientes masculinos, ou à coleta de unhas, especialmente em pacientes femininos).

As amostras de sangue (cerca de 5,0 mL) foram coletadas à vácuo em três tubos heparinizados, na sala de coleta do laboratório do IPEC. Dois tubos eram centrifugados no laboratório do IPEC para obtenção do plasma sangüíneo (cerca de 2,0 mL). As amostras de urina foram coletadas em dois frascos de coleta universal para este tipo de amostra. O primeiro frasco era destinado para a dosagem de creatinina realizada pelo laboratório de Bioquímica do IPEC. E o segundo frasco foi destinado para a determinação de antimônio pelo laboratório da PUC-Rio.

As amostras clínicas foram transportadas para a PUC-Rio em caixa de isopor com gelo. Estas amostras eram estocadas no congelador da geladeira ou freezer -20°C (de acordo com a disponibilidade do laboratório) até o dia da análise.

As amostras de cabelo, uma mecha da nuca (aproximadamente 0,25 g), e de unhas dos dez dedos das mãos foram coletadas para dosagem de antimônio. A coleta foi feita no ambulatório do IPEC utilizando-se tesoura de aço inoxidável, e o material foi acondicionado em sacos de polietileno devidamente etiquetados. As amostras de cabelo foram coletadas de acordo com as normas recomendadas pelo *Hair Analysis Standardization Board* (Carneiro *et al*, 2002).

Tabela 23: Intervalos de coleta e análises

Procedimento	Pré- tratamento	10	20	30	40	50	60	80	110	140	230
Coleta de urina (1)*	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dosagem de creatinina (1)	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Determinação de Sb total em urina (2)	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Coleta de Sangue (1)	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Determinação de Sb total em sangue (2)	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Coleta de Plasma (1)	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Determinação de Sb total em plasma (2)	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Coleta de cabelo (1)	X			x		x		x	x	x	x
Determinação de Sb total em cabelo (2)	X			x		x		x	x	x	x
Coleta de unha (1)	X			x		x		x	x	x	x
Determinação de Sb total em unha (2)	X			x		x		x	x	x	x

(1) Procedimento realizado na FIOCRUZ; (2) Análises feitas na PUC-Rio; (*) As amostras de urina foram a primeira do dia, com exceção do primeiro dia de coleta. No primeiro dia de consulta o paciente recebeu um *kit* com caixa de isopor, gelo e dois frascos de coleta universal para urina devidamente identificados com o dia da coleta. Na consulta subsequente, o paciente entregava as amostras coletadas, e recebia mais dois frascos de coleta de urina.