

6 Resultados e discussões

6.1. Desenvolvimento de técnicas analíticas para análise de especiação de antimônio por IC-ICPMS

Esta parte do estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia confiável para a separação e quantificação simultânea de Sb(III), Sb(V) e TMSb. A associação da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICPMS) permitiu aproveitar as vantagens individuais de cada técnica; isto é, a eficiência de separação de diferentes espécies conferida a cromatografia de troca aniônica, e a alta sensibilidade da técnica de ICPMS na detecção e quantificação do elemento.

6.1.1. Separação das espécies inorgânicas de Sb com a coluna PRP-X100 (150 mm)

Empregou-se, inicialmente, a coluna de troca aniônica PRP-X100 com o objetivo de separar as espécies inorgânicas de antimônio. Foram realizados testes com diferentes concentrações do eluente EDTA, nas condições operacionais resumidas na Tabela 15 (página 92), uma vez que este eluente já tinha sido utilizado com sucesso em outros trabalhos (vide item 4.2.1.1, página 77).

Dados levantados na literatura especializada mostram que o pH exerce influência na forma em que as espécies de antimônio se apresentam em solução aquosa, ou seja, a distribuição das espécies inorgânicas de antimônio depende da acidez ou alcalinidade do meio (p.ex. Ulrich *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2000; Ulrich, 1998). Por exemplo, a espécie Sb(III) na forma de tartarato predomina como ânion monovalente em pH menor que 3; porém, em meios com pH entre 3 e 7, esta mesma espécie forma complexos com carga +2. No caso do EDTA, formam-se complexos aniônicos com espécies inorgânicas de antimônio, supostamente com cargas -3 e -1 para EDTA-Sb^{III} e EDTA-Sb^V, respectivamente. Não foram realizados testes de otimização do valor de pH para a separação

cromatográfica, no presente trabalho. Empregou-se o eluente EDTA com pH 4,7, pois este foi o valor ideal de pH estabelecido em trabalho publicado anteriormente (Mortari, 2001; Miekeley et al., 2002).

Nos testes realizados com concentrações distintas de EDTA (Figura 6), a última espécie a ser eluída sempre foi a espécie inorgânica trivalente Sb(III). Ela mostra maior interação com a fase estacionária da coluna, indicada pela forma dos seus sinais (“picos”) cromatográficos: largos e assimétricos. À medida que a concentração de EDTA aumentava os sinais correspondentes a esta espécie tornavam-se mais estreitos e apresentavam menores tempos de retenção. A espécie Sb(V) interage apenas fracamente com a fase estacionária da coluna, apresentando sinais estreitos e simétricos em toda faixa de concentração do EDTA testada. A interação iônica das espécies inorgânicas ocorre com os grupos ionizáveis carregados positivamente da resina. As espécies inorgânicas de Sb formam complexos aniônicos com o EDTA, sendo que o complexo EDTA-Sb^{III} apresenta maior carga que o EDTA-Sb^V, motivo pelo qual o tempo de retenção relativo à espécie trivalente é maior que o da espécie pentavalente.

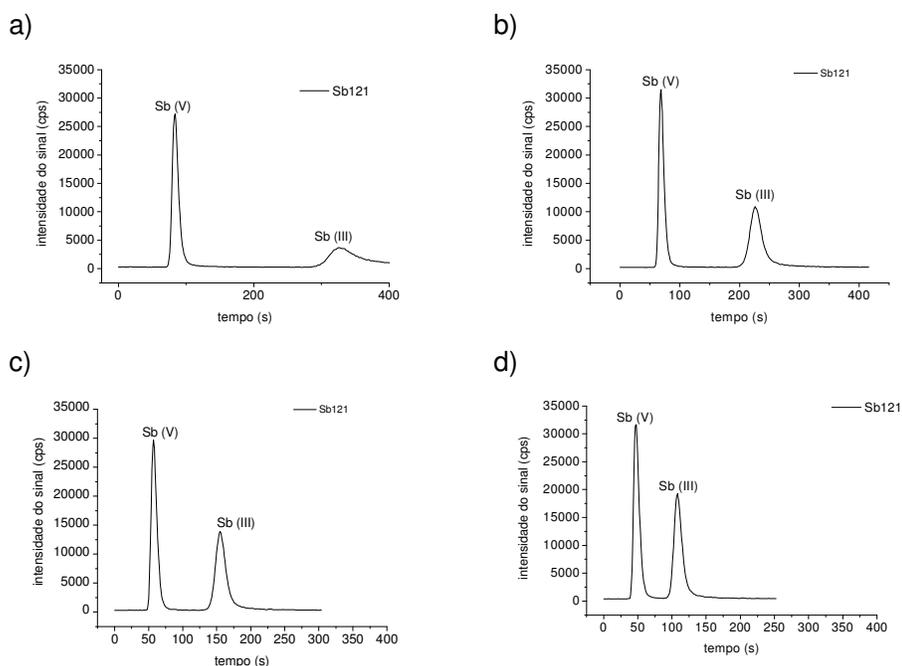


Figura 6: Cromatogramas de duas espécies de Sb em soluções aquosas. Os sinais correspondem a 2 ng de antimônio para cada espécie injetada na coluna PRP-X100, Hamilton. a) EDTA 1 mmol L⁻¹; b) EDTA 2,5 mmol L⁻¹; c) EDTA 4 mmol L⁻¹; d) EDTA 10 mmol L⁻¹.

Para estabelecer as condições ótimas da separação cromatográfica das espécies de antimônio (Sb^{III} e Sb^{V}) em estudo, avaliou-se a influência da concentração do EDTA nos tempos de retenção ajustado de cada espécie (Tabela 24). Buscou-se, então, um melhor desempenho analítico, comparando-se os cromatogramas nas várias concentrações do eluente, para determinar qual concentração de EDTA promovia a melhor separação das espécies, dentro de um intervalo de tempo razoável. Dessa forma, a análise baseou-se não somente na resolução dos sinais obtidos e seus respectivos tempos de retenção, mas também no fator de retenção (Figuras 7 e 8). O EDTA na concentração de 4 mmol L^{-1} foi considerado, assim, como a fase móvel mais adequada, por apresentar a relação mais vantajosa entre resolução e tempo de separação cromatográfica.

Tabela 24: Efeito da concentração do EDTA no tempo de retenção ajustado (t_r') das espécies de antimônio.

EDTA (mmol L^{-1})	Média t_r' de Sb^{V} (s)	DPR t_r' de Sb^{V} (%)	Média t_r' de Sb^{III} (s)	DPR t_r' de Sb^{III} (%)
1 ^(a)	51,0	3,3	290,6	2,3
2,5 ^(b)	35,1	1,5	191,6	0,5
4 ^(a)	23,0	1,4	120,9	0,5
10 ^(a)	11,2	0,5	71,7	0,4

(a) $n = 5$, (b) $n = 4$

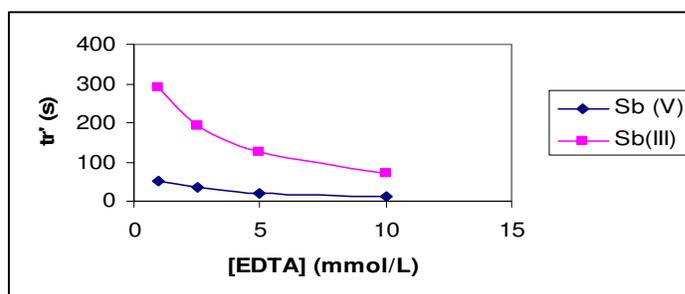


Figura 7: Tempo de retenção ajustado versus concentração de EDTA

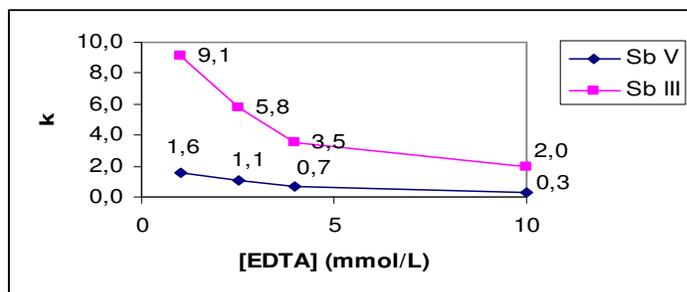


Figura 8: Fator de retenção versus concentração de EDTA

A escolha do eluente envolve não só a determinação da concentração e pH ideais, mas também do uso ou não de modificadores orgânicos. Como já foi demonstrada, a espécie Sb(III) interage mais fortemente com a fase estacionária da coluna. A utilização de um modificador orgânico pode potencialmente diminuir as interações não iônicas entre as espécies de antimônio e a resina da coluna. Uma vez que se está utilizando o ICPMS como detector, o eluente deve apresentar propriedades adequadas para não interferir, p.ex., na sensibilidade da técnica ou, alternativamente, deve-se procurar meios para minimizar o efeito (p.ex.; uso de nebulizadores especiais como o nebulizador ultra-sônica).

Por tais motivos, foi investigado o efeito da adição de metanol (2,5% v/v) na fase móvel nas mesmas condições operacionais do teste anterior. O EDTA 4 mmol L⁻¹ com metanol 2,5% v/v (pH 4,7) foi considerado a fase móvel mais adequada, pois o sinal relativo à espécie Sb(III) tornou-se mais estreito (menor largura a meia altura) e apresentando uma maior simetria (Figura 9 e Tabela 25). Este comportamento ocorre porque o metanol, por ser um solvente orgânico e menos polar, afeta o mecanismo de separação à medida que ele melhora a compatibilidade entre os complexos aniônicos de antimônio (EDTA-Sb^{III} e EDTA-Sb^V) e trocadores iônicos com matriz hidrofóbica.

Tabela 25: Efeito da adição de metanol no tempo de retenção (t_r') ajustado, fator de retenção (k) e largura da meia altura ($W_{1/2}$) dos picos das espécies de antimônio em EDTA 4 mmol L⁻¹.

[Metanol] (% v/v)	Média t_r' de Sb ^V (s)	k Sb ^V	$W_{1/2}$ Sb ^V	Média t_r' de Sb ^{III} (s)	k Sb ^{III}	$W_{1/2}$ Sb ^{III}
0 (n = 5)	23,0	0,7	9,6	120,9	3,5	26,9
2,5 (n = 6)	24,4	0,7	8,9	113,0	3,3	17,1

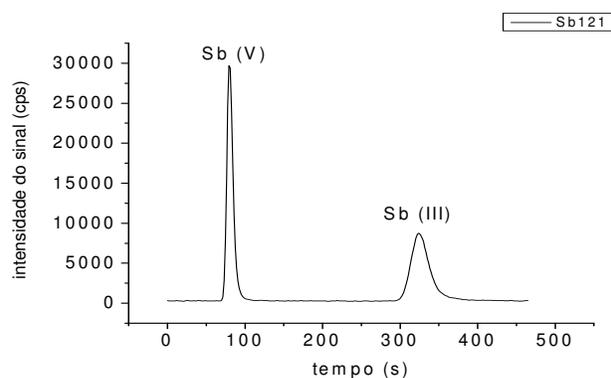


Figura 9: Cromatograma das espécies de Sb(V) e Sb(III) em soluções aquosas. Os sinais correspondem a 3 ng de antimônio para cada espécie injetada na coluna PRP-X100, Hamilton, com o eluente EDTA 4 mmol L⁻¹ com metanol 2,5% v/v (pH 4,7).

Não se tentou aumentar ainda mais a concentração de metanol no eluente, uma vez que o cromatograma obtido já foi considerado satisfatório para as aplicações previstas, e que maiores proporções do solvente orgânico no eluente poderiam necessitar a utilização de oxigênio no plasma para evitar a deposição de carbono na interface do espectrômetro de massa.

6.1.2.

Separação Sb(V), Sb(III) e TMSb com a coluna PRP-X100 (150 mm)

Diversas tentativas foram realizadas para a separação simultânea das três espécies de antimônio. Inicialmente, realizaram-se testes com diferentes concentrações do eluente EDTA (1 mmol L⁻¹ a 24 mmol.L⁻¹), empregando-se a mesma coluna de troca aniônica dos ensaios anteriores e condições operacionais semelhantes. Nas concentrações mais baixas de EDTA, não ocorre a separação das espécies Sb(V) e TMSb. Também se observou que os sinais correspondentes ao TMSb eram extremamente largos. À medida que a concentração de EDTA aumentava, o sinal de TMSb afastava-se do pico de Sb(V); porém, a resolução entre os sinais nunca foi satisfatória. Em concentrações mais altas de EDTA, percebeu-se nitidamente a presença de sinais picos, embora eles ainda não apresentassem uma resolução aceitável (Figura 10).

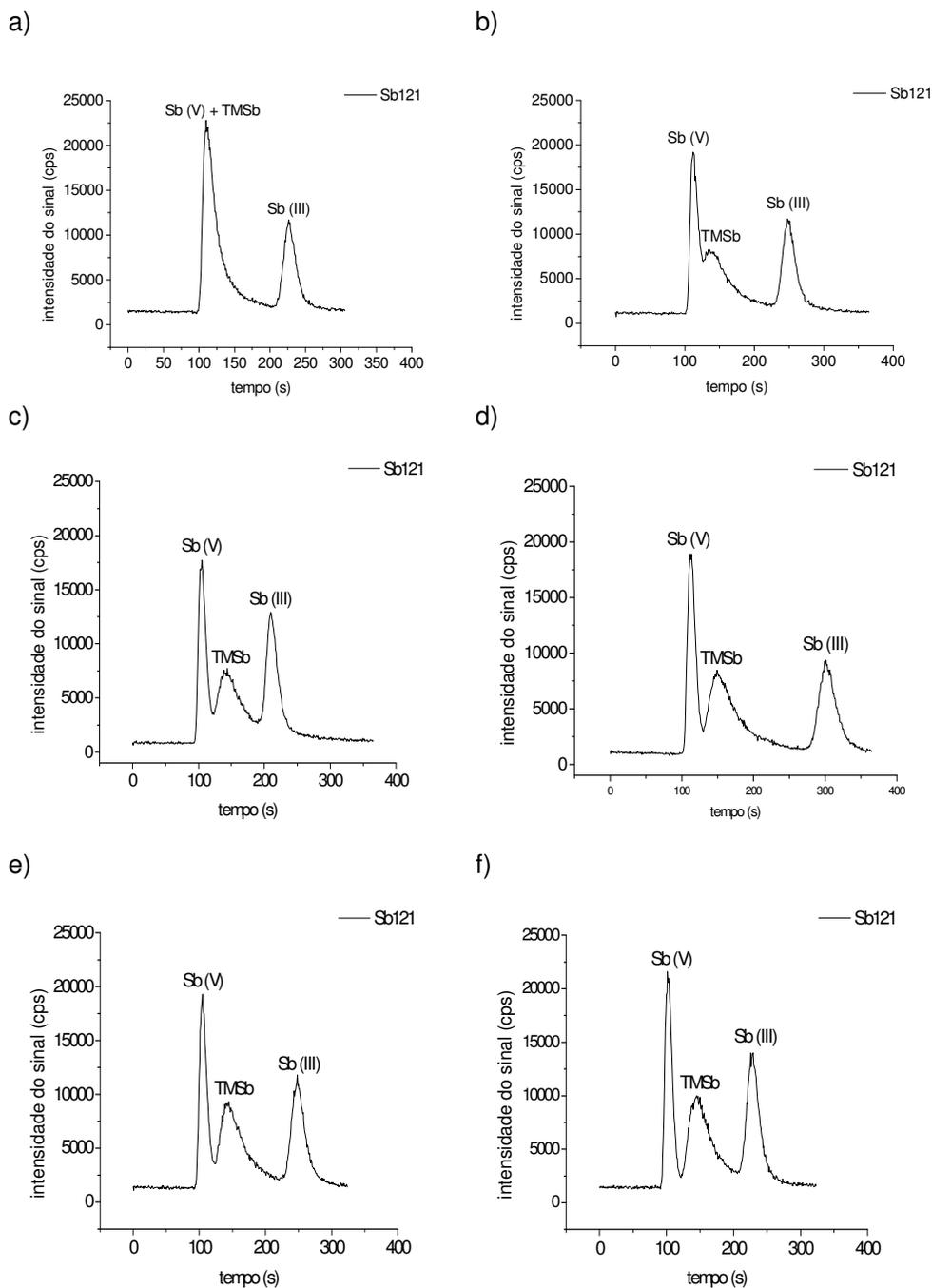


Figura 10: Cromatogramas de três espécies de Sb em soluções aquosas. Os sinais correspondem a 1 ng de antimônio para cada das três espécies injetadas. *Sample read delay* 30s, EDTA pH 4,7 empregado como fase móvel, nas seguintes concentrações; a) 1 mmol L⁻¹; b) 4 mmol L⁻¹; c) 6 mmol L⁻¹; d) 10 mmol L⁻¹; e) 18 mmol L⁻¹; f) 24 mmol L⁻¹.

Com o intuito de melhorar a separação das três espécies de antimônio, investigou-se o potencial do ácido cianúrico como fase móvel. Este eluente foi utilizado com sucesso para separação de espécies Se(IV), Se(VI) e SeCN em amostras de efluentes de uma refinaria de petróleo, sendo a última espécie de

caráter mais hidrofóbico, tal como esperado para TMSb (Pereira, 2004; Pereira *et al.*, 2005; Almeida, 2008).

Na primeira tentativa, optou-se pela utilização do ácido cianúrico. Inicialmente, empregou este eluente com pH 4,7, visto que este é o pH ótimo para a separação das espécies inorgânicas de antimônio, quando se emprega o EDTA como fase móvel. A utilização deste eluente, altera o comportamento cromatográfico do TMSb, pois, diferente da metodologia com EDTA, a espécie orgânica é a primeira a ser eluída. Em meio ácido, o sinal relativo a esta espécie orgânica é largo. Já em meio alcalino, o sinal torna-se mais estreito, porém mais próximo ao volume morto. Em relação às espécies inorgânicas de Sb, em meio ácido, elas ficam retidas na coluna. Por outro lado, em meio neutro, ocorre somente a retenção da espécie trivalente. Quando se testou o pH básico, ocorre a co-eluição de Sb(III) e Sb(V). Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 11 a 13 e podem ser resumidos da seguinte forma.

Cabe ressaltar, que a influência da variação da concentração de ácido cianúrico também foi avaliada na faixa de concentração de 1 a 6 mmol L⁻¹. Contudo, observou-se uma alteração considerável no comportamento cromatográfico das espécies de antimônio somente pela influência do pH. Testou-se também uma solução de ácido cianúrico 3 mmol L⁻¹(pH 9,0) contendo perclorato (2,5 mmol L⁻¹) e acetonitrila (2%) como modificadores (Figura 14). Tal solução, quando empregada como fase móvel, apresentou resultados satisfatórios na separação de diferentes espécies de selênio (vide citações anteriores). Obteve-se sucesso na separação entre a espécie orgânica (TMSb) e as inorgânicas, porém o Sb(III) e Sb(V) foram eluídos simultaneamente. Embora esta metodologia possa ter um interesse potencial em determinadas aplicações, para o propósito deste trabalho não foi considerada satisfatória, uma vez que as espécies inorgânicas de antimônio são de suma importância como metabólitos da droga, sendo a espécie TMSb apenas um hipotético produto de desintoxicação. Por isso, as tentativas de utilizar ácido cianúrico como eluente cromatográfico, em soluções puras, ou na presença de modificadores, foram abandonadas.

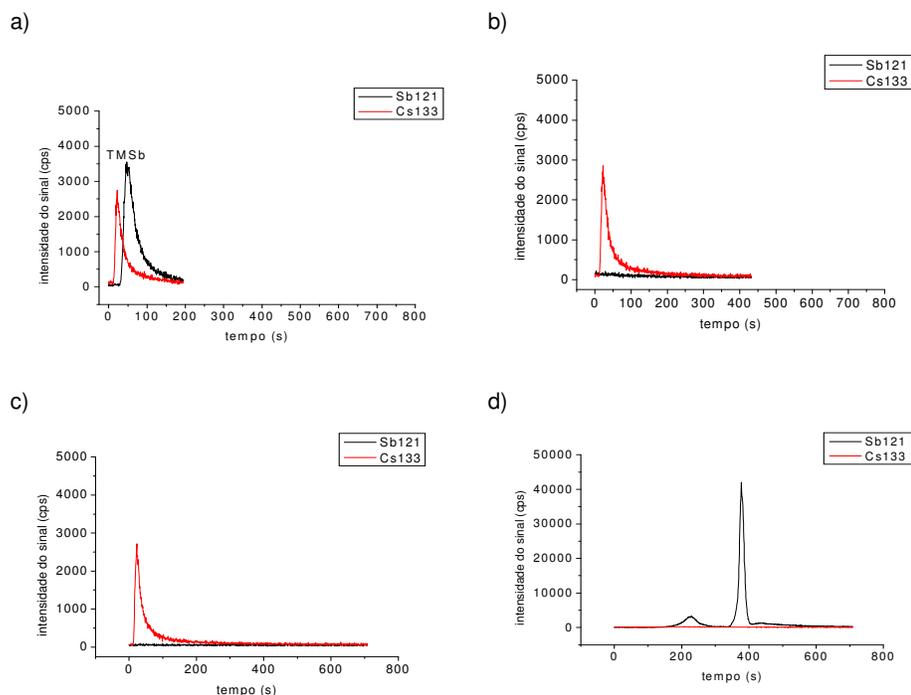


Figura 11: Cromatogramas das espécies de Sb em soluções aquosas empregando-se o eluente ácido cianúrico 3 mmol L^{-1} (pH 4,7). *Sample read delay*: 30s. Espécies injetadas: a) Cs, TMSb; b) Cs, Sb(V) c) Cs, Sb(III); d) não foi injetada nenhuma espécie, as espécies retidas de Sb foram eluídas com EDTA 4 mmol L^{-1} , pH 4,7. A espécie catiônica Cs^+ foi utilizada como marcador do tempo morto.

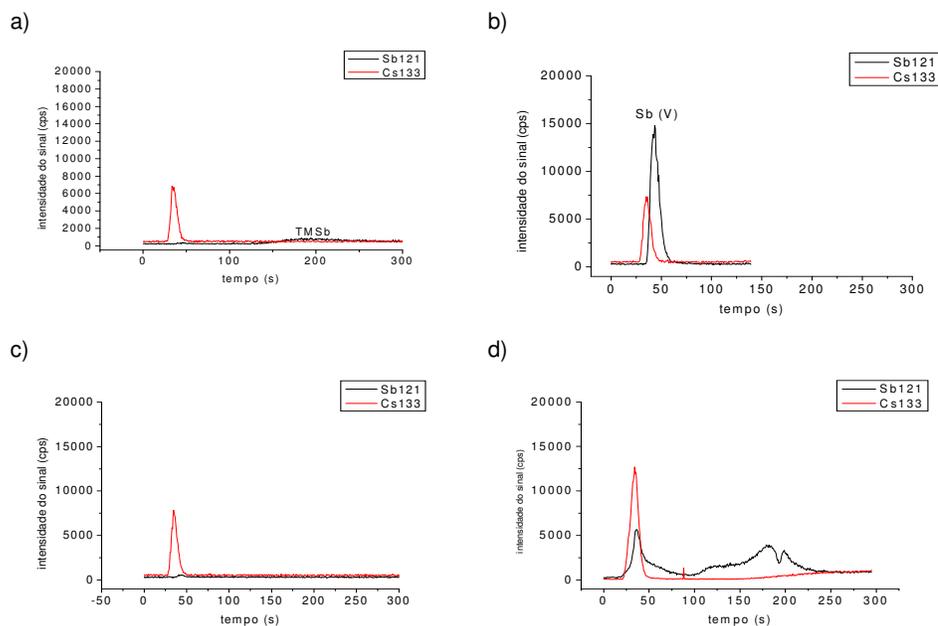


Figura 12: Cromatogramas das espécies de Sb em soluções aquosas, empregando-se o eluente ácido cianúrico 3 mmol L^{-1} (pH 7,0). *Sample read delay*: 30s. Espécies injetadas: a) Cs, TMSb; b) Cs, Sb(V) c) Cs, Sb(III); d) não foi injetada nenhuma espécie, a espécie retida (SbIII) foi eluída com EDTA 4 mmol L^{-1} , pH 4,7. A espécie catiônica Cs^+ foi utilizada como marcador do tempo morto.

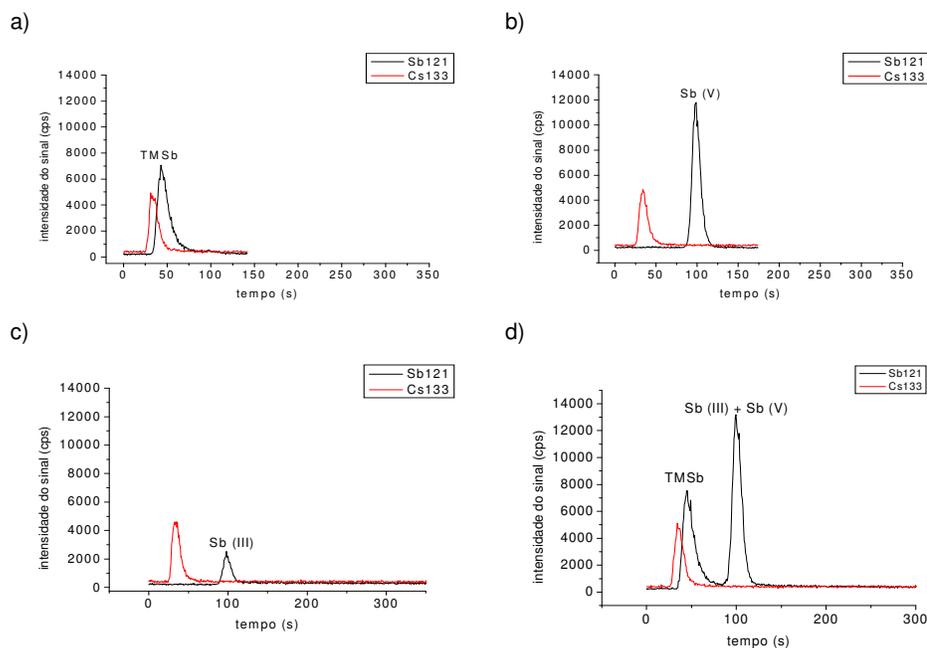


Figura 13: Cromatogramas das espécies de Sb em soluções aquosas, empregando-se o eluente ácido cianúrico 3 mmol L^{-1} (pH 10,0). *Sample read delay*: 30s. Espécies injetadas: a) Cs, TMSb; b) Cs, Sb(V) c) Cs, Sb(III); d) Cs, TMSb, Sb(III) e Sb(V). A espécie catiônica Cs^+ foi utilizada como marcador do tempo morto.

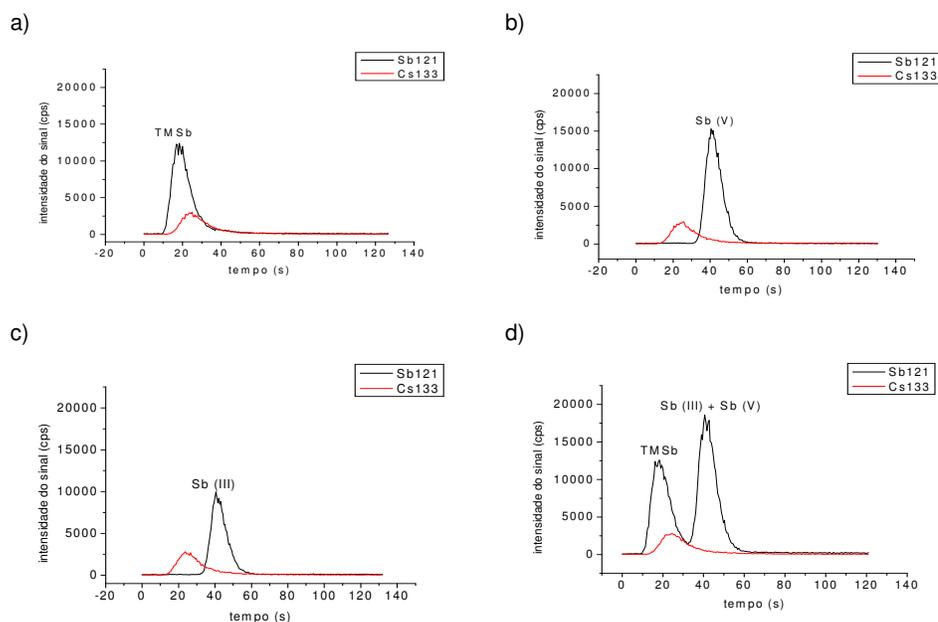


Figura 14: Cromatogramas das espécies de Sb em soluções aquosas utilizando-se o eluente ácido cianúrico 3 mmol L^{-1} , perclorato $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, acetonitrila 2% (pH 9,0). *Sample read delay*: 30s. Espécies injetadas: a) Cs, TMSb; b) Cs, Sb(V) c) Cs, Sb(III); d) Cs, TMSb, Sb(III) e Sb(V). A espécie catiônica Cs^+ foi utilizada como marcador do tempo morto.

6.1.3.

Separação das três espécies de Sb com a coluna PRP-X100 (250 mm)

Com o intuito de se obter a separação simultânea das três espécies de antimônio, testou-se uma nova coluna PRP-X100 (250 mm x 4,1 mm d.i., Hamilton, EUA), com melhor resolução, assim como, outra proposta para eluição das espécies. Tal proposta consistiu em uma variação abrupta de concentração (*step gradient*), visando não só a separação simultânea satisfatória das três espécies de antimônio, como também a diminuição do tempo do total da análise, o que possibilitaria a economia de custos, uma vez que o instrumento não é acessível para outros trabalhos durante as longas separações cromatográficas.

Para separar e quantificar simultaneamente as três espécies de antimônio (Sb(III), Sb(V) e TMSb) foi adaptada a metodologia descrita por Gregori e colaboradores (2005). Utilizaram-se dois eluentes como fase móvel. O primeiro eluente consiste em uma solução de 20 mmol L⁻¹ EDTA + 2 mmol L⁻¹ KHP à pH 4,5 (eluente A), e o segundo em solução de 50 mmol L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄ com pH 8,3 (eluente B).

Comparando esta nova proposta de eluição com as anteriores (EDTA ou ácido cianúrico como fase móvel), percebe-se a inversão da ordem de saída das espécies de antimônio. A espécie orgânica (TMSb) passa ter o maior tempo de retenção, diferentemente da metodologia com ácido cianúrico, onde ela é eluída próxima ao volume morto. Para entender a alteração do comportamento cromatográfico do TMSb, realizaram-se ensaios de eluição isocrática com o eluente A, quando se observou que esta espécie fica retida na coluna. Tal comportamento, poderia indicar a formação de um complexo de alta carga negativa entre o TMSb e o eluente A. Os relatos sobre a formação de complexos com o TMSb na literatura especializada são escassos. Miravet e colaboradores (2004) sugerem a formação de complexos entre as espécies trimetiladas de Sb e o tartarato. Lintschinger e colaboradores (1997) afirmam que a retenção do TMSb em colunas de troca aniônica é fortemente influenciada pelo aumento da concentração de fosfato, o que seria um indicativo da ocorrência de uma reação entre esta espécie orgânica de Sb e o fosfato. Isto posto, o que provavelmente altera o comportamento cromatográfico do TMSb é a presença do fosfato na fase móvel.

A seqüência de eluição também indica a existência de complexos entre as espécies inorgânicas de Sb e a fase móvel. A realização de ensaio isocrático com eluente B mostrou que não há formação de complexo entre Sb(III) e o eluente B, visto que a espécie trivalente ficou retida na coluna. Este resultado indica que as duas espécies inorgânicas de Sb formam complexos de carga negativa com eluente A. Ambos complexos formados têm interação com a resina da coluna, mais especificamente com os seus respectivos grupos funcionais, visto que eles não são eluídos no volume morto. Como o tempo de retenção da espécie pentavalente é menor que o da espécie trivalente, o complexo entre Sb(III) e o eluente A apresenta uma carga negativa maior que o complexo Sb(V) com o eluente A. Viñas e colaboradores (2006) destacam que os complexos formados entre Sb(III)-EDTA tem uma interação maior que os complexos de Sb(III)-EDTA-KHP (eluente A). Tal observação sugere que a presença de outro ligante, neste caso o KHP, pode potencialmente diminuir o tempo de retenção do Sb(III), assim como, estreitar o seu respectivo sinal.

A adaptação desta metodologia consistiu basicamente na otimização do programa de eluição. Foram testados 4 programas de eluição diferentes, cada um com 4 etapas. As duas primeiras etapas estavam relacionadas com a completa eluição do Sb(V) e o início da eluição do Sb(III). Na terceira etapa ocorria o final da eluição do Sb(III) e a eluição completa do TMSb. A quarta etapa consistia no tempo necessário para re-equilibrar a coluna para uma nova separação cromatográfica.

Experimentalmente, determina-se o fator de retenção em função do tempo morto e de retenção. O ajuste das condições de separação da metodologia adaptada levou em conta a obtenção de valores de k (fator de retenção) significativamente diferentes para cada espécie, de forma que não ocorresse interposição entre os picos de cada espécie no cromatograma. No entanto, esta diferença entre os valores do fator de retenção não deveria ser tão grande, pois neste caso o tempo de separação cromatográfica seria demasiadamente longo (Tabela 26).

Tabela 26: Fator de retenção (k) das espécies de antimônio nos diferentes programas de eluição.

Programa de Eluição	k [Sb(V)]	k [Sb(III)]	k [TMSb]
1	0,3	2,9	9,1
2	0,4	2,9	7,9
3	0,4	3,1	7,4
4	0,4	3,1	9,6

O primeiro programa de eluição foi descartado devido ao aspecto do sinal relativo à espécie orgânica TMSb, que formava um pico duplo. No terceiro programa de eluição, após algumas separações consecutivas, o sinal relativo ao Sb(V) apresentava uma cauda acentuada. Já no quarto programa de eluição, o fator de retenção do TMSb era muito grande (9,6), o que acarretava em um tempo total de análise mais longo. Pelos motivos acima expostos, optou-se pelo segundo programa de eluição, o qual apresenta fatores de retenção satisfatórios. Um cromatograma típico de urina fortificada, contendo as três espécies em questão, está apresentado na Figura 15-a.

A separação das três espécies de antimônio foi obtida com sucesso pelo método B de IC-ICPMS. Entretanto a separação entre os constituintes da droga e ao Sb(V) não foi satisfatória. Os fatores de retenção (k) relativos ao Sb(V) e à droga (0,4 e 0,5; respectivamente), por serem muito próximos, provocaram a interposição dos seus respectivos sinais, sendo que o formato do pico relativo à droga apresentava um maior alargamento, e a sua respectiva eluição iniciava-se no volume morto, porém o sinal máximo do pico foi obtido após o tempo de retenção do Cs¹³³, marcador do volume morto (Figura 15-b). Por outro lado, o pico relativo ao Sb(V) era mais estreito, e sua eluição começava após o volume morto. A separação da droga e do Sb(V) não foi possível, visto que estas espécies apresentaram tempos de retenção ajustados muito próximos, iguais a 14,8 s e 11,5 s, respectivamente.

Não há disponível no mercado materiais de referência certificados com diferentes espécies de antimônio. Utilizou-se amostra de urina fortificada com as espécies de antimônio para avaliar a taxa de recuperação de cada uma das espécies. Em uma amostra de urina de voluntário sadio, adicionaram-se 5 µg L⁻¹ de cada uma das espécies de antimônio. A amostra foi analisada em triplicata por

IC-ICPMS (método B). As taxas de recuperação para as espécies Sb(V), Sb(III) e TMSb foram iguais a $(98,1 \pm 1,1)\%$, $(102,6 \pm 1,4)\%$ e $(104,7 \pm 2,0)\%$.

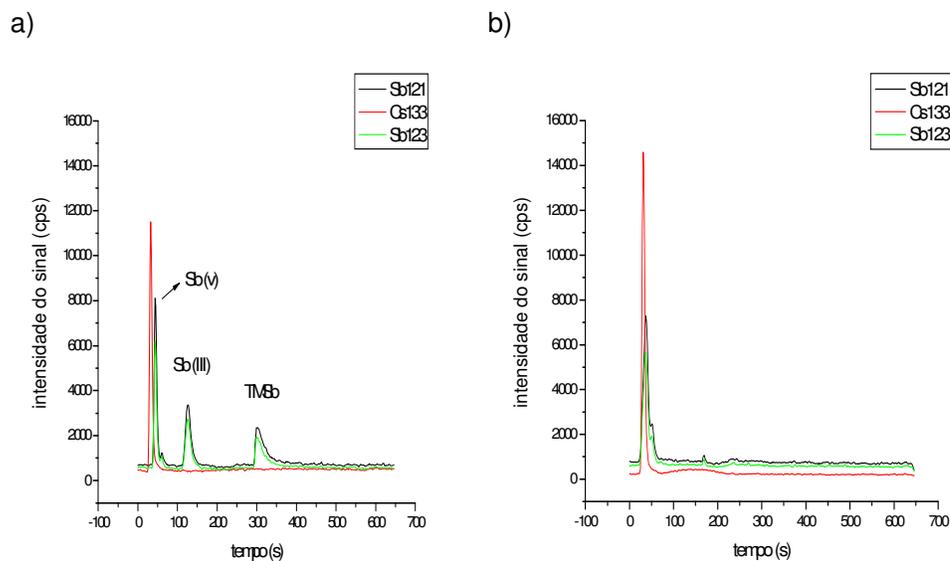


Figura 15: Cromatogramas típicos obtidos nas condições otimizadas do método B. a) urina fortificada com 3 ng de antimônio para cada espécie injetada na coluna; b) antimoniato de meglumina (fator de diluição = 10^7); *sample read delay* 55s.

6.1.4

Características de desempenho dos dois métodos cromatográficos aperfeiçoados

Tempos de retenção, curvas analíticas e limites de detecção para cada espécie de antimônio foram determinados utilizando-se as condições cromatográficas apresentadas anteriormente para os métodos A e B (vide Tabela 20 e Tabela 21). Utilizou-se a mesma metodologia de validação parcial para os dois métodos.

O tempo de retenção ajustado (t_r') para cada espécie apresentou repetitividade satisfatória, avaliada pela determinação do desvio padrão relativo (DPR) de 6 injeções da solução aquosa (alça de 100 μL) com 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de antimônio e 6 injeções de urina fortificada contendo a mesma concentração de Sb que na solução aquosa. Desvios padrão relativos inferiores a 5% foram obtidos na quantificação das áreas dos dois picos cromatográficos correspondentes (método A). Obteve-se uma relação linear robusta entre a concentração de cada espécie de antimônio e a área quantificada do pico

correspondente com um coeficiente de determinação (R^2) associado superior a 0,99. No método A, curvas analíticas construídas a partir de soluções padrão das espécies Sb(III) e Sb(V) apresentaram ótima linearidade dentro da faixa de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. No método B, curvas analíticas construídas a partir de soluções-padrão das espécies Sb(III), Sb(V) e TMSb apresentaram também ótima linearidade dentro da faixa de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ a $50 \mu\text{g L}^{-1}$. O limite de detecção (LD) das espécies de antimônio foi determinado pela medida de 10 brancos de amostras independentes mensurados um de cada vez, no(s) intervalos do(s) pico(s) correspondente(s), e a equação matemática utilizada para calculá-lo foi: $\text{LD} = 3s_B/S$; onde s_B = desvio padrão do branco e S é a sensibilidade determinada através do coeficiente angular da curva analítica (Tabelas 27 e 28).

Tabela 27: Características analíticas de desempenho da separação cromatográfica de duas espécies de antimônio pelo método A.

Parâmetros de desempenho	Sb(V)	Sb(III)
tr' em solução aquosa (s); n=6	24,4	113
DPR do tr' em solução aquosa (%)	0,42	0,54
DPR da área do pico em solução aquosa (%)	4,88	4,72
tr' em urina fortificada (s); n=6	23,8	121
DPR do tr' em urina fortificada (%)	3,46	1,89
DPR da área do pico em urina fortificada (%)	2,22	4,48
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9999	0,9980
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1 - 100	1 - 100
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) para amostra aquosa*, n=10	0,3	0,6
LD (ng) para amostra aquosa e alça de amostragem de $100 \mu\text{L}$ *	0,03	0,06

* Devido ao fator de diluição (1 + 9), o LD para urina é cerca de 10x maior.

Tabela 28: Características analíticas de desempenho da separação cromatográfica de três espécies de antimônio pelo método B.

Parâmetros de desempenho	Sb(V)	Sb(III)	TMSb
tr' em solução aquosa (s); n=6	11,3	105	282
DPR do tr' em solução aquosa (%)	1,76	2,42	1,41
DPR da área do pico em solução aquosa (%)	3,3	2,5	3,9
tr' em urina fortificada (s); n=6	11,5	109,3	294,5
DPR do tr' em urina fortificada (%)	2,9	3,6	1,7
DPR da área do pico em urina fortificada (%)	4,4	3,9	4,8
Coeficiente de determinação (R ²)	0,9907	0,9988	0,9914
Faixa linear (µg L ⁻¹)	1 - 50	1 - 50	1 - 50
LD (µg L ⁻¹); n=10	0,7	0,1	0,7
LD (ng) para amostra aquosa* e alça de amostragem de 100 µL	0,07	0,01	0,07

* Devido ao fator de diluição (1 + 9), o LD para urina é cerca de 10x maior

6.2.

Análise de antimoniato de meglumina (Glucantime®)

6.2.1.

Quantificação das espécies inorgânicas de antimônio

Embora informada na bula desta droga, a verificação da concentração de antimônio total no antimoniato de meglumina (Glucantime®) é importante, pois o uso clínico eficaz e seguro dependem dela. O conhecimento da concentração de Sb(III) é outro parâmetro de relevância. Encontram-se diversos relatos na literatura especializada sobre a existência da espécie Sb(III) em compostos antimoniais pentavalentes. Apesar de não existir um protocolo de controle de qualidade padronizado para o antimoniato de meglumina, considera-se a espécie trivalente como um contaminante desta droga, visto que o antimônio trivalente tem um efeito tóxico mais acentuado que o pentavalente.

O modo de ação dos compostos antimoniais pentavalentes ainda não foi esclarecido. Contudo, desde a década de 40 já havia a sugestão da conversão metabólica *in vivo* do Sb(V) ao Sb(III) (Goodwin e Page, 1943; *apud* Sereno *et al.*, 2001). Existem indícios de que entre as espécies de antimônio a que apresenta maior efeito tóxico contra diferentes espécies de *leishmania* é a espécie inorgânica trivalente. Sereno e colaboradores (1997) mostraram que tartarato de antimônio e

potássio, que contém Sb(III), era mais tóxico do que o antimônio pentavalente, Sb(V), para diferentes espécies de *Leishmania*. Sendo assim, a transformação metabólica do Sb(V) a Sb(III) poderia ser o processo responsável pela atividade terapêutica desta droga (Serenio e Lemesre, 1997, *apud*, Rath *et al*, 2003).

A determinação das espécies de antimônio inicialmente presentes no fármaco possibilita o conhecimento de quais espécies são detectadas em fluidos biológicos em função de transformações metabólicas. Isto é, para entender o metabolismo do antimoníato de meglumina no corpo humano faz-se necessário determinar se a porcentagem de Sb(III) encontrada nos fluidos biológicos é proveniente da conversão *in vivo*, ou do próprio medicamento. Frézard e colaboradores (2000) ressaltam ainda a importância de tais informações para a análise farmacológica e o estabelecimento de um esquema terapêutico eficaz.

De acordo com o fabricante do Glucantime® (antimoníato de meglumina, Aventis Farma Ltda., São Paulo, Brasil), cada ampola de 5 mL deste fármaco contém 2,125 g de antimoníato de meglumina (405 mg mL^{-1}), o que corresponde a uma concentração de Sb(V) igual a 81 mg mL^{-1} . A realização da análise de três lotes distintos de Glucantime® mostrou que a concentração de Sb(III), determinada por HG-ICPMS, variou de 3,2 a 3,4 mg mL^{-1} , o que representa um percentual desta espécie em relação ao Sb-total de 3,5% a 3,9%. Estes resultados estão de acordo com dados publicados anteriormente (Tabela 29). Não pode ser excluída a possibilidade que a redução com NaBH_4 tenha contribuído para a formação, embora em pequenas quantidades, de Sb(III) a partir do Sb(V) da droga (vide sub-capítulo 4.2.3, página 83).

Tabela 29: Concentração (em mg mL⁻¹) de Sb(III) e Sb-total em antimoniato de meglumina (Glucantime®, Aventis Farma Ltda., São Paulo, Brasil)

Lote/referência	[Sb-total]	[Sb(III)]	[Sb(III)] / [Sb - total] (%)
502720 (este trabalho)	90,1 ⁽¹⁾	3,2 ⁽²⁾	3,5
505036	85,0	3,2	3,8
502990	87,6	3,4	3,9
Mortari, 2001	92,0 ⁽¹⁾	1,8 ⁽²⁾	2,0
idem	91,0	1,7	1,9
idem	91,3	1,7	1,9
Rath <i>et al.</i> , 1997	99,5 ⁽³⁾	5,6 ⁽⁴⁾	5,6
idem	93,3	9,8	10,9
idem	91,9	5,2	5,7
Idem	85,9	5,7	6,6
Trivelin <i>et al.</i> , 2006	89 a 110 ⁽¹⁾	> 10 ⁽⁵⁾	n.i

(1)ICP-OES; (2)HG-ICPMS; (3)AAS; (4)Espectrofotometria (UV-Vis); (5) Polarografia.

6.2.2.

Comportamento cromatográfico do antimoniato de meglumina

O objetivo do desenvolvimento da metodologia de IC-ICPMS foi aplicá-la ao monitoramento das concentrações das espécies de antimônio em plasma de macacos *Rhesus* e na urina de pacientes tratados com antimoniato de meglumina. Assim sendo, torna-se necessário o estudo do comportamento cromatográfico desta droga, uma vez que ela estará presente em altíssimas concentrações em urina e plasma dos pacientes durante toda a fase de administração da droga, mas também durante os primeiros dias após o seu término. Assim sendo, possíveis interferências da droga na determinação das espécies metabólicas procuradas (Sb^{III}, Sb^V, TMSb^V) devem ser cuidadosamente avaliadas.

Para o estudo foi utilizado, inicialmente, o método A, empregando-se EDTA como eluente (vide Tabela 15, página 92 e Tabela 20, página 98). Para evitar a supersaturação da coluna, visto que a concentração original de antimônio total é de cerca de 85 mg mL⁻¹ (8,5 x 10⁷ µg L⁻¹), a droga foi altamente diluída com água deionizada (fator de diluição: ≥ 10⁶) antes da injeção na coluna. O cromatograma da droga AM em solução aquosa apresentou dois picos característicos, sendo que o primeiro pico, extremamente largo, foi eluído muito próximo ao volume morto. Este perfil cromatográfico indica que a droga consiste em uma mistura de espécies complexas de natureza catiônica ou neutra em solução aquosa com agente

complexante, visto que ela não é retida em coluna de troca aniônica. O tempo de retenção do primeiro pico (55,3 s) foi muito próximo do tempo de retenção do céσιο (53,4 s), utilizado como marcador do tempo morto. Para investigar a origem do segundo pico, adicionou-se $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) em solução aquosa da droga diluída (fator de diluição 10^7). O perfil do cromatograma obtido foi semelhante ao anterior (dois picos nas mesmas posições), sendo que o segundo pico apresentou uma área expressivamente maior. A comparação do tempo de retenção ajustado do segundo pico (24,5 s) com o tempo de retenção ajustado da espécie Sb(V) em solução aquosa (24,4 s) indica que este segundo pico corresponde à espécie Sb(V). A Figura 16 exemplifica o perfil cromatográfico da droga diluída em solução aquosa. Não foi visualizado o pico correspondente de Sb(III). A ausência deste pico deve-se a dois fatores: a alta diluição empregada nas amostras, e a baixa concentração desta espécie trivalente na droga *in natura*.

A análise conjunta dos resultados obtidos por HG-ICPMS e IC-ICPMS indicam que a maior parte da droga é constituída por antimoniato de meglumina (composto antimonial pentavalente), porém há uma fração de Sb(V) e Sb(III) livre, sendo que o teor da espécie pentavalente é muito maior do que o da espécie trivalente.

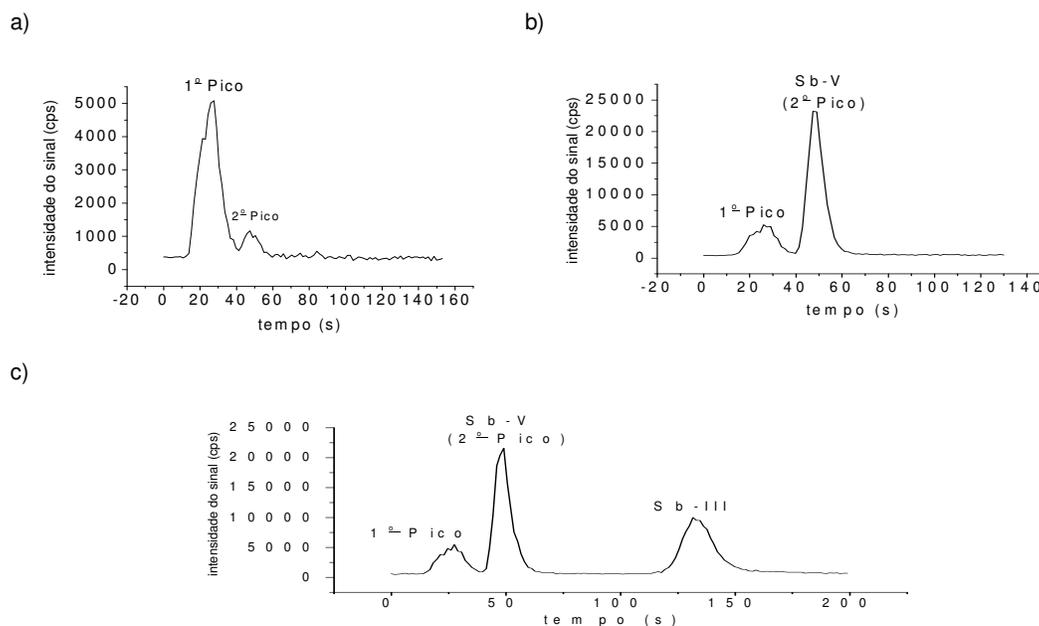


Figura 16: Cromatogramas da droga diluída em solução aquosa (fase móvel: EDTA 4 mmol L^{-1} + MeOH 2,5% v/v, pH 4,7): a) droga diluída (fator 10^7); b) droga diluída (fator 10^6) em solução aquosa, fortificada com $20 \mu\text{g/L}$ de Sb(V); c) droga diluída (fator 10^6) em solução aquosa, fortificada com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de Sb.

6.3.

Avaliação da estabilidade das espécies de antimônio de interesse biológico

A preservação das espécies é de suma importância em estudos de especiação. Por este motivo, a realização das análises de especiação de amostras ambientais e biológicas deve ser efetuada o quanto antes. No caso do presente estudo, o protocolo analítico deve assegurar que as espécies de antimônio quantificadas na urina sejam consequência de transformações metabólicas e não de alterações *a posteriori*. Com o objetivo de determinar o intervalo de tempo no qual a quantificação das espécies de antimônio não seja influenciada por alterações pós-coleta, realizaram-se testes de estabilidade.

Os testes foram realizados por IC-ICPMS nas condições otimizadas. Foram obtidos cromatogramas imediatamente após o preparo da solução (Figura 17), e 4 h (t_1), 8 h (t_2) e 22,6 h (t_3) após o preparo. O intervalo maior de tempo foi considerado suficiente para coleta das amostras no IPEC, e transporte à PUC-Rio para análise de especiação. Entretanto, sempre que possível, pretendia-se analisar as amostras logo depois da chegada no Laboratório de ICPMS.

O fator utilizado para a normalização das áreas foi a razão entre os picos correspondentes ao céσιο, no tempo inicial e no intervalo de tempo em questão, corrigido pelo fator de diluição da amostra de urina. Esta normalização teve como objetivo a correção da sensibilidade do instrumento (Elan 5000) em tempos diferentes. Os resultados experimentais indicaram que, em urina fortificada, as espécies Sb(V) e Sb(III) permaneceram estáveis dentro do intervalo de tempo de pelo menos 22 horas. A pequena variação (desvio padrão relativo menor que 5%), observada nas áreas normalizadas das espécies inorgânicas, encontra-se dentro do limite de confiança da própria metodologia utilizada (Figura 18). Em trabalho realizado anteriormente (Vieira, 2003), uma estabilidade de até 95,6 horas foi verificada para TMSb em urina fortificada.

Sendo assim, as análises de especiação de amostras de urina podem ser realizadas até 22 horas depois da coleta, sem que a integridade e distribuição das três espécies de antimônio sejam afetadas.

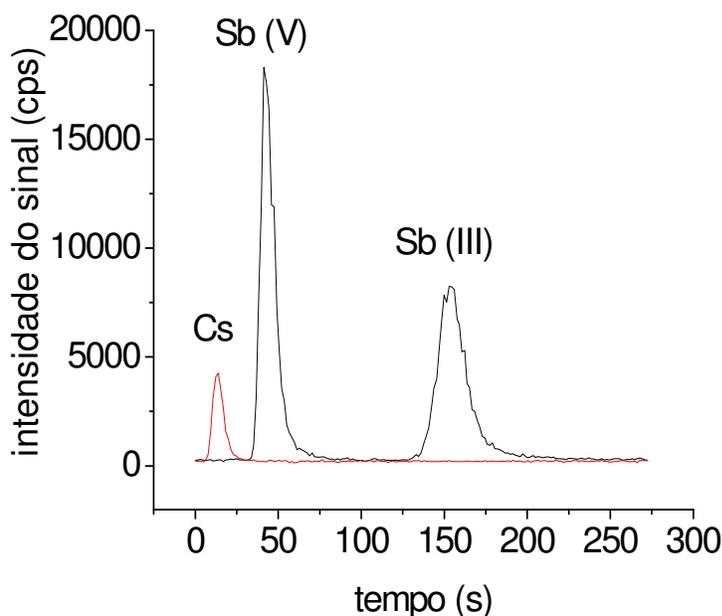


Figura 17: Cromatograma das espécies Sb(III) e Sb(V) em urina. Os sinais correspondem a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cs, e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie inorgânica de antimônio. Condições operacionais: coluna PRP-X100 (Hamilton, EUA); fase móvel de EDTA 4 mmol L^{-1} + MeOH 2,5% v/v, pH 4,7; vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção $100 \mu\text{L}$; ELAN 5000 ; Potência 1300 W ; *sample read delay* 35 s.

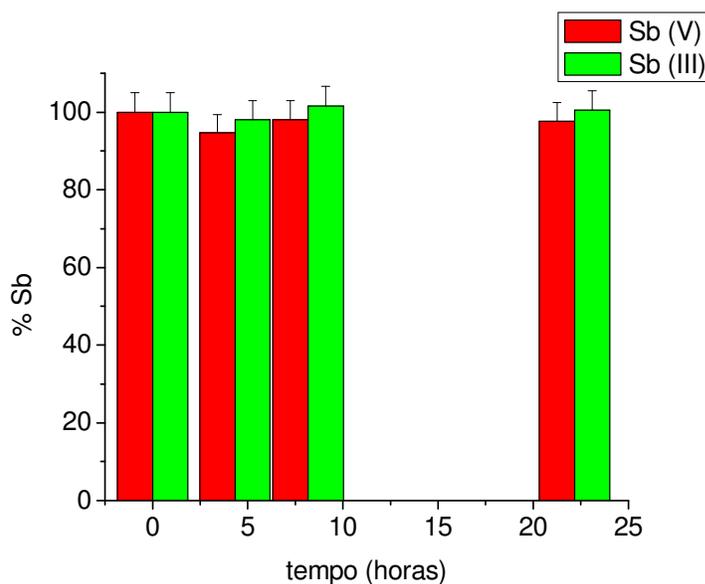


Figura 18: Variação das áreas normalizadas de espécies inorgânicas de antimônio em função do tempo decorrido entre o preparo das soluções (urina fortificada com as espécies inorgânicas de antimônio) e da sua medida.

6.4.

Características de desempenho do método para determinação de Sb-total

6.4.1 Resultados obtidos para materiais certificados

Para avaliação da exatidão e repetitividade da metodologia somente duas matrizes com concentração certificada de antimônio eram disponíveis para este trabalho: urina liofilizada (*Urine Metals Control 2* da Lyphocheck®, Bio-Rad, lote 69402), e uma amostra aquosa de um ensaio de proficiência da Nata. Como já foi mencionado, existe um número muito limitado de materiais de referência certificados (MRC) para o antimônio. Devido à falta de um MRC para Sb em sangue, optou-se por utilizar amostras com concentrações certificadas para outro elemento (Pb). Para melhor entender os motivos que nos levaram a adotar tal alternativa, é necessário fazer uma breve discussão a respeito de interferências sofridas pela técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.

Os dois tipos de interferências existentes, as espectrais e as não espectrais, estão associadas com as características da matriz constituinte da amostra. Os isótopos naturais de antimônio, Sb^{121} e Sb^{123} , não apresentam interferências espectrais significativas nas amostras a serem analisadas neste trabalho. Estas interferências ocorrem quando o isótopo do analito apresenta massa “idêntica” (mesma razão m/z) a de outros isótopos presentes na amostra ou a de espécies poliatômicas formadas no plasma do ICP-MS durante a análise. Tais interferências estão diretamente relacionadas com a resolução de massa do instrumento de ICP-MS; isto é, com a capacidade do equipamento em discriminar isóbaros ou espécies poliatômicas de massas muito próximas. Com exceção do Te^{123} , não há elementos com a mesma massa dos isótopos de antimônio. Como a presença de telúrio, em concentrações relevantes, não é muito provável em amostras biológicas, pode-se considerar que interferências isobáricas não afetam a metodologia de determinação de antimônio total. Além disso, mesmo em amostras contendo telúrio, bastaria determinar o antimônio através de somente um dos seus isótopos, o Sb^{121} , que inclusive é o que apresenta a maior abundância natural (57,21%). Dessa forma, não há a necessidade de utilização de equações matemáticas para corrigir este tipo de interferência. O mesmo raciocínio pode ser

aplicado aos outros tipos de interferências espectrais, visto que não é comum a formação de espécies poliatômicas no plasma que apresentem uma relação massa/carga igual 121 ou 123.

O elemento chumbo (Pb) tem um comportamento igualmente favorável a respeito de interferências espectrais e, devido às similaridades entre os primeiros potenciais de ionização destes elementos (Sb: 8,641 eV, Pb: 7,289 eV), pode ser considerado um análogo razoável para o Sb, pelo menos do ponto de vista da medição em ICPMS.

Pelos motivos expostos, as interferências não espectrais são as que mais podem influenciar na determinação de antimônio em amostras biológicas. Entre outras razões, elas podem ser devidas a variações na energia do plasma (p.ex., devido à alta concentração de sódio, facilmente ionizável, em detrimento do Sb) ou de variações na taxa de transporte do analito para o plasma (p.ex., devido às variações na tensão superficial e na viscosidade das soluções, que influenciam na formação do aerossol). Taylor (2000) destaca que a extensão de interferências não espectrais depende mais da quantidade absoluta do elemento majoritário presente na própria matriz, do que da proporção relativa entre o analito e o elemento majoritário constituinte da matriz. Sendo assim, a diluição de amostras pode reduzir os efeitos de supressão. Ademais, a escolha de padrões internos adequados (p.ex. In¹¹⁵ para determinação de Sb) pode compensar a ocorrência de interferências relacionadas com a constituição da matriz da amostra, o que proporciona um aumento na precisão dos resultados. Ambos (diluição e padrão interno) foram utilizados rotineiramente neste trabalho.

Assim sendo, matrizes idênticas deveriam apresentar um comportamento semelhante quanto às interferências não espectrais. Por esta razão, e outras já mencionadas, resultados obtidos em testes de proficiência para “determinação de chumbo em sangue bovino”, organizado regularmente pelo Instituto Adolfo Lutz (SP), foram considerados como medida razoável para mostrar também a validade dos resultados de antimônio nesta matriz, embora não sendo idêntica, mas semelhante ao sangue humano.

Para avaliar o desempenho da técnica de ICPMS na determinação de antimônio, optou-se, inicialmente, pela participação num programa de teste de proficiência organizado pela National Association of Testing Authorities (*Elements in Water*, sub-programa 78, relatório número 476, 2005). Neste teste,

cada um dos 114 laboratórios participantes recebeu amostras de água fortificadas com antimônio (e com outros 7 elementos). O resultado obtido para a concentração de Sb, em mg L^{-1} , foi $0,24 \pm 0,01$ ($n=3$), estando em perfeita concordância com o valor designado e disponibilizado pela NATA ($0,240 \pm 0,030 \text{ mg L}^{-1}$), mostrando a excelente precisão e exatidão da técnica aqui aplicada.

Para avaliar a exatidão e repetitividade da metodologia para determinação de antimônio em urina, analisou-se três alíquotas distintas da amostra de urina certificada *Urine Metals Control 2* (Lyphocheck®, Bio-Rad, lote 69402). A amostra certificada foi diluída numa proporção de (1+9), também utilizada nas amostras clínicas do presente estudo. O resultado obtido foi igual a $79,3 \pm 0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, com um desvio padrão relativo (CV%) de 0,6%. Este resultado encontra-se dentro da faixa de concentração de antimônio de 57,9 a $86,9 \mu\text{g L}^{-1}$ reportado pelo fabricante. Para a determinação da repetitividade instrumental realizaram-se 10 medidas consecutivas de uma mesma amostra de urina certificada, obtendo-se um desvio padrão relativo igual a 0,5%.

Como já foi mencionado, outro tipo de interferência não espectral está relacionado com o processo de introdução de amostras e ocorre, especialmente, em amostras que apresentam alta viscosidade. Para a avaliação da exatidão e precisão da metodologia para determinação de antimônio total em amostras de alta viscosidade (sangue total e plasma), optou-se pela análise de amostras de sangue bovino, fortificadas “naturalmente” através de uma dieta do animal com teor de chumbo elevado, do programa de ensaios de proficiência do Instituto Adolfo Lutz (32^a). Neste ensaio participaram 24 laboratórios de diferentes Estados brasileiros. Os resultados obtidos da concentração de Pb, em $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$, das três amostras distintas enviadas pelo Instituto foram iguais a: $10,47 \pm 0,72$ (amostra 101); $14,70 \pm 0,14$ (amostra 102) e $64,83 \pm 0,94$ (amostra 103). Todos os resultados estavam de acordo com o valor designado pelo próprio Instituto, em $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ($\pm 10\%$): 10,50; 15,21 e 62,22, respectivamente. Também em outras 15 participações no mesmo programa, realizadas entre 2001 a 2008, os resultados obtidos foram classificados pelo organizador como “bom desempenho”.

Não tivemos nenhuma amostra de referência que mimetizasse a matriz de tecidos de macacos *Rhesus*. Entretanto, o fator de diluição mínimo empregado em tais análises, após decomposição ácida da amostra, era muito alto (cerca de 400x),

o que provavelmente reduz os efeitos de supressão de sinal a níveis insignificantes.

A metodologia utilizada para determinação de antimônio total em amostras de cabelo foi a mesma que o laboratório de ICPMS da PUC-Rio vem empregando rotineiramente e já foi validada em trabalhos anteriores em relação aos principais aspectos, lavagem do cabelo (Fortes, 1999) e determinação multielementar por ICPMS (Miekeley *et al.*, 2001; Carneiro *et al.*, 2002). A mesma metodologia foi aplicada na determinação de Sb em unhas.

6.4.2 Desempenho do procedimento para digestão ácida de amostras clínicas

A metodologia adotada para a decomposição de amostras clínicas foi a digestão ácida com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (ver item 5.3, página 95), já rotineiramente aplicada para análise de amostras de cabelo. Montaser (1998) destaca a eficiência do HNO_3 como agente “ideal” para oxidação de matéria orgânica, especialmente quando empregado em altas temperaturas, pois resulta em menores interferências espectrais em ICPMS quando comparado com outros agentes oxidantes (p.ex., água régia, ácido perclórico, ácido sulfúrico). Entretanto, a presença deste ácido pode afetar a eficiência de transporte do analito, visto que a concentração do ácido influencia a geração e o transporte do aerossol (Bastos, 2005). Altas concentrações de ácido podem também reduzir a temperatura do plasma, alterando assim a estabilidade do próprio plasma e, por conseguinte, influenciar negativamente a exatidão e repetitividade dos resultados analíticos obtidos. A elevada concentração de HNO_3 residual, cerca de 10% v/v nas soluções de decomposição diluídas (1+9), pode levar à formação de moléculas poliatômicas contendo os átomos de N e O. Na análise diária de uma solução de antimônio de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, obtinha-se uma porcentagem de SbO/Sb^+ inferior a 0,5%. Assim sendo, consideramos a formação de óxidos de antimônio, a qual poderia diminuir a intensidade do sinal analítico, completamente negligenciável. Uma das desvantagens da digestão ácida a quente (sem o uso de microondas) consiste no longo tempo (16 horas) para a decomposição de matrizes biológicas (sangue total, plasma, papa de hemácias, tecidos). Quando tempos menores foram empregados, as paredes do tubo, no qual estava contida a amostra, apresentavam uma

quantidade considerável de “gorduras”, o que indicava que a matéria orgânica ainda não tinha sido totalmente decomposta. Esta desvantagem da técnica de digestão ácida a quente foi compensada pela utilização de bloco digestor com capacidade de decompor 66 amostras simultaneamente.

Para investigar o efeito da presença de ácido nítrico na exatidão e repetitividade dos resultados analíticos, foram realizados ensaios de recuperação através da fortificação com Sb (*spiking*) de amostras de urina e sangue total de pacientes, e plasma e papa de hemácias de macacos *Rhesus*. Nos ensaios de recuperação, adicionou-se $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de antimônio nas amostras *in natura*, para posteriormente homogeneizá-las. Após a aplicação do método de decomposição, realizou-se a diluição (1+9) para, então, determinar o teor de Sb por ICPMS em cada uma das amostras fortificadas.

Empregou-se a calibração externa para a determinação quantitativa de antimônio, que consistiu na construção de curvas analíticas com padrão monoelementar de Sb. O padrão interno de In^{115} ou Rh^{103} foi utilizado para correção de possíveis variações do sinal analítico e para verificação contínua do desempenho da metodologia durante o tempo total de análise. Na faixa linear usualmente utilizada ($0,1$ a $50 \mu\text{g L}^{-1}$), obtiveram-se coeficientes de determinação satisfatórios ($R^2 > 0,999$). Cabe ressaltar, que caso tivesse ocorrido necessidade, poder-se-ia utilizar uma faixa linear mais ampla, visto que a técnica de ICPMS proporciona uma faixa dinâmica que ultrapassa várias ordens de grandeza. Os limites de detecção (LD) foram determinados a partir de medida de 10 brancos diferentes e calculados, de forma usual, pela equação $L_D = 3 s_B S^{-1}$ (s_B = desvio padrão do branco de amostra, e S a sensibilidade da curva analítica), levando-se em consideração os respectivos fatores de diluição.

A recuperação de antimônio a partir dos fluidos biológicos investigados variou dentro de uma faixa de 93,6% a 106,1%, considerada aceitável para as finalidades deste estudo.

Os parâmetros de desempenho da metodologia para determinação de antimônio total em amostras biológicas encontram-se resumidos na Tabela 30. Foram utilizadas as condições operacionais resumidas na Tabela 15 (página 92), e a decomposição de fluidos biológicos seguiu as etapas mencionadas na Tabela 17 (página 96).

Tabela 30: Parâmetros de desempenho da metodologia para determinação de Sb e Pb em amostras de referência. Concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$ ou mg L^{-1} quando indicado (*)

Exatidão e limites de confiança	Amostra certificada	Concentração média \pm limite de confiança (a)	Valor designado ou faixa certificada
	Urina (Metals Control 2)	Sb: $79,3 \pm 0,5$	Sb: 57,9 a 86,9
	Água (Amostra N187)	*Sb: $0,24 \pm 0,01$	*Sb: 0,25
	Sangue 1 (Amostra 101)	Pb: $104,7 \pm 7,2$	Pb: 105,0 ($\pm 15\%$)
	Sangue 2 (Amostra 102)	Pb: $147,0 \pm 1,4$	Pb: 152,1 ($\pm 15\%$)
	Sangue 3 (Amostra 103)	Pb: $648,3 \pm 9,4$	Pb: 622,2 ($\pm 15\%$)
Repetitividade instrumental	urina da Bio-Rad	DPR (n=10): 0,5 %	
Recuperação	matriz	Porcentagem	
para amostras fortificadas com $5 \mu\text{g L}^{-1}$	Sangue total (pacientes)	$103,4 \pm 0,6$	
	Urina (pacientes)	$98,6 \pm 0,2$	
	Plasma (pacientes)	$97,7 \pm 0,5$	
	Plasma (Rhesus)	$93,6 \pm 0,4$	
	Papa de hemácias (Rhesus)	$106,1 \pm 0,9$	
Faixa dinâmica	Instrumento	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2
	ELAN 6000	0,1 a 50	$> 0,999$
	ELAN 5000	0,5 a 50	$> 0,999$
Limite de detecção	Instrumento	Matriz	LD
	ELAN 6000	Tecidos	$1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$
	ELAN 6000	Fluidos	$0,5 \mu\text{g L}^{-1}$
	ELAN 5000	Fluidos	$2,0 \mu\text{g L}^{-1}$

(a) intervalo de confiança para $n = 3$ e $p = 0,95$; LD para fluidos baseados num fator de diluição de 10x; para tecidos 20x

6.5. Comportamento de antimônio em macacos Rhesus inoculados com *Leishmania*

O emprego de animais é muito comum em testes de desenvolvimento de novas drogas e em ensaios clínicos para estabelecer novas estratégias terapêuticas de fármacos já existentes para diversas doenças. Entre os animais muito utilizados em tais testes encontra-se o primata *Macaca mulatta*, vulgarmente conhecido como macaco *Rhesus*. Teva e colaboradores (2003, 2005) mostraram que o comportamento clínico de macacos *Rhesus* em relação à infecção de *Leishmania (V.) braziliensis* assemelha-se ao de humanos, e que as respostas terapêuticas ao antimoniatado de meglumina também eram semelhantes. Assim sendo, ensaios clínicos com macacos *Rhesus* são de grande utilidade para estudar o comportamento do antimoniatado de meglumina no corpo humano, visto que a ação deste fármaco nestes primatas deve refletir transformações metabólicas semelhantes que ocorrem em organismos de seres humanos. Ademais, regimes terapêuticos alternativos podem ser testados em macacos *Rhesus* sob condições mais controladas do que em ensaios clínicos com pacientes com Leishmaniose.

No presente estudo, 13 macacos *Rhesus (Macaca mulatta)* foram inoculados com *Leishmania (V.) braziliensis* e submetidos a dois regimes de tratamento diferentes. O primeiro grupo de macacos (n=6) recebeu uma dose diária de Sb(V) de 20 mg kg⁻¹; o segundo (n=6) foi tratado com 5 mg kg⁻¹. 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. Foram coletadas amostras de sangue e pelos de macacos com leishmaniose antes, durante e após o tratamento. As amostras de pelos foram coletadas de 14 em 14 dias até a eutanásia do animal. As amostras de sangue foram coletadas no primeiro dia de tratamento sendo em 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, com um intervalo entre as coletas de 3 dias. Porém, após 61 dias do início do tratamento as amostras eram coletadas semanalmente. Pelos, unhas, urina, pele,

osso, e órgãos, tais como, rins, fígado, pulmão, coração, vesícula biliar e cérebro foram coletados após a eutanásia dos animais.

A eficiência terapêutica dos diferentes tratamentos investigados não era o foco do presente trabalho, pois não era da nossa competência técnica. Por isso, os resultados serão discutidos enfatizando apenas a variação da concentração de antimônio total antes, durante e após o tratamento nas amostras biológicas coletadas, deixando para os médicos participantes deste estudo a interpretação clínica e farmacológica.

6.5.1.

Cinética de excreção de antimônio total em plasma e papa de hemácias após aplicação de dose única de antimoniato de meglumina no primeiro dia

As curvas de absorção/eliminação de antimônio foram construídas a partir dos resultados da determinação da concentração total em amostras de plasma e papa de hemácia coletadas antes e após (2, 6, 12 e 24 horas) a uma única administração intramuscular de AM (no dia 1), de uma série de 21 aplicações (dias).

Observaram-se perfis semelhantes nos dois tipos de tratamento, diferindo-se basicamente no que diz respeito ao nível de concentração alcançado (Figura 19). Como era esperado, os fluidos de macacos tratados com dose alta apresentaram teores de Sb significativamente maiores que os tratados com dose baixa. Uma observação interessante está relacionada com a diferença da concentração de Sb encontrada entre amostras de plasma e papa de hemácias coletadas no mesmo intervalo de tempo. Os níveis de Sb em plasma, neste ensaio de dose única, sempre foram maiores que os encontrados em papas de hemácias, com exceção da coleta relativa a 24 horas, o que parece indicar a pouca afinidade do fármaco (antimoniato de meglumina + Sb^V) para as hemácias, diferentemente que observado para outros elementos (p.ex. chumbo; Calle Guntiñas *et al.*, 2002).

Observaram-se variações na concentração de antimônio em amostras de macacos tratados pelo mesmo regime terapêutico. Em algumas ocasiões, estas flutuações acarretaram em um desvio padrão percentual maior que 30% em amostras coletadas no mesmo intervalo de tempo. De forma geral, amostras de origem biológica apresentam discrepâncias devidas as características próprias do

metabolismo de cada indivíduo. O volume de distribuição do fármaco pode ter sido afetado por diversos fatores, tais como idade, peso e sexo dos macacos participantes deste ensaio.

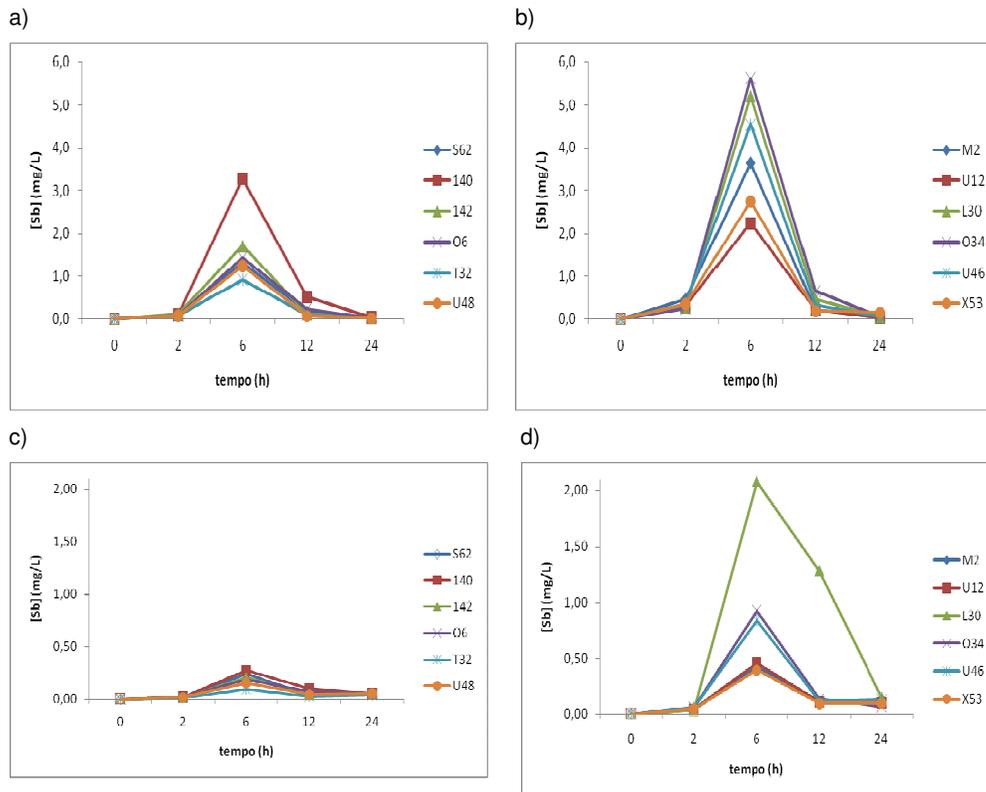


Figura 19: Curva de absorção/eliminação de antimônio em plasma ou hemácias após aplicação de dose única de antimoniato de meglumina em macacos *Rhesus* tratados com dose baixa (a,c) e com dose alta (b,d); plasma (a,b); hemácias (c,d).

Após 2 horas da aplicação da dose única nos tratamentos de dose baixa, as concentrações médias obtidas corresponderam aproximadamente a 48 vezes mais para amostras de plasma e 10 vezes mais para amostras de papa de hemácias, quando comparadas com nível de antimônio detectado antes do início do tratamento nestes mesmos fluidos biológicos. Nas amostras do grupo com tratamento de dose alta, também foram observados variações significativas do teor de Sb em relação à concentração basal, porém os incrementos foram mais elevados, correspondendo a cerca de 130 e 25 vezes maiores para amostras de plasma e papa de hemácias, respectivamente. A concentração de antimônio total atingiu o seu máximo (T_{max}) após 6 horas da aplicação do fármaco nos dois fluidos investigados. Infelizmente, por razões clínicas (*stress* dos macacos) não

foi possível obter-se os valores referentes para 4 horas. Por isso, o T_{max} apresenta uma incerteza de duas horas. Concentrações de Sb de até $3,3 \text{ mg L}^{-1}$ e $5,6 \text{ mg L}^{-1}$ foram encontradas em plasma de macacos tratados com dose alta e baixa, respectivamente. Por outro lado, em papa de hemácias, determinou-se teores de Sb de até $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ em amostras dos grupos de tratamento de dose baixa e alta, respectivamente. Contudo, após 24 horas, a concentração do Sb ainda não havia retornado ao nível basal (Tabela 31).

Tabela 31: Média das concentrações de antimônio (em mg L^{-1}) e T_{max} alcançadas em fluidos durante o ensaio com dose única de AM.

	PLASMA		PAPA DE HEMÁCIAS	
	<i>Dose Baixa</i>	<i>Dose Alta</i>	<i>Dose Baixa</i>	<i>Dose Alta</i>
[Sb] basal ^(a)	$< 2,00 \times 10^{-3}$			
Média da [Sb] após 2 horas da administração da droga ^(b)	$0,10 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,002$	$0,05 \pm 0,005$
Média da [Sb] após 12 horas da administração da droga ^(b)	$0,20 \pm 0,08$	$0,34 \pm 0,19$	$0,06 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,25$
Média da [Sb] após 24 horas da administração da droga ^(b)	$0,02 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,02$
T_{max} (h)	6	6	6	6
Média da [Sb] máxima ^(b)	$1,66 \pm 0,44$	$4,00 \pm 1,36$	$0,19 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,34$
Faixa da [Sb] máxima	0,93 a 3,28	2,24 a 5,62	0,10 a 0,28	0,39 a 2,08

(a) Amostras 10x diluídas, valores de concentração abaixo do limite de detecção; (b) n=6 para cada grupo; p=0,80.

Não foram encontrados resultados de outros estudos sobre a aplicação desta droga (AM) em macacos *Rhesus* para comparação. Valladares e colaboradores (1998) determinaram em plasma de cachorro um T_{max} de 1,4 horas.

Este perfil de excreção sugere que a maior parte do antimônio absorvido pelo organismo do macaco *Rhesus* é rapidamente eliminado, porém ainda permanece no organismo uma parcela do elemento. Sendo assim, a cinética de

excreção do antimônio poderia ser descrita, de forma simplificada, por uma fase de rápida eliminação, seguida por uma fase de lenta excreção, superior a 24 horas (vide item 2.4, página 42). Apesar de ainda não haver um consenso sobre o modelo farmacocinético de antimônio, os resultados experimentais sugerem uma fase rápida de eliminação, seguida por uma fase mais lenta de eliminação, concordando com alguns modelos já existentes, como por exemplo, o proposto por Chulay e colaboradores (1988).

O antimônio no sangue pode estar ligado às células vermelhas (eritrócitos) e/ou às proteínas do plasma. A comparação entre as concentrações de Sb encontradas em plasma e papa de hemácias pode auxiliar na indicação de como este elemento está distribuído no sangue. Esta partição está diretamente relacionada com a forma na qual a droga e seus metabólitos se encontram na corrente sanguínea, assim como, com as afinidades distintas apresentadas por diferentes espécies de antimônio com os constituintes do sangue.

Cabe ressaltar, que na construção dos gráficos desta figura, não foram utilizados os dados da concentração das amostras coletadas antes do tratamento (valores basais), pois os seus respectivos valores encontravam-se abaixo do limite de detecção. A inclinação da curva para o grupo de macacos tratados com dose baixa (única) (Figura 20-a) é superior a 9. Este alto coeficiente angular já era esperado, visto que o teor de Sb encontrado no plasma foi sempre maior o que em papa de hemácias. A inclinação da curva para o grupo tratado com dose alta única (Figura 20-b) é aproximadamente 6,3. Este coeficiente angular menor poderia sugerir que no sangue de macacos tratados com dose alta, há uma maior fração da droga ligada às hemácias. Gebel (1997) relata que os eritrócitos mostram maior afinidade por espécies de Sb(III) não carregadas eletricamente, como por exemplo, Sb(OH)_3 , que por espécies de Sb(V) com carga negativa, como por exemplo, Sb(OH)_6^- . Ao levar em consideração o comportamento químico das espécies inorgânicas de Sb, esta variação da inclinação da curvas da Figura 20 poderia estar relacionada com a velocidade da transformação metabólica da droga. Por outro lado, a correlação encontrada para o grupo de alta dose não foi muito boa e, por isso, os resultados e as suposições decorrentes precisam ainda ser confirmados.

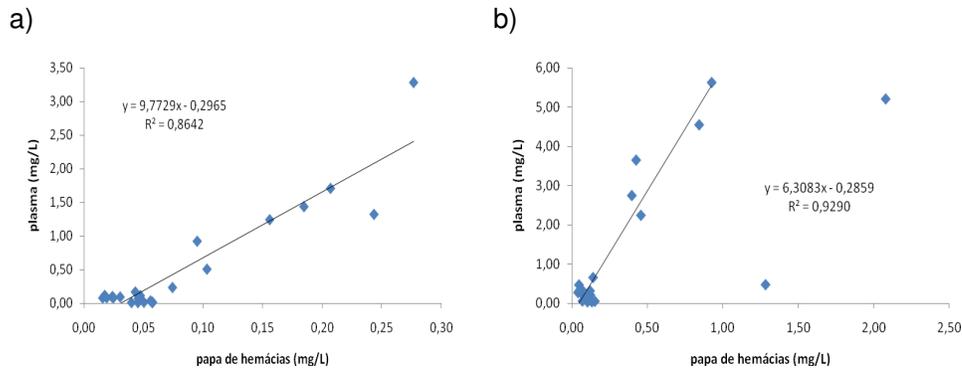


Figura 20: Gráfico de concentração de Sb em plasma versus concentração de Sb em papa de hemácias no ensaio de aplicação única de AM em macacos *Rhesus* tratados com: a) dose baixa (n=24) e b) dose alta (n=22).

A análise da curva de eliminação de Sb após a aplicação de uma única aplicação sugeriu a existência de uma fase rápida de eliminação. Ao considerar esta fase como uma reação de primeira ordem, pode-se determinar o tempo de meia vida biológico do antimônio no plasma através de um gráfico “ $\ln [Sb]$ versus tempo”. O coeficiente angular desta curva é igual a $-k$ (constante de velocidade), e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) pode ser calculado através da equação matemática: $t_{1/2} = (\ln 0,5) / -k$ (Voet e Voet, 1995). A Figura 21 mostra as curvas utilizadas para o cálculo do tempo de meia vida do antimônio, e a Tabela 32 resume os parâmetros cinéticos calculados. Cabe ressaltar que um dos animais de cada grupo apresentou comportamento muito diferente dos demais e, por isso, não foi incluído. O resultado obtido para o tempo de meia vida biológico da fase de rápida eliminação, cerca de 3 horas para os dois regimes terapêuticos, está dentro da faixa (1,44 a 6,88 horas) reportada na literatura para humanos e cães (vide Tabela 5, página 50).

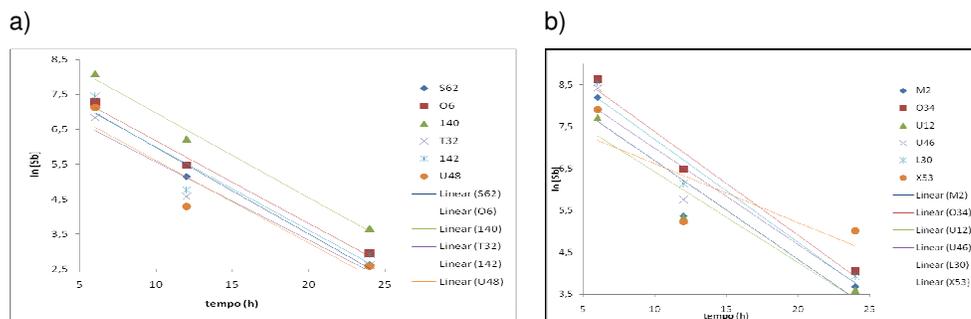


Figura 21: Gráfico $\ln [Sb]$ em plasma versus tempo em macacos *Rhesus* tratados com a) dose baixa de AM e b) dose alta de AM.

Tabela 32: Parâmetros cinéticos obtidos para aplicação de dose única de AM

Parâmetros	Dose Baixa de AM (n=6) ^(a)	Dose Alta de AM (n=6) ^(a)	Dose Alta de AM (n=5) ^(b)
Média de - k ^(c) (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	- 0,2373 ± 0,0062	- 0,2197 ± 0,0322	- 0,2354 ± 0,0110
Média de t _{1/2} (h) ^(d) ^(e)	2,9 ± 0,1	3,3 ± 0,4	3,0 ± 0,1
Faixa de r ² ^(f)	-0,9957 a - 0,9457	-0,9882 a -0,7984	-0,9882 a -0,9444

(a) número total de macacos Rhesus que participaram em cada dos grupos do presente ensaio;

(b) número de macacos tratados com dose alta utilizados para os cálculos dos parâmetros cinéticos;

(c) k é constante da taxa de reação de primeira ordem;

(d) t _{1/2} é o tempo de meia vida da fase de eliminação rápida;

(e) p=0,95;

(f) r² é o coeficiente de determinação da curva ln [Sb] *versus* tempo.

6.5.2.

Cinética de excreção de antimônio total em plasma, papa de hemácias e pelos após aplicação de doses repetidas de antimoniato de meglumina

A Figura 22 mostra a incorporação de antimônio total durante o tratamento (aplicação intramuscular de AM durante 21 dias consecutivos), assim como, a sua subsequente eliminação. Independente do regime terapêutico, os perfis das curvas foram semelhantes, diferenciando-se basicamente no que diz respeito ao nível de Sb alcançado. Cabe ressaltar, que se observou a ocorrência de algumas distorções devido às características próprias de amostras biológicas, conforme explicado anteriormente.

O aumento contínuo das concentrações de Sb em amostras de plasma e hemácias durante o tratamento sugere que houve bioacumulação do elemento (droga) no organismo do primata. Após o final do tratamento com dose baixa, as concentrações máximas obtidas, em média, corresponderam aproximadamente a 19 vezes mais para amostras de plasma e 93 vezes mais para amostras de papa de hemácias, quando comparadas com o nível de antimônio detectado antes do início do tratamento nestes mesmos fluidos biológicos. A variação do teor de Sb em relação à concentração basal encontrada ao final do tratamento com dose alta foi

ainda mais elevada, pois as concentrações máximas obtidas, em média, corresponderam aproximadamente a 56 vezes mais para amostras de plasma e 151 vezes mais para amostras de papa de hemácias (Tabela 33).

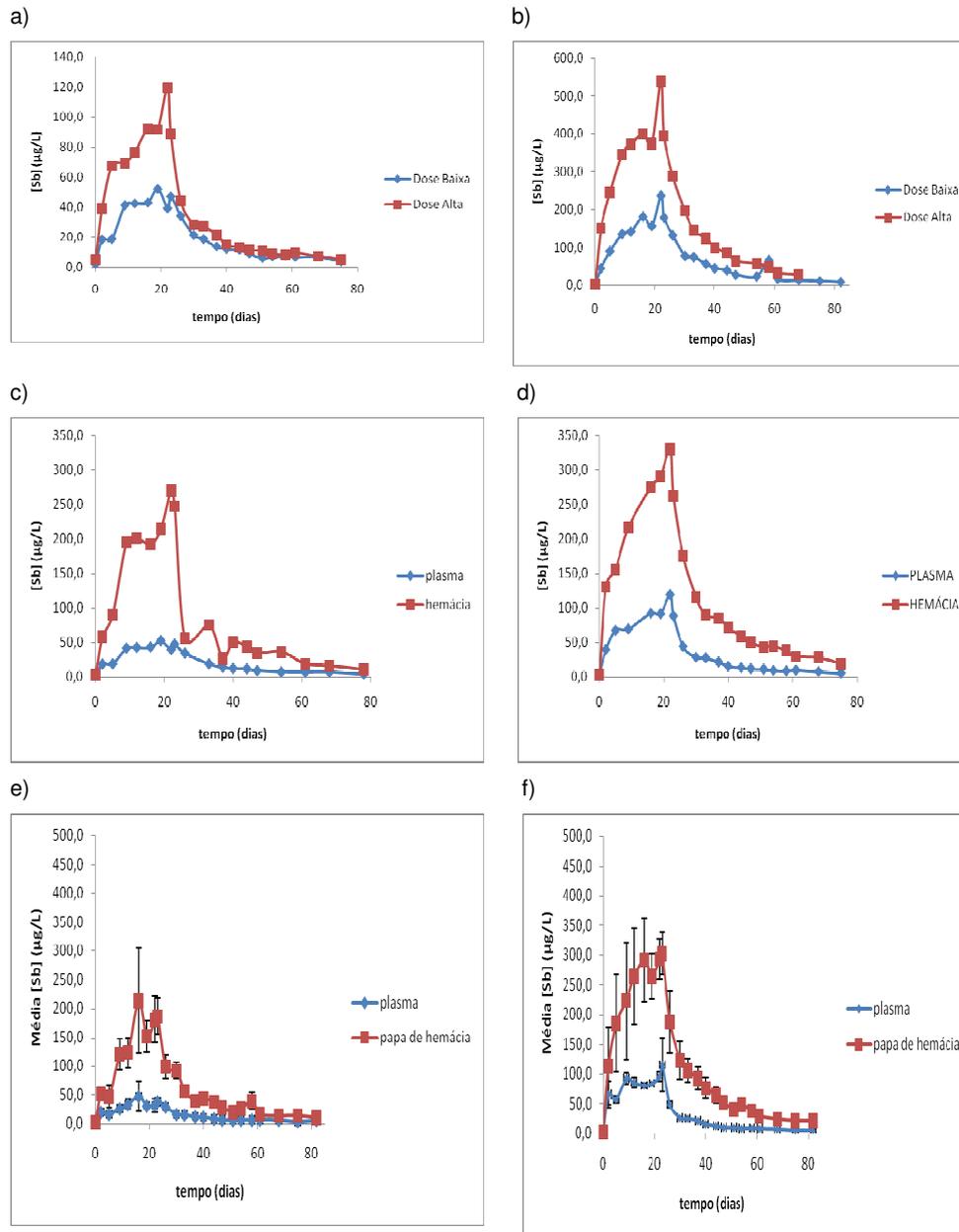


Figura 22: Variações na concentração de Sb em amostras de plasma e hemácias com o tempo: a) em amostras de plasma coletadas de macacos distintos tratados por dose baixa e dose alta de AM; b) em amostras de papa de hemácias coletadas de macacos distintos tratados por dose baixa e dose alta de AM; c) em amostras de plasma e papa de hemácias coletadas de um mesmo macaco tratado por dose baixa de AM; d) em amostras de plasma e papa de hemácias coletadas de um mesmo macaco tratado por dose alta de AM; e) em amostras de plasma e papa de hemácias do grupo de macacos tratado por dose baixa de AM; f) em amostras de plasma e papa de hemácias do grupo de macacos tratado por dose alta de AM.

Tabela 33: Variação das concentrações médias de Sb ($\mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de fluidos biológicos de macacos *Rhesus* tratados com antimoniato de meglumina (AM).

Período do tratamento	Tempo (d)	PLASMA		PAPA DE HEMÁCIAS	
		Dose Baixa ^(b)	Dose Alta ^(b)	Dose Baixa ^(b)	Dose Alta ^(b)
Antes	0	< 2,00 ^(a)	< 2,00 ^(a)	< 2,00 ^(a)	< 2,00 ^(a)
	5	16,1 ± 1,6	56,8 ± 5,5	46,5 ± 19,6	184,9 ± 64,4
Durante	9	25,5 ± 6,3	92,4 ± 9,8	120,5 ± 28,2	223,0 ± 81,8
	19	30,4 ± 1,8	83,5 ± 3,0	151,0 ± 27,0	264,0 ± 38,1
	22	31,4 ± 11,8	95,7 ± 8,4	180 ± 40,4	293,0 ± 33,5
	23	38,1 ± 7,1	115,1 ± 45,8	186,6 ± 30,9	302,0 ± 35,8
Depois	51	5,8 ± 0,6	9,7 ± 1,0	20,1 ± 3,3	40,8 ± 10,5
	75	3,5 ± 0,5	5,4 ± 1,0	14,1 ± 1,8	21,3 ± 3,7

(a) Concentração abaixo do limite de detecção; (b) intervalo de confiança para $p = 0,80$

Ao contrário do observado no ensaio de dose única, o nível de Sb encontrado em papa de hemácias foi sempre superior ao determinado no plasma em amostras coletadas no mesmo intervalo de tempo. Esta mudança de comportamento pode estar relacionada com a forma na qual a droga e os seus metabólitos se encontram na corrente sanguínea do primata. A existência de uma maior proporção de Sb(III) em relação ao Sb(V) explicaria a maior concentração de Sb total em papa de hemácias, pois a espécie trivalente apresenta uma maior afinidade por eritrócitos que a espécie pentavalente (vide também item 3.1, página 51). Diferente do ocorrido no ensaio de dose única em relação à curva de [Sb] em plasma *versus* [Sb] em papa de hemácias, não se observa uma diferença significativa entre os coeficientes angulares relativos ao gráfico dos tratamentos de doses baixa e alta. As inclinações próximas destas curvas indicam que a fração do elemento ligada aos eritrócitos é semelhante nos dois tipos de tratamento. A comparação destes comportamentos distintos sugere que nas primeiras 24 horas após a administração da droga, a taxa de produção metabólica de Sb(III) é maior em regimes terapêuticos com dose alta, porém ao longo e ao término do tratamento, a cinética de bio-redução do Sb(V) é similar nos dois tipos de regimes terapêuticos aqui investigados (Figura 23). Esta interpretação seria condizente com observações que tratamentos com doses baixas de AM (Sb^{V} : 5 mg kg^{-1}) mostraram eficácias similares das obtidas com doses altas (Sb^{V} : 20 mg kg^{-1}), pressupondo que Sb(III) seria o agente mais ativo na erradicação dos parasitas. No

item 6.5.5, página 149 serão mostrados resultados sobre a especiação de Sb em amostras de plasma destes macacos, apoiando as hipóteses aqui formuladas. Entretanto, a determinação direta de Sb(III) em amostras de hemácias, recolhidas em diferentes tempos durante e após o tratamento, precisa ainda ser feita na continuação deste trabalho com amostras preservadas para esta finalidade.

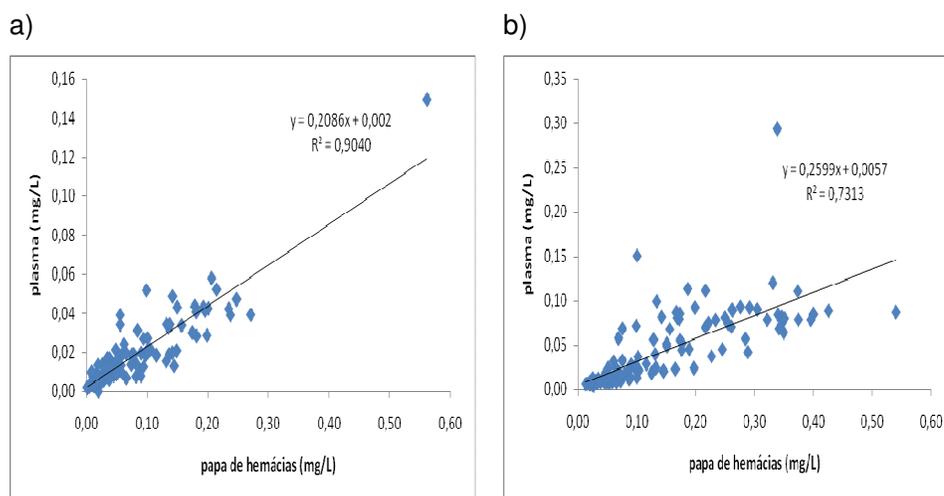


Figura 23: Gráfico de concentração de Sb em plasma versus concentração de Sb em papa de hemácias de amostras coletadas durante e após o tratamento com AM com regimes terapêuticos diferentes: a) de dose baixa (n=123) e b) de dose alta (n=126).

A concentração de antimônio total nos fluidos investigados diminuiu progressivamente após dois dias do final de tratamento. Para investigar a cinética de excreção do Sb, gráficos com a variação concentração de antimônio ao longo do tempo foram construídos a partir do ponto no qual a concentração de antimônio entra em declínio (Figuras 24-a e 24-b). O monitoramento da concentração de antimônio em plasma ao longo de 43 dias após o tratamento sugere uma cinética de eliminação com pelo menos três fases distintas.

A primeira consistiria em uma fase de rápida eliminação caracterizada pela eliminação da maior parte do antimônio do *pool* plasmático, provavelmente, na forma inalterada ou pouco alterada da droga. Esta hipótese é apoiada pelos resultados de especiação, mostrando apenas a presença da droga e de Sb(V) nos cromatogramas (ver Figura 27-a e 28-a, página 151). A segunda e a terceira fases seriam caracterizadas por uma eliminação mais lenta onde ocorre uma transformação metabólica da droga, a bioedução de Sb(V) para Sb(III), e a distribuição do Sb^{III} no corpo em função da sua maior afinidade para ligações

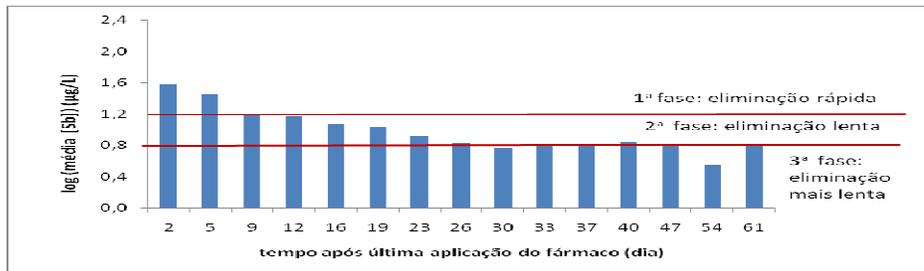
químicas, envolvendo, p.ex. os grupos –SH e –S-S- presentes em muitas proteínas. Poder-se-ia especular que a segunda fase mais lenta de eliminação do Sb é representada pela associação de Sb(III) com as hemácias do sangue e de sua destruição natural e lenta no baço. É interessante observar neste contexto, que entre os 21 tecidos analisados, os do baço apresentaram a terceira maior concentração de Sb (vide sub-capítulo 6.5.4, página 145).

Entre todos os órgãos analisados, a tireóide apresentava de longe a maior concentração de antimônio (maior que $10 \mu\text{g g}^{-1}$, cerca de 60 dias após o final de tratamento, vide Tabela 35, página 147). A eliminação de Sb a partir deste “compartimento” poderia representar uma terceira e mais lenta fase de eliminação. Em humanos, o aumento de Sb em amostras de cabelo e unhas recolhidos mesmo 30 dias após da última administração da droga (vide item 6.6.2, página 163) e efeitos adversos observados em pacientes após término de tratamento também poderiam ser associados a esta fase.

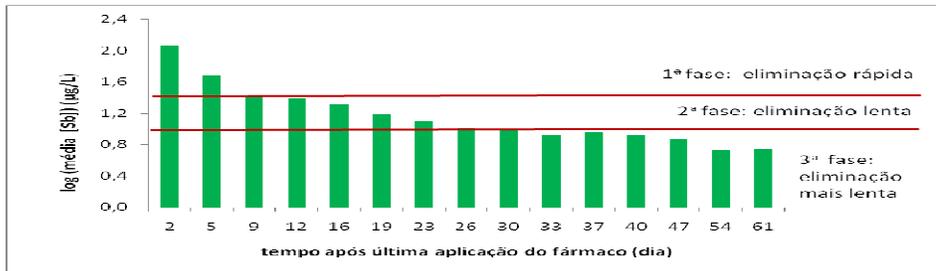
Foi feita uma tentativa de estimar os tempos de meia vida para as duas últimas fases a partir da curva de eliminação de Sb do plasma de regime terapêutico com dose alta. Para isso, foi calculada a equação da reta da fase mais lenta de eliminação (3ª. fase) e a contribuição da sua concentração de Sb subtraído da segunda fase. A Figura 24 mostra os resultados deste cálculo. Os tempos de meia vida em plasma de regime terapêutico de dose alta correspondentes a 2ª e 3ª fases foram iguais a 5 e 37 dias, respectivamente.

Deve-se ressaltar aqui que as hipóteses acima formuladas ainda são especulativas e necessitam comprovações. Entretanto, os resultados sobre a especiação de Sb em plasma (vide item 6.5.5, página 149), a inversão das razões [Sb-plasma] / [Sb-hemácias] em função da duração do tratamento e, finalmente, as concentrações altas de antimônio nas tireóides, parecem apoiar o modelo proposto.

a)



b)



c)

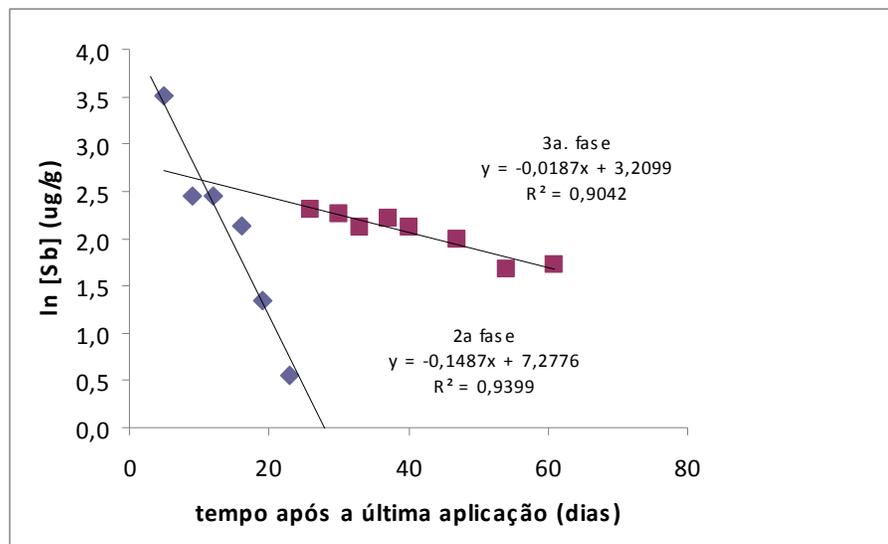


Figura 24: Cinética de eliminação de antimônio: a) fases de eliminação em regime terapêutico com dose baixa de AM; b) fases de eliminação em regime terapêutico com dose alta de AM; c) gráfico de $\ln [Sb]$ em plasma *versus* tempo em regime terapêutico com dose alta da 2ª e 3ª fases de eliminação.

6.5.3. Cinética de excreção de antimônio em pelos

O cabelo é um tecido que apresenta a capacidade de acumular diversos elementos-traço, especialmente aqueles com afinidade para os grupos -SH e -S-S- nas proteínas da matriz (p.ex., As, Se, Sb, Cd, Ag, Hg, Pb). Para comprovar a

viabilidade do emprego de pelo de macaco *Rhesus* como monitor biológico para o antimônio, amostras de pelo dos animais foram analisadas antes, durante e após do tratamento com MA (Figura 25). Concentrações de Sb de até $0,83 \mu\text{g g}^{-1}$ e $9,76 \mu\text{g g}^{-1}$ foram encontradas em pelos de macacos após a conclusão do tratamento com doses baixa e alta, respectivamente. Estas concentrações de antimônio correspondem a 414 e 4880 vezes mais quando comparadas com os níveis basais de antimônio.

Ao contrário do que ocorreu nos fluidos biológicos investigados, a concentração de Sb no pelo aumentou progressivamente mesmo depois do fim do tratamento. Para o grupo tratado com alta dose de MA (20 mg kg^{-1}), a concentração de Sb subiu até o dia 82 (62 dias após término), última coleta antes do sacrifício, enquanto que para os animais tratados com dose baixa (5 mg kg^{-1}), as amostras coletadas no mesmo dia já apresentavam uma diminuição na concentração de Sb (Tabela 34). Isso indica que houve menor bioacumulação (*body burden*) de Sb nos órgãos dos macacos (p.ex., tireóides) neste tipo de tratamento.

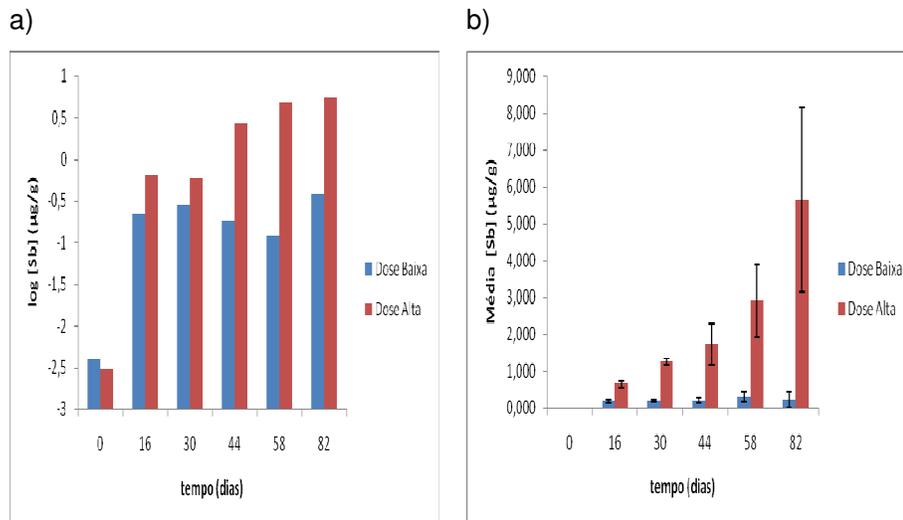


Figura 25: Variação da concentração média de Sb em pelos de macacos Rhesus ($n = 6$) coletadas antes, durante e após o tratamento com baixa e alta dose de AM. a) escala logarítmica e b) escala decimal.

Tabela 34: Variação da concentração média de [Sb] em amostras de pelos de macacos Rhesus coletadas antes, durante e depois do tratamento com AM (n=6 para cada grupo; $p = 0,80$).

Período do tratamento	Tempo (dias)	Dose Baixa ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Dose Alta ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Antes	0 ^(a)	0,002 \pm 0,0004	0,004 \pm 0,001
Durante	16	0,194 \pm 0,043	0,655 \pm 0,095
<i>Término da aplicação de AM no dia 21</i>			
	30	0,205 \pm 0,039	1,260 \pm 0,096
	44	0,214 \pm 0,063	1,737 \pm 0,559
Depois	58	0,304 \pm 0,142	2,911 \pm 0,980
	82	0,220 \pm 0,600	5,637 \pm 2,501

O terceiro “grupo” de amostragem foi constituído por um único macaco Rhesus tratado anteriormente por antimoniato de meglumina e submetido neste presente ensaio ao regime terapêutico de dose alta. Este primata apresentou comportamento semelhante aos dos outros animais tratados com dose alta. A única diferença consistiu nos valores dos níveis basais de Sb, que foram mais elevados: 0,06 mg L⁻¹ e 0,243 mg kg⁻¹ em papa de hemácias e pelos, respectivamente. Como a amostra de plasma foi extraviada, não foi possível determinar o seu respectivo teor de antimônio. No entanto, levando-se em conta a concentração basal das amostras de papa de hemácias e pelos, podemos supor que o nível de Sb no plasma deste macaco também seria maior que o encontrado nos outros animais deste estudo.

A data exata do primeiro tratamento deste macaco não nos foi fornecida. No entanto, fomos informados que o tratamento havia sido realizado a algumas semanas antes do presente ensaio. Isto significa que o tempo de permanência do antimônio residual no corpo de animais ou humanos (vide também 6.6.2, página 163) é alto, o que apoiaria, mais uma vez, a hipótese de uma fase lenta de eliminação, como foi sugerido no sub-capítulo anterior.

6.5.4. Acumulação de antimônio em órgãos de macacos *Rhesus*

Informações sobre a distribuição de antimônio entre os órgãos são escassas. Na grande maioria das vezes, os estudos encontrados na literatura especializada se

limitam a investigar a variação da concentração de Sb no baço e no fígado antes e após a exposição ao elemento (Poon *et al*, 1998; Añez *et al.*, 1994).

No presente ensaio, as concentrações de antimônio foram determinadas em amostras liofilizadas dos seguintes tecidos de macacos *Rhesus*, submetidos aos dois regimes de tratamento anteriormente descritos: glândulas adrenais, baço, bexiga, bulbo, cerebelo, cérebro, cólon, coração, estômago, fígado, gânglios axilares e inguinais, pâncreas, pulmões, rins, timo, tireóide, vesícula, músculos, ossos, dentes e unhas. Vale ressaltar que as concentrações de Sb nestes tecidos refletem a situação de cerca de 60 dias após a última administração da droga, ou seja, o Sb residual ainda não eliminado do corpo/órgão. A Tabela 35 resume as concentrações de antimônio em alguns dos tecidos analisados. Num total de 6 animais de cada grupo, apenas três de cada grupo foram até agora avaliados.

Não se observou uma relação direta entre a dose de Sb ingerida e a respectiva concentração nos tecidos dos animais. Na tireóide foi registrada a maior concentração de antimônio. Concentrações de Sb de até $17,6 \mu\text{g g}^{-1}$ e $12,6 \mu\text{g g}^{-1}$ foram encontradas neste tecido de macacos tratados com dose alta e baixa, respectivamente. Este resultado sugere que a atividade desta glândula pode ser afetada pela exposição ao antimônio. Poon e colaboradores (1998) já tinham relatado alterações histológicas nas tireóides em ratos expostos ao consumo de água contaminada com antimônio.

O fígado, seguido do baço, foram os órgãos que também apresentaram elevadas concentrações de antimônio. Concentrações de Sb de até $3,4 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1,8 \mu\text{g g}^{-1}$ foram encontradas em fígado e baço, respectivamente, de macacos tratados com dose baixa. As concentrações encontradas nos mesmos órgãos de macacos tratados com dose alta foram ainda maiores, de até $5,4 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,6 \mu\text{g g}^{-1}$ em fígado e baço, respectivamente. A determinação da concentração de Sb em fígado de um macaco *Rhesus* que não foi submetido ao tratamento com AM indicou o nível basal de Sb neste órgão ($3,2 \mu\text{g kg}^{-1}$) e permitiu a estimativa de fatores de concentração: 1062 e 1680 para dose baixa e alta, respectivamente. A alta concentração de Sb encontrado nestes órgãos sugere que eles têm participação direta no metabolismo de AM e/ou dos seus produtos de alteração (Sb^{V} , Sb^{III} ,.....).

A acumulação de antimônio em baço e fígado já tinha sido relatada anteriormente. Em ensaio com ratos tratados com AM (Añez *et al*, 1994), as maiores concentrações de antimônio total foram encontradas no baço entre todos

os outros tecidos investigados (pele, rins, coração, cérebro, nódulo linfático, e bexiga). Em experimento *in vivo* com ratos expostos ao consumo de água contaminada com antimônio (Poon *et al*, 1998), o fígado e o baço apresentaram os mais altos níveis de Sb entre todos os tecidos investigados (baço, fígado, rim, cérebro).

Um estudo paralelo realizado com ratos Wistar, onde o autor desta tese participou, corrobora a tendência de ocorrer acumulação de antimônio no fígado (Friedrich, 2008). Neste ensaio, 10 animais foram tratados com AM por via subcutânea por 20 dias consecutivos com a dose de Sb(V) de 300 mg kg⁻¹. Dois ratos da mesma espécie constituíram o grupo de controle e foram tratados somente com o veículo (metabissulfito de potássio e sulfito de sódio) do fármaco de antimoniato de meglumina. Com o término do tratamento, os animais sofreram eutanásia. A concentração média, em peso úmido, dos fígados dos ratos tratados por antimoniato foi igual a 26,9 ± 1,9 µg g⁻¹. O teor de Sb nos fígados dos ratos tratados com AM foi aproximadamente 1310 vezes maior que o teor encontrado no fígado dos ratos do grupo de controle.

Tabela 35: Concentração média e limites de confiança (p = 0,80) de antimônio em tecidos liofilizados de macacos *Rhesus* (n = 3) coletados aproximadamente 60 dias depois do último tratamento com antimoniato de meglumina. Análises em triplicata; (a) dado referente a um único animal, todas as concentrações em µg g⁻¹.

Tecido	Dose Baixa (Faixa)	Dose Alta (Faixa)
Tireóides	16, 4 ± 1,5 (15,3 a 17,6)	10,0 ± 1,9 (7,5 a 12,5)
Fígado	2,9 ± 0,3 (2,5 a 3,4)	3,8 ± 1,4 (1,8 a 5,4)
Unha	2,1 ± 0,9 (2,2 a 4,8)	2,2 ± 1,1 (1,6 a 5,7)
Baço	1,4 ± 0,3 (1,1 a 1,8)	1,9 ± 0,6 (1,1 a 2,6)
Vesícula	1,6 ^(a)	1,7 ± 0,7 (0,7 a 2,3)
Gânglios axilares	0,7 ± 0,1 (0,7 a 0,8)	0,5 ± 0,3 (0,2 a 0,7)
Rim	0,5 ± 0,2 (0,3 a 0,9)	0,5 ± 0,1 (0,3 a 0,6)
Adrenais	0,4 ^(a)	0,4 ± 0,3 (0,1 a 0,9)
Músculos	0,4 ± 0,2 (0,2 a 0,5)	0,6 ± 0,2 (0,3 a 0,9)
Ossos	0,4 ± 0,1 (0,3 a 0,4)	1,0 ± 0,1 (0,9 a 1,1)
Pulmão	0,3 ± 0,1 (0,2 a 0,4)	0,6 ± 0,1 (0,4 a 0,8)

Os dados do presente estudo indicam que os tecidos investigados podem ser divididos em três grupos distintos de acordo com o nível de acumulação de

antimônio. O primeiro grupo é constituído por órgãos e glândulas (tireóide, fígado, baço e vesícula) que apresentam uma alta acumulação de antimônio, numa faixa de concentração de Sb entre $1,6 \mu\text{g g}^{-1}$ e $16,4 \mu\text{g g}^{-1}$. Provavelmente, os integrantes deste grupo estão diretamente envolvidos no metabolismo do antimônio. A severidade dos efeitos toxicológicos do fármaco antimoniatado de meglumina pode estar relacionada à quantidade de antimônio total acumulada nestes órgãos. O segundo grupo é constituído por órgãos e glândulas (rim, glândulas adrenais, músculos, ossos e pulmão) que apresentam uma leve e/ou moderada acumulação de antimônio, numa faixa de concentração de Sb entre $0,7 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 26). Já o terceiro grupo é composto por órgãos e glândulas que não acumulam o antimônio, pelo menos não durante o intervalo de tempo aqui estudado. Os tecidos deste grupo (coração, bexiga, pâncreas, estômago, dente, medula, bulbo, cerebelo, lobos temporal, occipital e frontal do cérebro) apresentaram uma concentração de Sb inferior a $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$. Mesmo os tecidos do terceiro grupo apresentaram um conteúdo residual de antimônio, porque o fármaco é transportado pela corrente sanguínea para todos os órgãos do corpo do macaco. Cabe ressaltar, que a concentração de Sb em plasma e papa de hemácias coletadas no mesmo dia da eutanásia dos animais era significativamente inferior à encontrada nos tecidos. A concentração média analisada nestes fluidos biológicos estava abaixo de $22 \mu\text{g L}^{-1}$.

Como já foi mencionado, o antimônio apresenta uma forte tendência de fazer ligações químicas com o enxofre. A concentração de antimônio superior a $3,0 \mu\text{g g}^{-1}$ em unhas dos macacos confirma esta tendência (semelhante ao pelo), e valida a utilização deste tecido como bioindicador de exposição ao antimônio.

Investigou-se a existência de uma correlação entre as concentrações de antimônio e enxofre nos tecidos investigados de um animal tratado por dose alta de antimoniatado de meglumina. No entanto, não se observou uma correlação ($R^2 = 0,1393$) entre as concentrações destes elementos químicos nos órgãos e glândulas do primata.

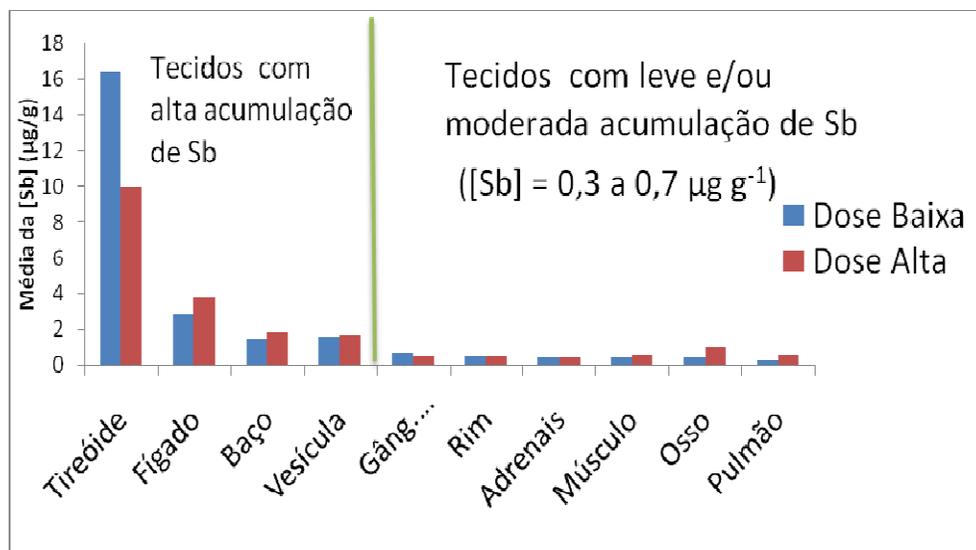


Figura 26: Gráfico de concentração média de Sb em tecidos de macacos Rhesus tratados com antimoniatto de meglumina por regimes terapêuticos de dose baixa e dose alta. As concentrações correspondem aos níveis determinados 60 dias após da última aplicação da droga.

6.5.5.

Produtos de transformação de antimoniatto de meglumina

O objetivo desta parte do trabalho foi a determinação de quais espécies são produtos da transformação do AM, para contribuir na elucidação de processos metabólicos e, eventualmente, ajudar na interpretação da eficácia terapêutica deste fármaco. Para isso, amostras de sangue de macacos *Rhesus*, dos dois grupos de tratamento, foram recolhidas durante a fase de eliminação do antimônio e analisadas por IC-ICPMS. Optou-se pela análise de plasma ao invés de papa de hemácias porque este tipo de amostra é de mais fácil manuseio em separações cromatográficas. O ensaio experimental realizado não permitiu a coleta de amostras de urina dos macacos, as quais apresentariam concentrações bem mais elevadas de AM e dos seus produtos de transformação, comparados às de plasma (Miekeley *et al.*, 2002 e capítulo 6.6.1, página 152). Realizou-se apenas uma interpretação qualitativa dos perfis cromatográficos, pois na época das análises o instrumento utilizado (ELAN 5000) apresentava, infelizmente, uma sensibilidade muito baixa e, com isso, os sinais correspondentes às espécies inorgânicas de antimônio encontravam-se próximos aos limites de quantificação.

A Figura 27 mostra os cromatogramas obtidos em plasma de um animal tratado por dose alta de antimoniatto de meglumina. O primeiro cromatograma

relativo ao plasma coletado após 2 dias do fim do tratamento (Figura 27-a) mostra um pico de Sb(V) com área semelhante à de AM, indicando uma rápida hidrólise do fármaco com formação de "Sb(V) livre". Nas figuras subseqüentes (Figura 27-b a 27-d) observa-se que esta tendência se acentua, com pico da droga diminuindo e o pico relativo ao Sb(V) aumentando. Também já se nota no terceiro dia da fase de eliminação o aparecimento do pico relativo ao Sb(III) e o aumento da proporção deste pico em relação à droga pura ao longo da fase de eliminação. Esta variação confirma a bio-redução do Sb(V) ao Sb(III) em macacos *Rhesus*, semelhantemente como já foi observado em humanos, visto que a produção metabólica da espécie trivalente aumentou após 3, 6 e 10 dias da conclusão do tratamento com AM.

Os perfis dos cromatogramas obtidos de plasma de macaco tratados com dose baixa foram semelhantes (Figura 28). Observam-se simultaneamente um aumento dos sinais correspondentes às espécies inorgânicas de antimônio e uma diminuição dos sinais relativos à droga pura. Este resultado experimental sugere, mais uma vez, que parte da droga é metabolizada, sendo convertida em Sb(V), que por sua vez sofre bio-redução ao Sb(III).

É possível, que devido a pouca resolução dos picos (como consequência da baixa intensidade do analito em relação ao fundo) outros picos possam ser camuflados. Observa-se nas Figuras 27 (c, d) e 28 (d) a indicação de um novo pico com tempo de retenção menor que a droga ($t_R \sim 13$ s), não visível nos cromatogramas correspondentes ao dia 2 e 3 depois da última administração de AM. Este pico não resolvido e até agora não identificado foi também observado por Miekeley *et al.* (2002) em cromatogramas de urina e plasma de pacientes tratados com AM.

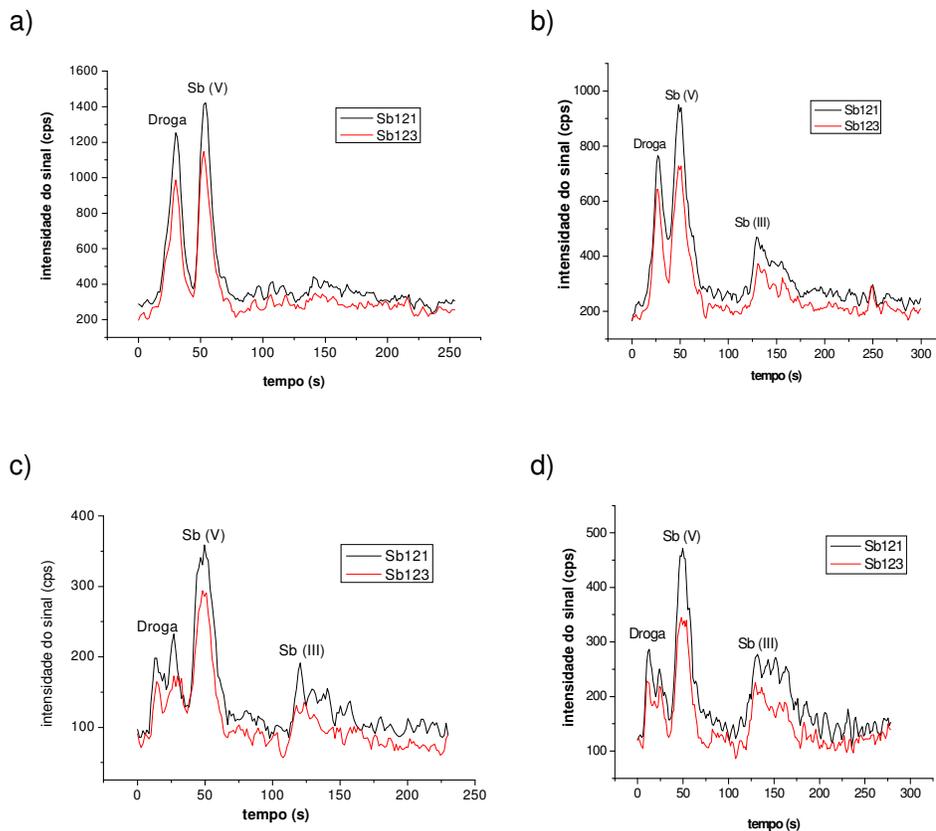


Figura 27: Cromatogramas mostrando diferentes espécies de Sb em plasma de macacos tratados por dose alta (Sb^V : $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) de AM. As amostras foram coletadas após a) 2 ; b) 3; c) 6 e d) 10 dias do fim do tratamento.

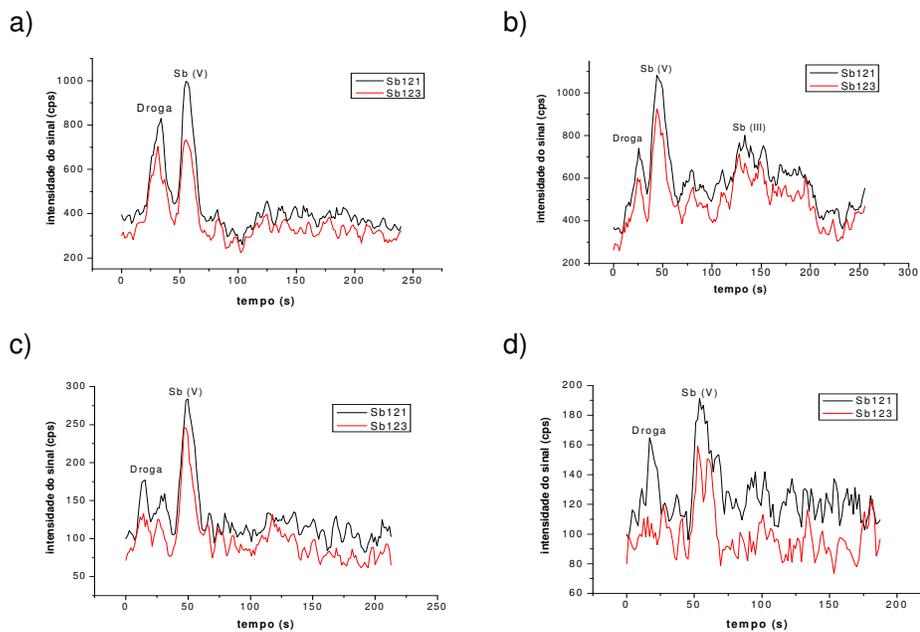


Figura 28: Cromatogramas mostrando diferentes espécies de Sb em plasma de macacos tratados por dose baixa (Sb^V : $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) de antimoniato de meglumina. As amostras foram coletadas após a) 2 ; b) 3; c) 6 e d) 10 dias do fim do tratamento.

6.6. Estudo terapêutico com pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana

6.6.1. Cinética de excreção de antimônio em fluidos biológicos

O objetivo desta parte do trabalho consistiu em investigar a cinética de excreção de antimônio através do monitoramento da concentração deste elemento em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA) coletadas antes, durante e depois do tratamento com AM por diversos regimes terapêuticos (ver item 5.6.2, página 102). Os teores de Sb total foram determinados por ICPMS em amostras de urina, sangue total, plasma, cabelo e unhas. Os resultados referentes às últimas duas matrizes serão apresentados posteriormente.

A concentração de Sb encontrado em amostras clínicas antes do tratamento representa o seu respectivo nível basal, o qual para urina foi igual a $(0,84 \pm 0,13)$ μg de Sb por grama de creatinina ($n=14$). Em relação ao sangue e plasma, determinaram-se os respectivos níveis basais como sendo inferiores a $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$. Não foi possível estabelecer a concentração basal exata destes fluidos, porque a concentração de Sb nas amostras encontrava-se abaixo ou muito próximo do limite de detecção ($0,08 \mu\text{g L}^{-1}$) do instrumento (Elan 5000), lembrando que o fator de diluição mínimo empregado para a medida destas amostras foi igual a 10.

A Tabela 36 mostra o tempo necessário para que a concentração de antimônio volte para o nível basal após a conclusão do tratamento. Este intervalo de tempo é usualmente chamado de *turnover*. Entre os fluidos biológicos investigados, a urina apresentou o maior tempo de retorno ao nível basal, independente do grupo de amostragem. Aparentemente, existe uma relação direta entre a dose diária administrada e o tempo de declínio do conteúdo de Sb no organismo humano, como já foi observado para os macacos *Rhesus*. O intervalo de tempo necessário para que a concentração de antimônio total retorne para o nível encontrado antes do tratamento foi maior para os pacientes submetidos ao tratamento com dose alta de AM.

A concentração de Sb na urina dos três pacientes do grupo de dose alta contínuo não retornou ao nível basal, mesmo 211 a 361 dias após o tratamento.

Também não foi possível determinar o *turnover* em urina do grupo de dose alta em série, apesar do acompanhamento durante 287 dias após a última aplicação de AM.

Também se constata uma relação entre a dose total de AM ingerido e o *turnover* em fluidos biológicos de pacientes submetidos ao tratamento com dose baixa. Em pacientes tratados com um menor número de aplicações (grupo de dose baixa de curta duração) o tempo necessário para retornar à concentração basal foi mais curto do que em pacientes tratados com a mesma dose diária, porém por um maior período (grupos de dose baixa contínuo convencional e de dose baixa em série).

Tabela 36: Intervalo de tempo necessário para retorno da concentração de Sb ao nível basal em fluidos biológicos de pacientes com LTA após o tratamento com AM ($p = 0,80$).

Grupo	Urina Média do Tempo (dias) ^(a)	Sangue total / Plasma Média do Tempo (dias) ^(a)
Dose alta contínuo (n = 3)	> 361 ^(a)	361 ^(b)
Dose alta em série (n= 2)	> 287 ^(a)	287 ± 1
Dose baixa contínuo convencional (n=6)	274 ± 30	168 ± 24
Dose baixa em série (n =3)	250 ± 38	151 ± 28
Dose baixa contínuo de curta duração (n =2)	183 ± 15	100 ± 11

(a) Não foi observado o retorno da concentração ao nível basal para nenhum dos pacientes do grupo.

(b) Valor relativo a um único paciente; não foi observado o retorno da concentração de Sb ao nível basal para os outros dois pacientes.

O intervalo entre as séries de aplicação também influencia o tempo de retorno da concentração de Sb ao nível basal em tratamentos com dose baixa. O *turnover* foi menor em pacientes com tratamento em série do que com o tratamento contínuo convencional.

Cabe lembrar, que entre os três pacientes do grupo de dose baixa em série dois deles foram submetidos a pelo menos uma série de 30 doses. O regime terapêutico do outro integrante desse grupo foi constituído por um menor número

de aplicações em cada série (10 aplicações). Se compararmos o *turnover* em fluidos biológicos relativo especificamente a este último paciente com o valor médio do grupo de dose baixa contínuo tradicional, estabelece-se uma diferença mais acentuada. A concentração em urina e sangue total deste referido paciente levou 211 e 127 dias, respectivamente, para voltar ao teor de antimônio encontrado antes do início do tratamento.

A análise dos dados experimentais sugere que tratamentos com doses substancialmente diferentes conseguem manter uma concentração de antimônio residual na corrente sanguínea por longos períodos de tempo. A dose alta padrão (Sb^V : $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) é 4 vezes maior que a dose baixa em investigação (Sb^V : $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Entretanto, o tempo de retorno da concentração de Sb ao nível basal no sangue não segue esta mesma proporção. O tempo de retorno ao nível basal no sangue do grupo de dose alta contínuo foi aproximadamente 40% maior que o apresentado pelo grupo de dose baixa contínuo convencional.

A concentração máxima de antimônio total em fluidos biológicos foi alcançada durante o tratamento de todos os pacientes, com exceção de um integrante do grupo de dose baixa em série (Tabelas 37 e 38). Cabe destacar, que este paciente foi o único que teve amostras de fluidos biológicos coletadas após um dia da conclusão do tratamento. De forma geral, a primeira coleta na fase de eliminação de antimônio foi realizada de 8 a 12 dias após o término das aplicações de AM.

Tabela 37: Concentração média (máxima) de antimônio alcançada em sangue total e plasma de pacientes com LTA durante o tratamento com antimoniato de meglumina; (a) limite de confiança calculado para $p = 0,80$.

Grupo de dose:	SANGUE TOTAL		PLASMA	
	$\mu\text{g L}^{-1}$ (Faixa)	$[\text{Sb}]_{\text{max}} / [\text{Sb}]_{\text{basal}}$	$\mu\text{g L}^{-1}$ (Faixa)	$[\text{Sb}]_{\text{max}} / [\text{Sb}]_{\text{basal}}$
Alta contínuo	419 ± 46 (392 a 465)	520	344 ± 18 (321 a 386)	430
Alta em série	370 ± 32 (345 a 395)	460	329 ± 29 (306 a 352)	410
Baixa contínuo convencional	298 ± 18 (275 a 322)	370	265 ± 20 (253 a 289)	330
Baixa em série	237 ± 67 (154 a 300)	300	207 ± 53 (143 a 244)	250
Baixa contínuo de curta duração	97 ± 15 (87 a 107)	110	71 ± 22 (61 a 81)	80

Tabela 38: Concentração média (máxima) de antimônio alcançada em urina de pacientes com LTA durante o tratamento com antimoniato de meglumina; (a) limite de confiança calculado para $p = 0,80$.

Grupo de dose:	URINA	
	$\text{mg Sb g}^{-1} \text{ creat}^{(a)}$ (Faixa)	$[\text{Sb}]_{\text{max}} / [\text{Sb}]_{\text{basal}}$
Alta contínuo	82,1 ± 7,0 (79 a 91)	97.000
Alta em série	66,5 ± 13,4 (56 a 77)	79.000
Baixa contínuo convencional	44,0 ± 6,0 (41 a 50)	52.000
Baixa em série	25,7 ± 12,8 (8,7 a 28,8)	30.000
Baixa contínuo de curta duração	4,6 ± 2,1 (3,6 a 5,6)	5.400

Vale destacar, que diversos fatores podem dificultar o estabelecimento de um padrão comum para os pacientes pertencentes ao mesmo grupo de amostragem (tratamento). Como já foi mencionado anteriormente, o volume de distribuição da droga pode ser afetada pela idade, peso e sexo dos pacientes. Ademais, os dias de coleta não foram rigorosamente os mesmos para todos os pacientes, pois eles tinham que ser marcados de acordo com as disponibilidades do ambulatório de

LTA do IPEC. O intervalo de tempo entre a aplicação da droga e a coleta da amostra clínica também afeta diretamente a concentração de antimônio encontrada no fluido biológico.

A variação da concentração máxima de Sb em relação ao seu respectivo nível basal foi significativamente maior em urina do que em fluidos biológicos. Esta constatação mostra que a maior fração da droga é excretada pela urina, provavelmente na sua forma original (AM). A urina já tinha sido indicada anteriormente como a principal via de excreção de Sb (Valladares *et al*, 1996; Peña *et al*, 1990).

Observa-se uma relação entre a dose diária de administração e o teor máximo de Sb alcançado, visto que pacientes submetidos à dose alta apresentaram maiores concentrações de Sb total nos fluidos biológicos do que os tratados com dose baixa. A variação entre a concentração máxima atingida no plasma/sangue total em relação ao nível basal foi maior nos grupos de dose alta do que a determinada nos grupos de dose baixa, mas com uma ordem de grandeza inferior à mesma relação estabelecida em urina. Esta diferença de comportamento entre sangue total/plasma e urina indica que independente da dose ingerida diariamente, somente uma pequena fração do antimônio permanece no organismo e estará disponível para a sua ação terapêutica.

Já mencionamos anteriormente que a razão entre a dose alta padrão e a dose baixa em investigação é igual a 4. Entretanto, a quantidade de Sb total que permaneceu na corrente sanguínea em tratamentos com dose alta contínua ou em série não foi 4 vezes maior que as encontradas em tratamentos com dose baixa contínua convencional ou em série. Como os regimes terapêuticos com doses alta e baixa apresentam índices de cura similares (ver item 2.3.2, página 38), a concentração de Sb necessária para destruir o parasita provavelmente é também mantida em regimes com dose baixa, com a vantagem de apresentar menos efeitos adversos durante o tratamento com AM.

Em relação aos pacientes submetidos a regimes terapêuticos com dose baixa, constata-se uma relação entre o número de doses administradas e a concentração máxima de antimônio alcançada em fluidos biológicos. A variação do teor máximo em relação ao nível basal foi superior em pacientes tratados com um menor número de aplicações. Ao comparar os grupos de dose baixa contínuo convencional e de dose baixa em séries, percebe-se que o regime terapêutico

contínuo resulta em uma maior concentração. Estas duas últimas observações sugerem que as doses de AM são acumulativas.

Se novamente analisarmos, separadamente, o paciente do grupo de dose baixa submetido a 3 séries de 10 doses cada, a acumulação de AM fica ainda mais evidente tanto em urina, como em sangue total e plasma. Por exemplo, a concentração máxima encontrada no sangue total deste paciente foi igual a $154 \mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, aproximadamente 40% menor que o valor médio estabelecido para o grupo de dose alta contínuo tradicional (caracterizado por um mesmo número de doses, porém aplicadas em dias consecutivos).

As Figuras 29 a 33 mostram a cinética de excreção de antimônio total em fluidos biológicos coletados antes, durante e após o tratamento de pacientes com LTA tratados com AM por diferentes regimes terapêuticos. As curvas de tratamento em série evidenciam as interrupções do tratamento, através da queda abrupta da concentração de Sb durante as séries. Entretanto, observa-se um perfil semelhante das curvas de todos os grupos de amostragem, caracterizado por declínio exponencial da concentração de Sb logo após a conclusão do tratamento, seguido por uma fase de eliminação mais lenta de Sb. Comparando-se as curvas relativas aos fluidos biológicos, observa-se uma queda mais acentuada em relação à urina do que em relação ao plasma e sangue total.

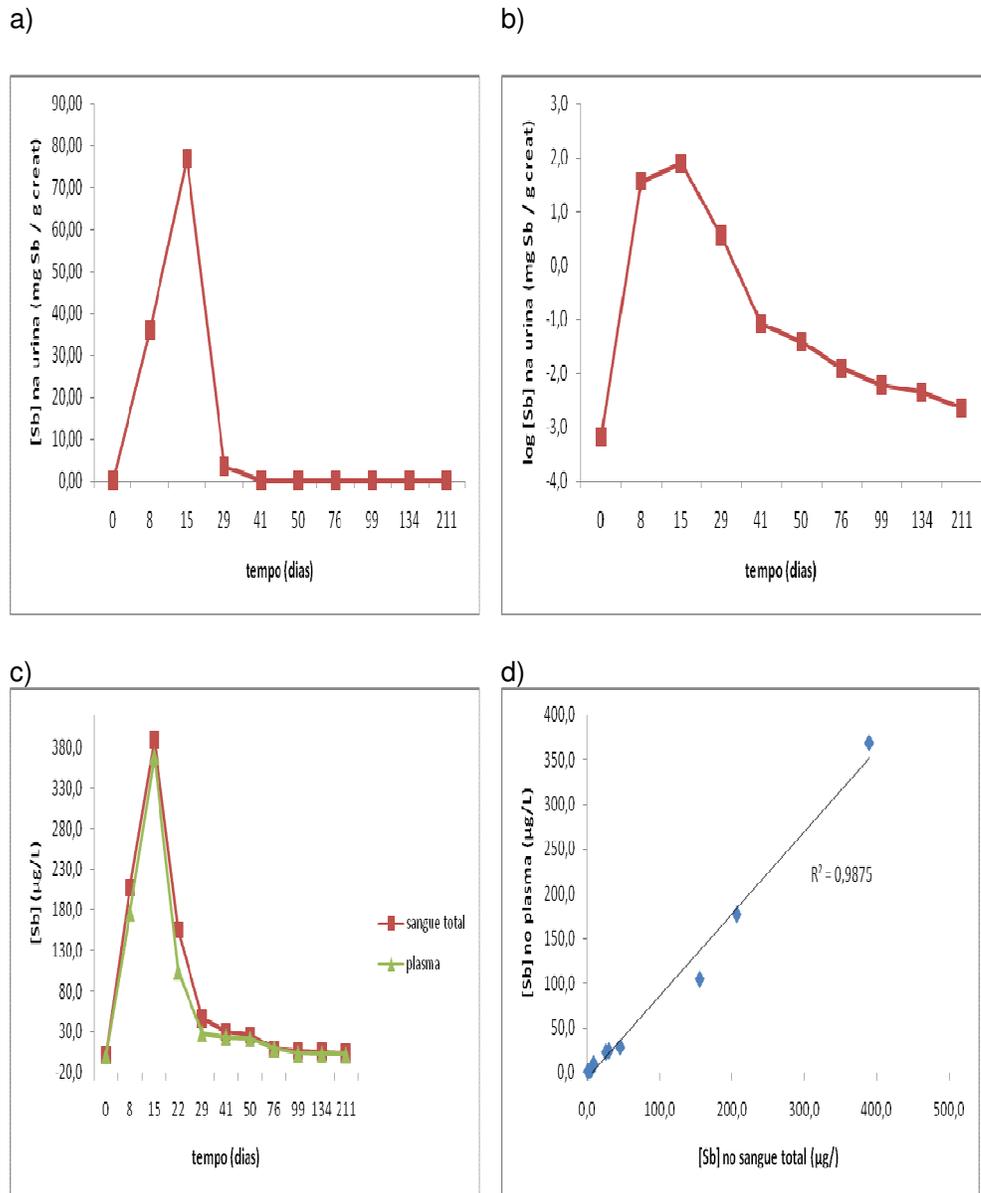


Figura 29: Curva de eliminação de Sb antes, durante e depois do tratamento com antimoniato de meglumina de integrante do grupo de dose alta contínuo. Paciente com LTA; feminino; 26 anos; 64 kg; tratamento contínuo com 20 doses cada uma de 1215 mg Sb(V) / dia. a) em urina; b) em urina com escala logarítmica; c) em sangue total e plasma; d) correlação das concentrações de Sb no plasma *versus* sangue total.

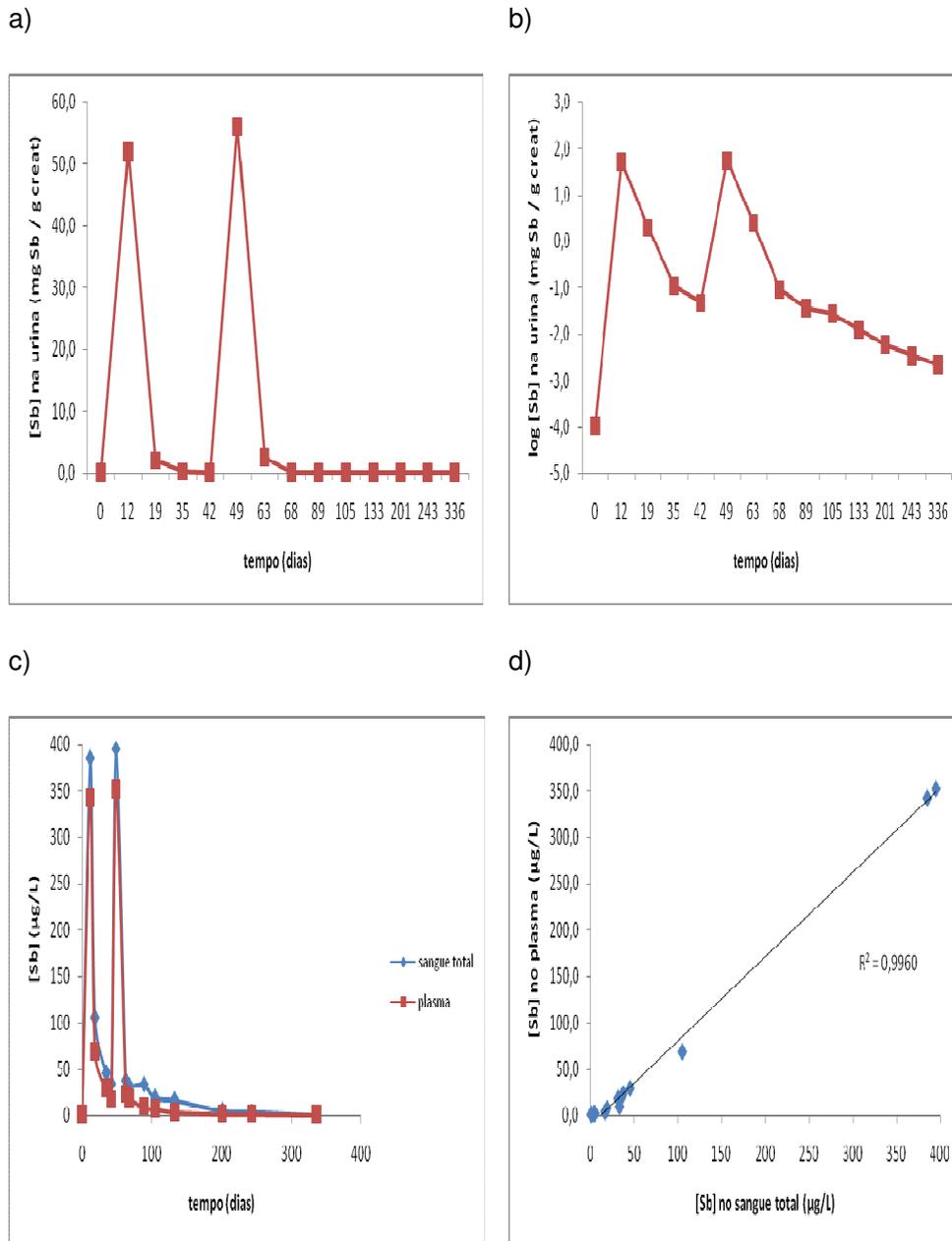


Figura 30: Curva de eliminação de Sb antes, durante e depois do tratamento com antimoniato de meglumina de integrante do grupo de dose alta em série. Paciente com LTA; masculino; 57 anos; 70 kg; tratamento em 2 séries em 12 e 8 doses, respectivamente, cada uma de 1215 mg de Sb(V) / dia com intervalo entre as séries de 31 dias. a) em urina; b) em urina com escala logarítmica; c) em sangue total e plasma; d) correlação das concentrações de Sb no plasma *versus* sangue total.

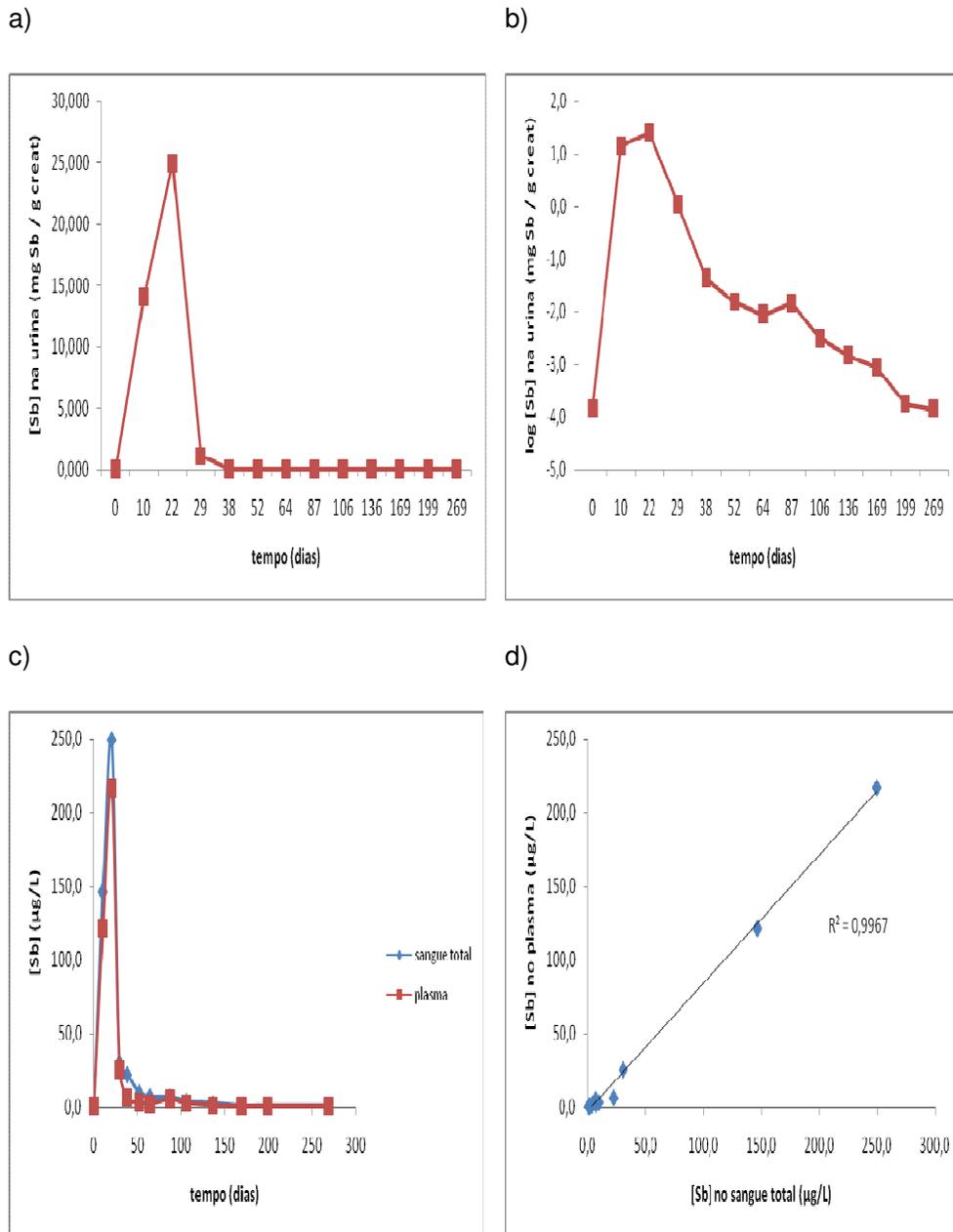


Figura 31: Curva de eliminação de Sb antes, durante e depois do tratamento com antimoniato de meglumina de integrante do grupo de dose baixa contínuo convencional. Paciente com LTA; feminino; 19 anos; 53 kg; tratamento contínuo com 25 doses cada uma de 267,3 mg Sb(V) / dia. a) em urina; b) em urina com escala logarítmica; c) em sangue total e plasma; d) correlação das concentrações de Sb no plasma *versus* sangue total.

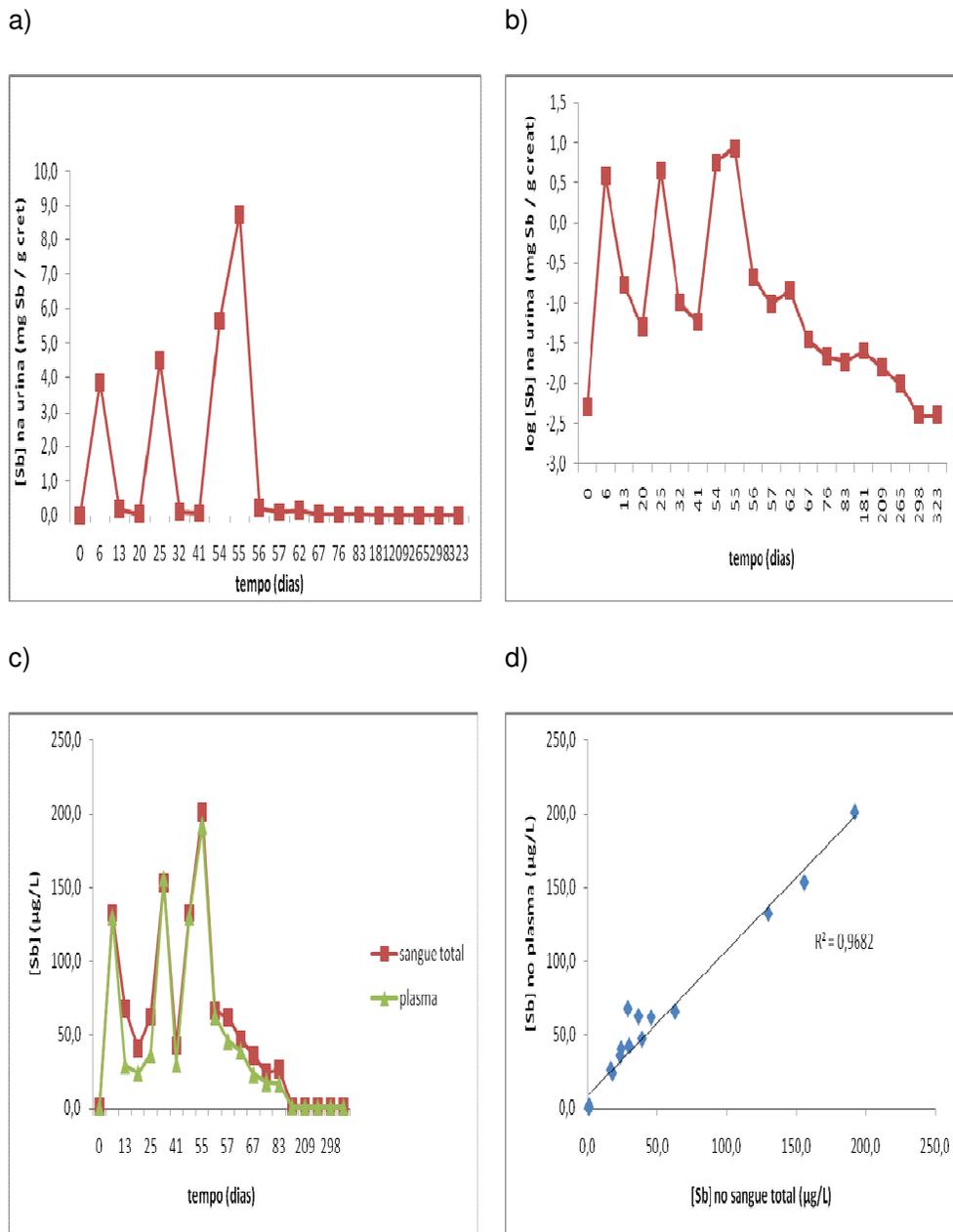


Figura 32: Curva de eliminação de Sb antes, durante e depois do tratamento com antimoníato de meglumina de integrante do grupo de dose baixa em série. Paciente com LTA; masculino; 63 anos; 63,5 kg; tratamento em 3 séries com 10 doses cada uma de 324 mg Sb(V) / dia, com intervalos entre as séries de 10 e 13 dias, respectivamente. a) em urina; b) em urina com escala logarítmica; c) em sangue total e plasma; d) correlação das concentrações de Sb no plasma *versus* sangue total.

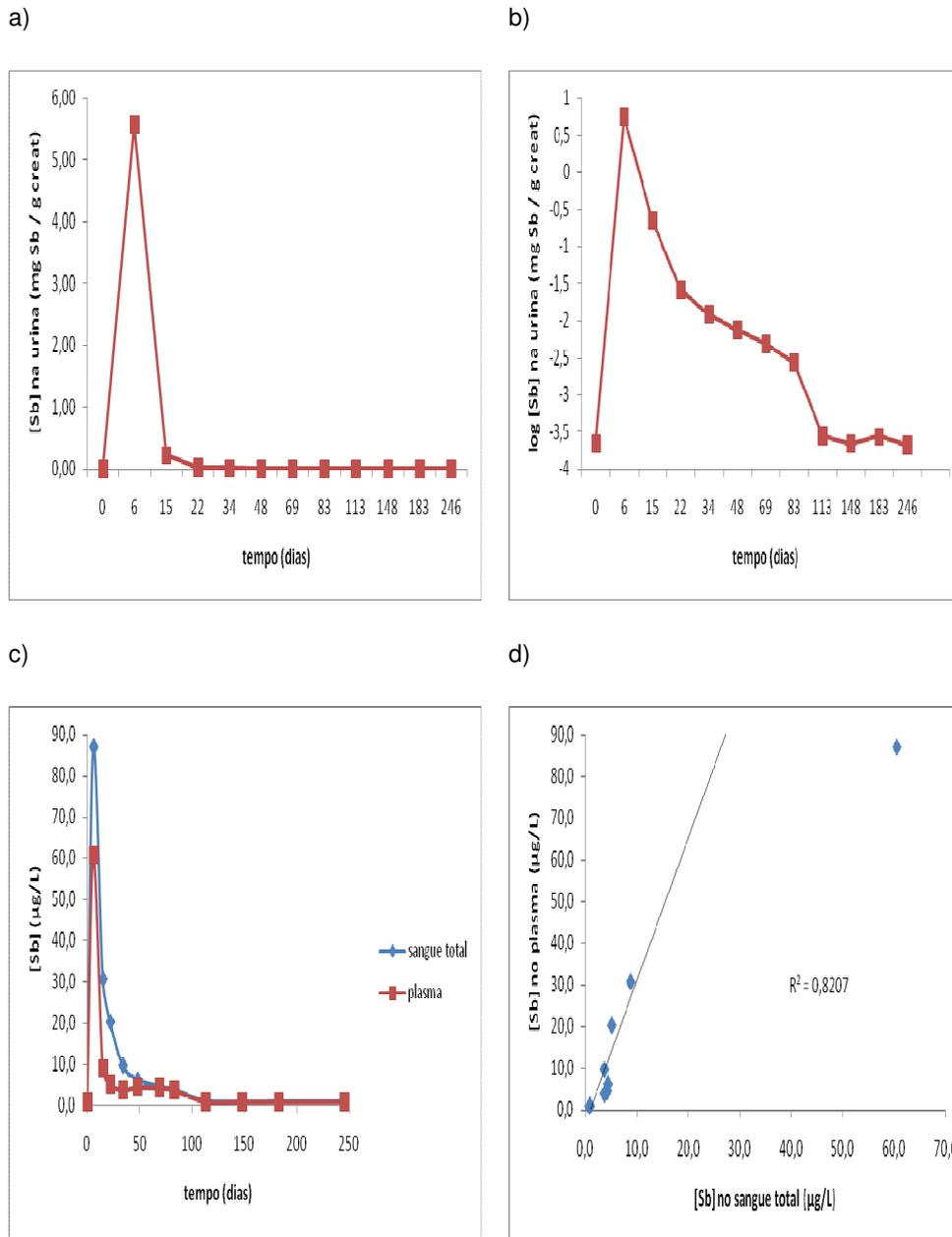


Figura 33: Curva de eliminação de Sb antes, durante e depois do tratamento com antimoniato de meglumina de integrante do grupo de dose baixa contínuo de curta duração. Paciente com LTA; masculino; 16 anos; 66,8 kg; tratamento contínuo com 10 doses cada uma de 324 mg Sb(V) / dia. a) em urina; b) em urina com escala logarítmica; c) em sangue total e plasma; d) correlação das concentrações de Sb no plasma *versus* sangue total.

6.6.2.

Biomonitoramento de antimônio através de cabelos e unhas

O estudo terapêutico anteriormente descrito foi uma rara oportunidade para monitorar a incorporação de Sb no cabelo e unhas dos pacientes participantes. Informações a respeito deste tópico ainda são escassas, especialmente o que se refere às unhas. Foram coletadas amostras antes do início do tratamento de todos os pacientes (valores basais) e durante e/ou final do tratamento. Para os participantes do regime terapêutico contínuo a amostragem ocorreu no último dia do tratamento, ao passo que, para pacientes do regime terapêutico em séries, ela foi realizada no final de cada série. Nem todos os participantes do projeto terapêutico com pacientes de LTA participaram deste ensaio (Tabela 39).

Tabela 39: Número de participantes do ensaio de biomonitoramento de cabelos e unhas por grupo de amostragem

Grupo	Ensaio com cabelo	Ensaio com unha
Dose alta contínuo	2	2
Dose alta em série	2	2
Dose baixa contínuo convencional	6	5
Dose baixa em série	2	2
Dose baixa contínuo de curta duração	2	0

Amostras de cabelos e unhas foram analisadas por ICPMS, seguindo-se o procedimento descrito no capítulo 5.3.2 (página 96). As concentrações basais de antimônio foram iguais a $0,06 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$ (n=14) e $0,09 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ (n=11), respectivamente, mostrando que os dois tecidos têm comportamento semelhante o que se refere à bioabsorção do elemento.

A análise da cinética de eliminação de Sb em cabelos e unhas entre os grupos de amostragem foi dificultada por vários motivos, como por exemplo, o pequeno número de integrantes de cada grupo. Ademais, os intervalos de coletas não foram rigorosamente os mesmos para todos os pacientes, devido à resistência e/ou impossibilidade em coletar este tipo de amostra clínica por vários motivos, tais como, unhas cortadas ou pintadas recentemente e novo corte de cabelo. As distorções encontradas também podem estar relacionadas com a influência

exercida por diversos fatores tais como sexo, idade, cor de cabelo, origem étnica e geográfica, tabagismo e dieta alimentar (Carneiro *et al.*, 2002).

Ao contrário do observado em fluidos biológicos, a concentração máxima de antimônio em cabelos e unhas foi alcançada após a conclusão do tratamento com AM em todos os grupos de amostragem, em consonância com os resultados apresentados para os macacos *Rhesus*. Durante o tratamento de todos os pacientes a concentração de antimônio em unhas e cabelos variou de 0,3 a 0,9 $\mu\text{g g}^{-1}$. Ao avaliar as maiores concentrações médias de antimônio em cabelo e unha de pacientes alcançadas após o tratamento, percebe-se que ocorreram variações significativas em relação às concentrações de Sb antes do tratamento (concentração basal), especialmente no caso de pacientes sob o regime terapêutico de dose alta.

Por exemplo, um paciente do grupo de dose alta em série apresentou uma concentração de antimônio no cabelo de 28,8 $\mu\text{g g}^{-1}$, o que equivale a cerca de 480 vezes mais que a sua respectiva concentração basal. Por outro lado, a maior concentração alcançada entre todos os pacientes submetidos ao tratamento com dose baixa em série foi de 9,3 $\mu\text{g g}^{-1}$. Observou-se, assim, uma relação entre a dose diária de AM e o acúmulo de Sb no cabelo. De forma geral, os pacientes submetidos a regimes terapêuticos com dose alta atingiram maiores concentrações de antimônio do que aqueles tratados com dose baixa. Este resultado sugere uma relação entre a dose diária (em mg de Sb) e a acumulação do elemento no cabelo. Também se constata uma relação entre o número de doses recebidas e a quantidade máxima de antimônio acumulada no cabelo, visto que os pacientes do grupo de dose baixa contínuo convencional apresentaram maiores concentrações de Sb do que os integrantes do grupo de dose baixa de curta duração. Estas relações são concordantes com as que já tinham sido observadas anteriormente no ensaio com plasma e sangue total (ver item 6.6.1, página 152), apoiando o modelo de existir (para certos elementos) uma correlação direta entre a concentração do(s) elemento(s) no cabelo e a nos fluidos biológicos presentes nos sítios de formação da matriz capilar (folículos).

Entretanto, o grupo de dose alta em série apresentou um valor médio de concentração máxima maior que o grupo de dose alta contínuo. O mesmo foi verificado ao comparar os grupos de dose baixa contínuo com o grupo de dose baixa em série. Inclusive, este último grupo apresentou surpreendentemente um

valor médio superior ao grupo de dose alta contínuo. A análise da cinética de eliminação de Sb em unhas e cabelos não indicou a acumulação de doses de AM, visto que, os pacientes submetidos a tratamentos em série alcançaram maior concentração de Sb nestes tecidos do que pacientes tratados com a mesma dose, porém com um regime terapêutico contínuo. Numa primeira análise, os resultados referentes aos tecidos parecem discordantes dos obtidos em fluidos biológicos. Entretanto, a análise da acumulação de Sb em cabelo e unhas é mais complexa e não pode se basear exclusivamente na dose ingerida de AM. O metabolismo distinto de cada paciente devido às diferenças de sexo, idade e dieta alimentar pode ter influenciado a incorporação do elemento neste tecido (Tabela 40).

Tabela 40: Concentração média (máxima) de antimônio no cabelo ($\mu\text{g g}^{-1}$) de pacientes com LTA após tratamento com antimoniato de meglumina (intervalo de confiança para $p = 0,80$).

Grupo de dose	[Sb] (Faixa)	[Sb] _{max} / [Sb] _{basal}
Alta contínuo	$6,9 \pm 0,1$ (6,7 a 7,0)	115
Alta em série	$23,1 \pm 7,4$ (17,4 a 28,8)	385
Baixa contínuo convencional	$4,9 \pm 1,4$ (3,8 a 5,1)	80
Baixa em série	$9,2 \pm 0,1$ (6,0 a 9,3)	150
Baixa contínuo de curta duração	$1,4 \pm 0,9$ (0,7 a 2,1)	20

Também foi observado um aumento das concentrações de Sb em unhas de pacientes dos grupos de dose alta, entretanto inferior em relação ao observado em cabelos (Tabela 41). A faixa de concentração máxima de Sb em pacientes do mesmo grupo foi maior em unhas do que em cabelos. Por exemplo, um paciente do grupo de dose baixa convencional apresentou um teor máximo de antimônio na unha de $5,6 \mu\text{g g}^{-1}$. Já a concentração de Sb na unha de outro paciente do mesmo grupo foi igual $1,6 \mu\text{g g}^{-1}$.

Este fato pode estar relacionado com a contaminação de unhas por fontes exógenas, especificamente em relação ao contato com a droga MA (provavelmente através de exudatos de lesões). Não foi constatada uma correlação

entre os teores máximos de Sb em unhas e cabelos. Entretanto, a ausência desta correlação esperada pode ser apenas uma consequência das dificuldades na amostragem do material.

Tabela 41: Concentração média (máxima) de antimônio ($\mu\text{g g}^{-1}$) em unhas de pacientes com LTA após tratamento com antimoniato de meglumina (intervalo de confiança para $p = 0,80$).

Grupo de dose	[Sb] (Faixa)	[Sb] _{max} / [Sb] _{basal}
Alta contínuo	$2,2 \pm 1,2$ (0,9 a 2,5)	25
Alta em série	$9,2 \pm 5,0$ (5,3 a 13,1)	100
Baixa contínuo convencional	$4,0 \pm 1,1$ (1,6 a 5,6)	45
Baixa em série	$2,6 \pm 1,4$ (1,5 a 3,7)	30

As concentrações de Sb antes, durante e após o tratamento para um paciente de cada grupo de amostragem estão representadas graficamente nas Figuras 34 e 35. Podem-se considerar estes gráficos como sendo as curvas de eliminação de antimônio nos compartimentos biológicos estudados (cabelo e unha). A eliminação de Sb em cabelos e unhas apresenta um pico (concentração máxima) após o tratamento e um longo tempo de retorno ao nível basal (*turnover*) independente do tipo de tratamento, refletindo, assim, o acúmulo de Sb nestes compartimentos. Por outro lado, as curvas de eliminação de urina apresentam um pico em torno do término do tratamento, com uma queda de aproximadamente 90% logo após o final da administração da droga (vide Figuras 29 a 33, páginas 158 a 162). Estes resultados preliminares mostram que tanto cabelo como unha são tecidos que de fato acumulam elementos tóxicos, tal como o antimônio, porém com uma lenta excreção, visto que o tempo necessário para que os teores de Sb retornem aos níveis basais é muito menor na urina. As curvas de tratamento com doses alta e baixa de cabelo e unha apresentam formato e tempos semelhantes, porém com ordem de grandezas diferentes. Também ocorrem semelhanças em relação a cabelo e unha entre as curvas do tratamento em série e do contínuo, independente da dose diária administrada.

Como já foi mencionado, o tempo de declínio da concentração de Sb em cabelos e unhas foi longo. O estabelecimento do tempo necessário para que as concentrações retornassem ao nível basal não foi obtido com precisão, porque não foram realizadas coletas nos mesmos pontos ao longo do tratamento para todos os pacientes. As concentrações de antimônio nestes tecidos de alguns pacientes ainda não haviam retornado ao nível encontrado antes do tratamento. Inclusive alguns pacientes já apresentavam a concentração basal de Sb em fluidos biológicos, no entanto o teor deste elemento em cabelos e unhas permanecia superior ao nível basal. Este fato mostra que tal elemento continua incorporado nestas matrizes, sugerindo que ainda havia Sb circulante no organismo em níveis não detectáveis, mesmo após um longo período do fim da administração da droga (Tabela 42).

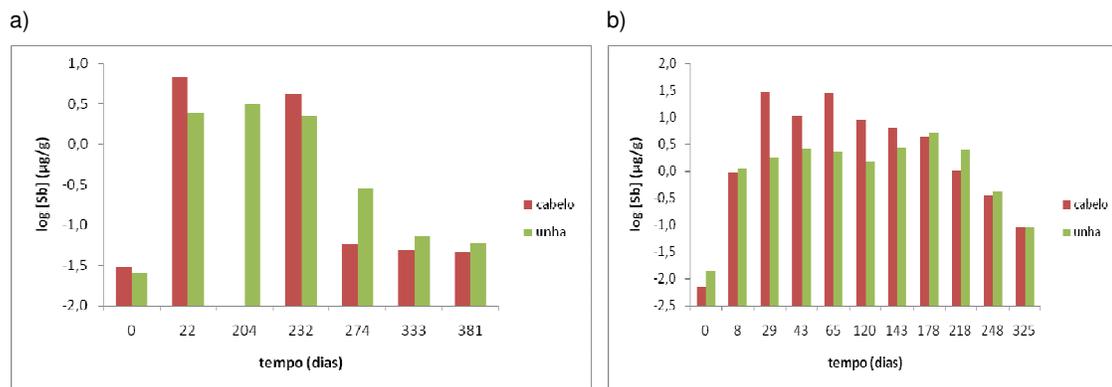


Figura 34: Variação da concentração de Sb em cabelos e unhas de pacientes com LTA antes, durante e após o tratamento com dose alta de AM. a) Paciente do grupo de dose alta contínuo; masculino; 23 anos; 64,3 kg; tratamento contínuo com 20 doses cada uma de 1215 mg Sb(V) / dia. b) Paciente do grupo de dose alta em série; feminino; 44 anos; 58 kg; tratamento em 2 séries com 8 e 12 doses, respectivamente, cada uma de 1134 mg de Sb(V) / dia com intervalo de 24 dias.

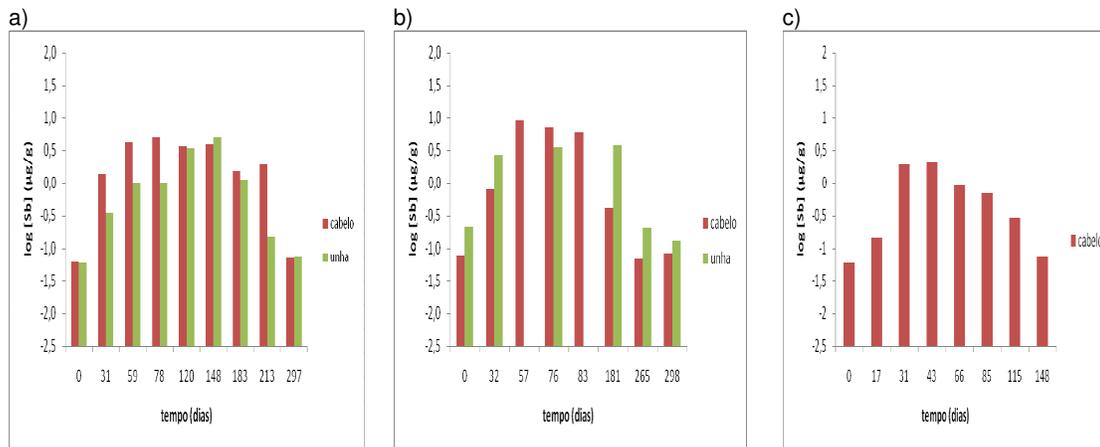


Figura 35: Variação da concentração de Sb em cabelos e unhas de pacientes com LTA antes, durante e após o tratamento com dose baixa de AM. a) Paciente do grupo de dose baixa contínuo; feminino; 22 anos; 49 kg; tratamento contínuo com 30 doses cada uma de 259,2 mg Sb(V) / dia. b) Paciente do grupo de dose baixa em série; masculino; 63 anos; 63,5 kg; tratamento em 3 séries com 10 doses cada uma de 324 mg Sb(V) / dia, com intervalos entre as séries de 10 e 13 dias, respectivamente. c) Paciente do grupo de dose baixa contínuo de curta duração; masculino; 25 anos; 63,2 kg; tratamento com 10 doses cada uma de 324 mg de Sb(V) / dia.

Tabela 42: Intervalo de tempo necessário para retorno da concentração de Sb ao nível basal em cabelos e unhas de pacientes com LTA após o tratamento com AM. Intervalo de confiança calculado para $p = 0,80$.

Grupo	Cabelos	Unhas
	Média do Tempo (dias)	Média do Tempo (dias)
Dose alta contínuo	> 361 ^(a)	361 ^(a)
Dose alta em série	305 ^(b)	305 ^(b)
Dose baixa contínuo convencional	266 ± 16 ^(c)	266 ± 16 ^(c)
Dose baixa em série	211 ^(d)	211 ^(d)
Dose baixa contínuo de curta duração	187 ± 63	n.i. ^(e)

(a) Não foi observado o retorno da concentração ao nível basal para nenhum dos pacientes do grupo.

(b) Valor relativo a um único paciente. Não foi observado o retorno da concentração de Sb ao nível basal para o outro paciente do grupo.

(c) Valor relativo a três pacientes. Não foi observado o retorno da concentração de Sb ao nível basal para os outros três pacientes do grupo.

(d) Valor relativo a um único paciente. A coleta de cabelos e unhas não foi realizada no final do ensaio.

(e) n.i. = não investigado.

A concentração de Sb encontrada em cabelos e unhas na fase pós-tratamento foi significativamente maior do que a determinada em fluidos biológicos neste

mesmo período. Sendo assim, após um longo período da conclusão do tratamento torna-se mais fácil verificar se um indivíduo de fato foi submetido à administração de MA através da quantificação de Sb nestes tecidos. Segundo informações dos médicos participantes deste estudo, nem sempre os pacientes sabiam responder esta pergunta. Por esta razão, a utilização de cabelos e unhas como biomonitores “retroativos” de Sb é interessante, visto que estes tecidos preservam o perfil de concentração de Sb durante longo tempo.

6.6.3.

Especiação de antimônio em urina de paciente com LTA tratado com antimoniato de meglumina

Como já foi repetido algumas vezes neste texto, existem poucos dados na literatura sobre o metabolismo do antimônio no corpo humano. Como o antimônio e o arsênio apresentam características químicas e toxicológicas semelhantes é possível que as vias metabólicas também apresentem alguma analogia. Em seres humanos, como também em muitas espécies de mamíferos, no processo metabólico do arsênio ocorre a redução do arsênio pentavalente, As(V), para o trivalente, As(III), com uma subsequente metilação (Suzuki *et al.* 2002; Assis *et al.*, 2008). Considera-se a metilação como a principal via de desintoxicação do arsênio inorgânico, porque os metabólitos metilados pentavalentes (MMA^V e DMA^V) são menos tóxicos que as espécies inorgânicas As(III) e As(V).

Os resultados até aqui apresentados confirmam que em humanos e macacos *Rhesus* ocorre a bioedução do Sb(V) a Sb(III). No entanto, ainda não se tem informações sobre possíveis mecanismos de desintoxicação, visto que a espécie trivalente é muito mais tóxica que a pentavalente. O objetivo desta parte do presente trabalho consistiu justamente em verificar se a biometilação é uma das possíveis vias de desintoxicação do antimônio no corpo humano. Infelizmente, devida a falta de espécies orgânicas de Sb no mercado, a única disponível para identificações cromatográficas era o dicloreto de trimetil-antimônio, (CH₃)₃SbCl₂, abreviado como TMSb.

O método B de IC-ICPMS (vide Tabela 21, página 99), otimizado para detecção de Sb(III) e TMSb^V, foi aplicado na análise de urina de um paciente com LTA tratado com AM. As amostras foram coletadas após a conclusão do tratamento e no próprio laboratório da PUC-Rio. Desta forma, a integridade das

espécies foi preservada da melhor forma possível, pois as amostras foram analisadas imediatamente após a micção. Este paciente voluntário foi tratado com dose de Sb(V) de $5\text{mg kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ de AM por tratamento em série, constituído de 3 séries compostas de doses diárias de AM administrado por via intramuscular durante 10 dias com aplicações em dias consecutivos e com intervalos entre as séries de 10 e 13 dias, respectivamente.

O monitoramento das espécies de Sb em amostras de urina coletadas *in loco* durou 55,6 horas. Durante este intervalo de tempo, não se verificou a presença da espécie TMSb (t_R em torno de 300 s) em nenhum dos cromatogramas obtidos. As espécies predominantes de Sb presentes na urina estavam representadas no primeiro pico de todos os cromatogramas e identificadas como a droga AM e o Sb(V).

No primeiro cromatograma (Figura 36-a), identificou-se a presença da espécie inorgânica trivalente de antimônio, através do tempo de retenção ajustado do segundo pico. Ao longo do monitoramento, a área do pico relativo a esta espécie, assim como, a razão entre as áreas do pico de Sb(III)/pico-1 aumentaram, mostrando, mais uma vez, que ocorre a produção metabólica de Sb(III).

A alta concentração de cloreto de sódio na urina exerce influência na separação cromatográfica das espécies de antimônio, provocando o alargamento dos seus respectivos picos. Nos cromatogramas obtidos, observou-se o aparecimento de um pico adicional (representado por “?” na Figura 36-b). Emons e Krachler (2001-b) já tinham notado este pico em cromatogramas de urina fortificada, entretanto sem identificá-lo.

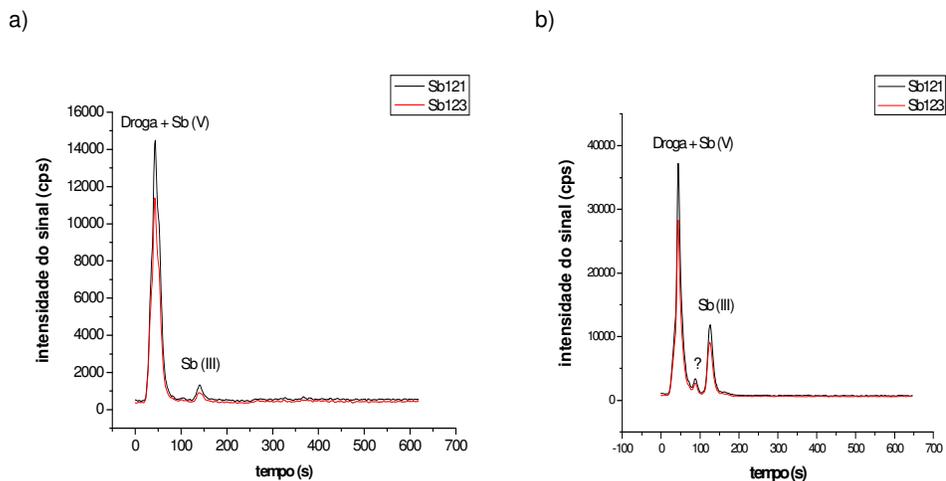


Figura 36: Cromatogramas de amostras de urina coletadas após a conclusão do tratamento de AM (*sample read delay* igual a 55s). a) 20 horas após a última aplicação de AM (fator de diluição = 100x); b) 55,6 horas após a última aplicação de AM (fator de diluição = 10x). Paciente com LTA do grupo de dose baixa em série; masculino; 63 anos; 63,5 kg; tratamento em 3 séries com 10 doses cada uma de 324 mg Sb(V) / dia, com intervalos entre as séries de 10 e 13 dias, respectivamente.

Uma vez que com o método aplicado não foi possível quantificar, separadamente, as espécies AM e Sb(V), a concentração de antimônio total nas amostras de urina foi determinada por ICPMS, de maneira convencional (vide sub-ítem 5.3.1, página 95). A concentração da espécie Sb(III) foi determinada por IC-ICPMS através de um curva de calibração e a identidade do pico, já revelada pelo tempo de retenção, foi ainda verificada através da fortificação com Sb(III). De posse destas duas informações, foi calculada a variação da proporção de Sb(III) em relação ao Sb total ao longo do monitoramento (Figura 37). A razão Sb(III)/Sb-total atinge o seu ponto máximo após 28,1 horas do fim da última série de AM. A partir deste ponto, esta razão diminuiu progressivamente. Nas últimas 4 horas, tal proporção torna-se praticamente constante, indicando um possível estado de equilíbrio entra a formação de Sb(V) e a sua transformação para Sb(III).

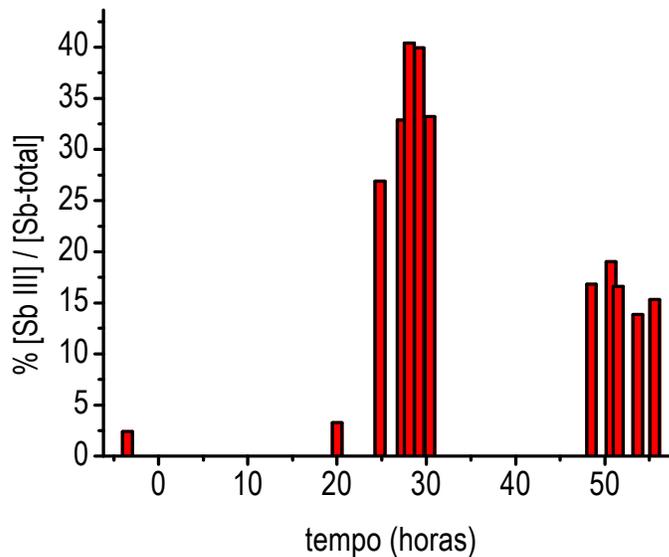


Figura 37: Variação da razão entre Sb(III) e Sb-total em urina de paciente com LTA após a conclusão do tratamento com AM.

A razão de Sb(III)/Sb-total do lote 502720 do fármaco AM utilizado no tratamento deste paciente foi igual a 0,035 (3,5%), ver item 6.3.1. No presente ensaio verificou-se razões significativamente superiores, de até 40,3%. Sendo assim, pode-se supor que o aumento da concentração de Sb(III) foi realmente resultado de uma transformação metabólica e não um artefato causado pela contaminação da droga com Sb(III). Contudo, o Sb(III) sempre se apresentou como a espécie minoritária nas amostras de urina, indicando que a maior parte da droga foi eliminada na forma *in natura* ou como Sb(V). A inexistência de picos relativos à espécie TMSb mostrou que a biometilação não ocorre no corpo humano nas primeiras 55,6 horas após a conclusão do tratamento.