

ANÁLISE RETROSPECTIVA DO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA PELA DOSAGEM DE ANTIMÔNIO EM FIOS DE CABELO*

*SERGIO ROBERTO MORTARI**

*NORBERT MIEKELEY***

*ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH****

A partir do acompanhamento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), monitorados pela análise de cabelo após administração, via muscular, de antimoniato de N-metil glucamina, este estudo visa verificar a validade de utilizar-se cabelo humano como monitor biológico. A técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplada (ICP – MS) foi utilizada na quantificação de antimônio total. Foram coletadas e segmentadas (+ 1,5 cm) amostras de cabelo, em toda a extensão (± 20 cm), de cinco pacientes voluntárias, com tratamento concluído há mais de seis meses. O procedimento típico para combate da enfermidade corresponde a 30 injeções sucessivas com doses diárias de 5 mg de antimônio por kg de peso corporal (dosagem baixa). Os resultados obtidos neste estudo apontam que amostras de cabelo podem ser utilizadas como indicador biológico para antimônio, revelando o histórico de um tratamento e/ou de uma intoxicação accidental ou proposital.

* Este artigo corresponde a uma parte da tese de doutoramento de Sergio Roberto Mortari, Professor da Área de Ciências da Saúde do Centro Universitário Franciscano de Santa Maria (UNIFRA).

** Professor do Departamento de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC/Rio).

*** Membro do Instituto de Pesquisa Clínica da Fundação Oswaldo Cruz (IPEC/ FIOCRUZ).

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença crônica da pele e da mucosa oro-nasal, causada por várias espécies de protozoários do gênero de *Leishmania* encontradas em quase todos os países americanos. O homem é, em geral, um hospedeiro acidental e, no local da picada do flebotomíneo, desenvolve-se uma lesão cutânea primária cuja apresentação clínica depende da espécie do parasita e da resposta contra ele. A apresentação clínica mais comum é a forma cutânea localizada, caracterizada como úlcera cutânea única, que tende à cura espontânea (MARZOCKI; SCHUBACH; MARZOCKI, 1999). Utilizado no tratamento das leishmanioses, o antimônio (Sb) é um elemento não essencial e apresenta comportamento toxicológico semelhante ao arsênio e ao bismuto. Sua forma trivalente é mais tóxica que a forma pentavalente, sendo que as espécies inorgânicas são mais tóxicas que as orgânicas. Em humanos, a forma trivalente está presente nas células vermelhas do sangue, enquanto que a forma pentavalente permanece no plasma sanguíneo e é assim excretada mais facilmente (RAHMAN et al, 2000).

De acordo com as recomendações atuais da Organização Mundial da Saúde (OMS), deve-se tratar os pacientes de leishmaniose cutânea e de mucosa com doses de 20mg Sb⁵⁺/kg/dia, até a dose máxima diária de 850mg, via intramuscular ou endovenosa, e por um período mínimo de quatro semanas. Já o Ministério da Saúde recomenda tratar os pacientes de leishmaniose cutânea com doses de 10-20mg Sb⁵⁺/kg/dia, durante 20 dias e, para os que apresentam leishmaniose na mucosa, doses de 20mg Sb⁵⁺/kg/dia, durante 30 dias. Em ambos os casos, não há limite diário recomendado. No Rio de Janeiro, doses de 5mg Sb⁵⁺/kg/dia vêm sendo utilizadas com sucesso (OLIVEIRA-NETO et al, 1997).

Durante as três últimas décadas, a determinação de elementos-traço em cabelo vem recebendo contínuo interesse na ciência biomédica e do meio ambiente (ELINDER et al., 1994 ; TAGLIARO et al., 1998 ; FLORES et al., 2001). O principal enfoque está nos efeitos fisiológicos dos metais tóxicos e essenciais para o organismo humano (AMATO, 1997). Os resultados das medições são interpretados em relação aos níveis do estado nutricional, diagnóstico de doenças, intoxicações sistêmicas e/ou monitoramento de exposições ambientais, embora essas interpretações ainda apresentem controvérsias. Dependendo do metabolismo "mineral" do corpo humano, a transferência de elementos tóxicos para o cabelo pode ser considerada, por um lado, como uma forma de excreção dos elementos-traço (KATZ; CHATT, 1998). Por outro, a origem de elementos-traço no

cabelo pode ser exógena e, assim, sua concentração pouco contribui na relação entre os seus níveis com os de outros tecidos biológicos.

Sendo um tecido biológico, o cabelo apresenta uma característica peculiar: ele acumula elementos menores e traço durante a sua formação e esses emergem com ele (semelhante às unhas), além de ser formado em período relativamente curto de tempo (em um indivíduo adulto, a taxa de crescimento no escalpo é de aproximadamente 1,2 + 0,3 cm ao mês). Deve-se considerar, ainda, que o cabelo é um tecido facilmente coletado, armazenado e analisado por uma variedade de técnicas analíticas (MORTARI, 1997). Amostras de cabelo vêm sendo utilizadas como monitor biológico para uma diversidade de aplicações (STEVENS, 1983; RAHMAN et al., 2000), incluindo a avaliação do nível nutricional, estudos sobre a exposição ambiental, o diagnóstico clínico e o controle de "doping" (KINTZ, 1998) em atletas, refletindo não só a exposição atual à qual o indivíduo está submetido, como também àquela em que ele foi sujeito há um tempo remoto (DIAS CARNEIRO, 1999). A quantidade do elemento absorvido depende da sua concentração instantânea nos fluídos do corpo (sangue, linfa, fluído extracelular) (CAMPBELL et al, 1981).

Em geral, as aplicações visam à comparação de resultados obtidos entre dois grupos distintos: grupo problema *versus* grupo controle. Avalia-se, na maioria das vezes, sob o contexto da influência cultural (tipo de alimentação), geográfica ou exposição ocupacional no ambiente de trabalho ou de habitação. O presente trabalho, nesse sentido, inova na metodologia empregada, cuja proposta é compreender o acompanhamento prospectivo e retrospectivo de um grupo de pacientes submetidos a coletas de amostras de cabelo após conclusão de um tratamento - pacientes com quadro clínico confirmado de LTA, tratados com antimoniato de N-metil glucamina. Como o antimônio, elemento estudado, não apresenta concentração significativa na dieta alimentar (concentração "normal" de Sb no cabelo de pessoas não expostas: $< 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (MIEKELEY; DIAS CARNEIRO; PORTO DA SILVEIRA, 1998), espera-se observar os efeitos de absorção e excreção nas amostras de cabelo com maior clareza.

É objetivo principal deste estudo acompanhar pacientes de LTA após o tratamento com medicamentos à base de antimônio, monitorando os níveis de concentração desse elemento em amostras capilares, com o propósito de verificar a validade de se utilizar cabelo humano como monitor biológico.

METODOLOGIA

A técnica de ICP-MS foi utilizada, exclusivamente, na determinação de antimônio. Cabe ressaltar também que as metodologias e os procedimentos desenvolvidos neste trabalho foram previamente encaminhadas e apresentadas ao Comitê de Ética e Pesquisa da FIOCRUZ, seguindo as normas do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, Resolução 196, de 10 de outubro de 1996, recebendo deferimento (protocolo n° 098/99).

Amostragem

As amostras de cabelo foram coletadas em pacientes de LTA voluntários, recrutados no ambulatório do Centro de Referência para Diagnóstico de Leishmaniose da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ-RJ/Instituto de Pesquisa Clínica do Hospital Evandro Chagas (IPEC), no período de abril de 1999 a junho de 2001. Os pacientes foram diagnosticados e tratados com antimoniatos de N-metil glucamina, conforme as rotinas usuais do referido centro (5 mg Sb/dia/kg de peso corporal). Participaram do trabalho 5 pacientes voluntárias do sexo feminino, com quadro clínico confirmado e submetidas ao tratamento de LTA. No recrutamento, não houve critérios de exclusão de pacientes por faixa etária, sexo ou hábitos alimentares. As amostras foram obtidas dessas voluntárias, que tinham cabelos compridos (20cm ou mais), com tratamento finalizado há, no mínimo, 6 meses. Foram coletadas amostras rente ao couro cabeludo e em toda a extensão dos fios, com o objetivo de segmentar e analisar, posteriormente, cada segmento com aproximadamente 1,5cm. A coleta foi feita no ambulatório do IPEC e as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente fechados e etiquetados, até serem pré-tratadas e analisadas.

Quantificação de Antimônio Total

Para a realização deste estudo foi utilizado o espectrômetro de massa modelo ELAN 5000 (Perkin-Elmer/Sciex, Norwalk, CT, USA). O instrumento é do tipo "quadrupolo" com resolução de massa de 0,6 a 0,8 u (unidade de massa atômica). O equipamento foi otimizado diariamente (alinhamento e distância tocha-amostrador; vazão do gás nebulizador), aspirando-se uma solução analítica mista contendo os elementos Mg, Rh, Ba e Pb ($10\mu\text{g.L}^{-1}$). Essa solução também foi utilizada para verificar a sensibilidade do equipamento: a aspiração de $10\mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{103}Rh resultava, tipicamente, em taxa de contagem > 60.000 cps, mostrando sempre um desempenho superior ao mínimo estabelecido pelo fabricante (40.000 cps). Níveis de óxidos foram conferidos pela aspiração de uma solução contendo $10\mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{140}Ce , sendo que a razão CeO/Ce^+ apresentou sempre valores inferiores

a 3%. Para monitorar a formação de íons bivalentes, uma solução com $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ^{138}Ba foi aspirada e a razão $\text{Ba}^{++}/\text{Ba}^{+}$ apresentou sempre valores inferiores a 3%. Os parâmetros operacionais relevantes da técnica são mostrados na TABELA 1.

TABELA 1 - Parâmetros operacionais utilizados na determinação de antimônio total utilizando ICP-MS (ELAN 5000, PerkinElmer - Sciex).

Parâmetro	ICP-MS (nebulização convencional)
potência (W)	1050
vazão de Argônio (L/min) (L/min)	0,95 (nebulizador) 15,0 (plasma) 1,0 (auxiliar)
nebulizador e taxa de aspiração	Meinhard com câmara ciclônica: $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
<i>m/z</i> do analito e do padrão Interno (PI)	^{121}Sb , ^{123}Sb , ^{115}In (PI)
amostrador/ "Skimer"	platina

Reagentes de alta pureza foram utilizados no preparo das soluções analíticas e das amostras. Em todos os procedimentos utilizou-se: água Milli-Q ($>16\text{M}\Omega\text{cm}$), previamente destilada e deionizada, HNO_3 (Merck, p.a., bi-subdestilado) e H_2O_2 (Merck, suprapapur[®], 30% v/v). A partir de uma solução estoque de $1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de antimônio (SbCl_3 , Merck, Titrisol[®]) foram preparadas as soluções analíticas. O elemento Índio (*m/z* 115) foi utilizado como padrão interno ($50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), preparado a partir de uma solução estoque de $1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (solução padrão elementar, Merck) por diluição em HNO_3 (3%).

Decomposição das Amostras

O procedimento de decomposição das amostras empregado foi o mesmo que vem sendo utilizado como rotina no laboratório de ICP-MS do Departamento de Química da PUC/Rio (MIEKELEY; MORTARI; SCHUBACH, 2002; MORTARI, 2001).

Para eliminar possível contaminação exógena, as amostras de cabelo foram previamente lavadas 3 vezes com água (20 mL), 3 vezes com acetona (p.a) e 3 vezes com água. Todas as lavagens foram feitas por 10 minutos em banho de ultra-som. Após a lavagem, as amostras foram secas em estufa, por uma noite, à temperatura aproximada de 60°C . Para 0,25g de amostra de cabelo, adicionaram-se 2,5mL de HNO_3 (concentrado) em tubo com capacidade para 50mL (graduado, com tampa de rosca, fundo cônico e de

polipropileno, Sarstedt, Alemanha), deixando-se em repouso por 12 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 70°C e assim mantidos durante 1 hora, em bloco de aquecimento. Posteriormente, foram retirados e, ao atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se 1,0mL de H₂O₂ (30% v/v) retornando-se ao aquecimento por mais 1 hora. As amostras foram então diluídas com água, a 25mL deste total, tomando-se uma alíquota de 4,75mL à qual adicionaram-se 0,25mL de solução do padrão interno (1000mg.L⁻¹).

As amostras coletadas das pacientes mulheres com fios de cabelo longos foram segmentadas em intervalos de aproximadamente 1,5cm e lavadas posteriormente. A massa de cada segmento teve, em média, de 20 a 30mg e foram processadas da maneira já descrita, respeitando-se as proporções entre massa da amostra e quantidade dos reagentes.

Na determinação de Sb por ICP-MS, o modo quantitativo com calibração "externa" foi utilizado. Para a introdução das amostras, utilizou-se uma câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Camberwell, Austrália) em conjunto com nebulizador concêntrico tipo Meinhard, operado com bomba peristáltica (4 canais, Gilson, França).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Determinação de Antimônio (total) em Amostras de Cabelo

A determinação de antimônio pela técnica de ICP-MS de baixa resolução de massa (quadropolo) não oferece maiores dificuldades experimentais, uma vez que os isótopos deste elemento (¹²¹Sb, a = 57%; ¹²³Sb, a = 43%) são pouco sujeitos a interferências espectrais (isobáricas, óxidos, poliatômicas). Além disso, a energia moderada do 1º potencial de ionização do elemento (8,641 eV) permite um bom rendimento de formação de íons no plasma. A essas propriedades favoráveis soma-se a baixa concentração do elemento como contaminante em reagentes químicos, recipientes, materiais de embalagem e no meio ambiente de laboratórios comuns. Desta forma, limites de detecção e de quantificação da ordem de ng.L⁻¹ podem ser obtidos, mesmo com nebulizadores convencionais e equipamentos mais antigos, como foi o caso deste trabalho.

A curva analítica para antimônio através da técnica de ICP-MS apresentou excelente linearidade, com coeficientes de determinação (r²) próximos a 0,999, nebulização convencional e limite de detecção para antimônio (3σ, diluição 100 vezes) de 0,005 µg.g⁻¹.

Para a determinação da repetitividade e da exatidão da metodologia utilizada, material de referência de cabelo humano (GBW-09101, *Shanghai*

Institute of Nuclear Research, Academia Sinica) foi analisado. Obteve-se uma boa recuperação do analito no material utilizado (95,7 %) - valor certificado $0,210 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $0,201 + 0,006 \mu\text{g.g}^{-1}$ valor determinado.

Análise retrospectiva do tratamento de LTA pela dosagem de antimônio em fios de cabelo segmentados¹

Do total de cinco pacientes (3 casos de LTA cutânea, 1 caso de LTA mucosa e 1 caso de Leishmaniose Visceral, conhecida também como Calazar) foram avaliados e os resultados plotados em gráficos, conforme Figuras de 1-5. Como a taxa de crescimento do cabelo é aproximada ($\pm 1,5\text{cm}$ representativos do período de crescimento de cerca de 30 dias) podendo variar entre indivíduos, os períodos de início (I) e fim (F) do tratamento indicado nas figuras foram apenas estimados.

Os gráficos indicam que amostras de cabelo, além de serem excelentes bio-indicadores para o Sb, também refletem o histórico do tratamento desenvolvido. Entre os casos, chama a atenção o perfil do gráfico da Figura 1, que "espelha" o tratamento (em valores de concentração de antimônio) ministrado em 2 ciclos, com intervalo de 5 meses entre um ciclo e outro. Verifica-se que, quando a concentração máxima obtida em virtude do 1º ciclo tende a diminuir, é iniciado o 2º ciclo com novo aumento da concentração da droga no cabelo. Nas demais figuras (Figura 2-5), é apresentado o perfil típico de tratamento em apenas um ciclo.

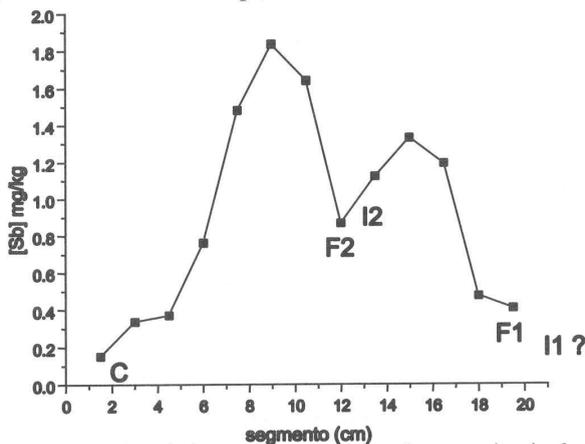


Figura 1- Amostras de cabelo segmentado, coletadas rente à raiz dos fios, após tratamento de LTA. Paciente FSV; feminino; 06 anos; LTA cutânea; 24,4kg; dose de $127,5\text{mg Sb}^{+5}/\text{dia}$; tratamento em dois ciclos: 1º ciclo 30 dias; 2º ciclo 15 dias. C = coleta (04/09/00), I1 = início do 1º ciclo (09/08/99), F1 = fim do 1º ciclo (07/09/99), I2 = início do 2º ciclo (16/02/00), F2 = fim do 2º ciclo (30/02/00).

ANÁLISE RETROSPECTIVA DO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA PELA DOSAGEM DE ANTIMÔNIO EM FIOS DE CABELO

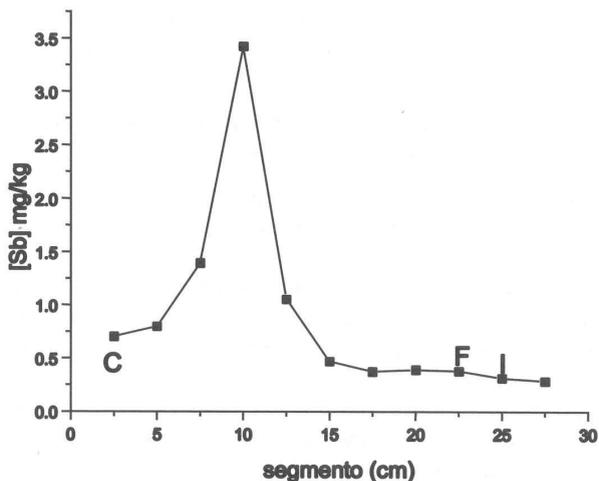


Figura 2- Amostras de cabelo segmentado, coletadas rente à raiz dos fios, após tratamento de LTA. Paciente JFR; feminino; 51 anos; LTA cutânea; 53,8kg; ; dose de 272mg Sb⁺⁵/dia; 30 dias de tratamento. C = coleta (09/07/01), I = início do tratamento (02/10/00), F = fim do tratamento (31/10/00).

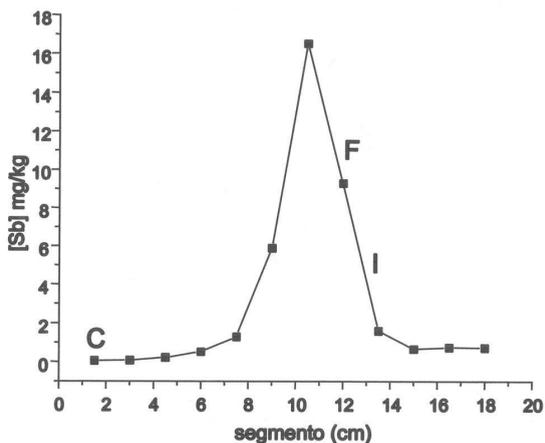


Figura 3- Amostras de cabelo segmentado, coletadas rente à raiz dos fios, após tratamento de LTA. Paciente LTL; feminino; 32 anos; LTA cutânea; 109kg; dose de 850mg Sb⁺⁵/dia; 20 dias de tratamento. C = coleta (29/11/00), I = início do tratamento (20/03/00), F = fim do tratamento (10/04/00).

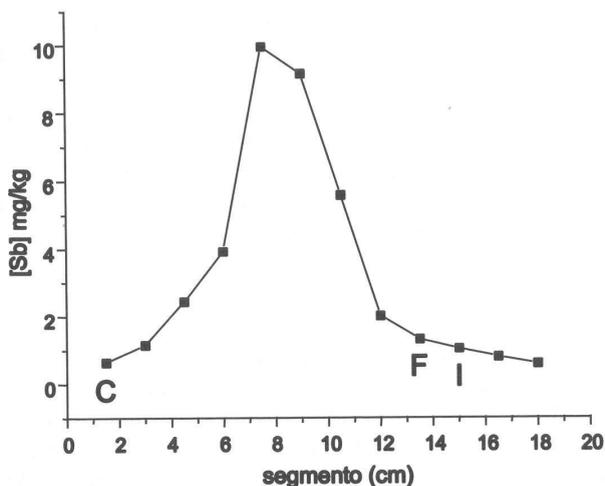


Figura 4- Amostras de cabelo segmentado, coletadas rente à raiz dos fios, após tratamento de LTA. Paciente IAEG; feminino; 70 anos; LTA mucosa; 57kg; dose de 289mg Sb⁺⁵/dia; 30 dias de tratamento. C = coleta (11/04/00), I = início do tratamento (09/08/99), F = fim do tratamento (08/09/99).

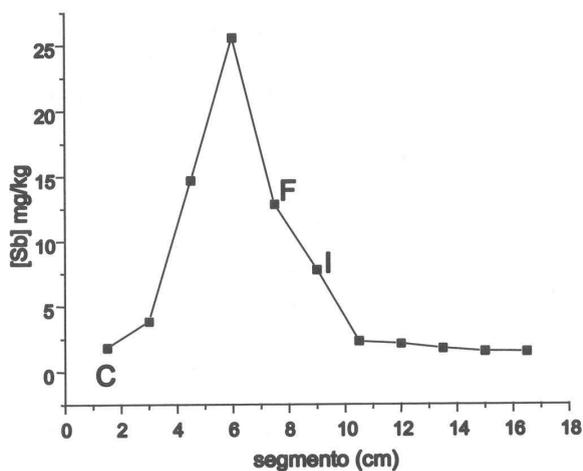


Figura 5- Amostras de cabelo segmentado, coletadas rente à raiz dos fios, após tratamento de LTA. Paciente ASM; feminino; 17 anos; calazar; 46kg; dose de 850mg Sb⁺⁵/dia; 30 dias de tratamento. dose alta (20mg Sb⁺⁵/kg/dia). C = coleta (09/05/01), I = início do tratamento (11/12/00), F = fim do tratamento (09/01/01).

ANÁLISE RETROSPECTIVA DO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA PELA DOSAGEM DE ANTIMÔNIO EM FIOS DE CABELO

A avaliação retrospectiva da exposição ao antimônio, por meio da análise de segmentos de cabelo, tem importância prática também na rotina clínica, pois nem sempre os pacientes de leishmanioses estão informados sobre um eventual tratamento anterior com drogas antimoniais. Tal conhecimento, entretanto, é útil na definição de estratégias (tipo de droga, doses, intervalos) para uma nova administração, em caso de reincidência da doença. Apresenta-se uma nova ferramenta analítica interessante que pode ser aplicada quando tais dúvidas persistem.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo apontam que amostras de cabelo podem ser utilizadas como indicador biológico para antimônio, apresentando vantagens sobre as demais amostras biológicas (sangue, urina, espermatozoides, etc.) em virtude da fácil coleta, do fácil manuseio, de não requerer refrigeração e do fácil armazenamento. A análise de fios de cabelo segmentados permite revelar o histórico de um tratamento e/ou de uma intoxicação acidental ou proposital, com possíveis aplicações clínicas e forensicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO, M. O. *Otimização de diferentes metodologias para determinação de mercúrio por ICP-MS e aplicações em análise de cabelo.*, 1997. Dissertação (Mestrado), Departamento de Química, PUC-Rio, Rio de Janeiro, 1997.

CAMPBELL, J. L. et al. Determination of Trace Element Profiles and Concentrations in Human Hair by Proton-Induced X-ray Emission Spectrometry, *Anal Chem*, 53:149-153, 1991.

DIAS CARNEIRO, M. T. W. *Determinação de elementos menores e traço em cabelo humano por ICP-MS, visando o estabelecimento de intervalos de referência para populações urbana e rural.* 1999. Tese (Doutorado), Departamento de Química, PUC-Rio, Rio de Janeiro, 1999.

ELINDER, C. G.; FRIBERG, L.; KJELLSTRÖM, T.; NORDBERG, G.; OBERDOERSTER, G. *Biological Monitoring of Metals by International Programme on Chemical Safety*, Geneve, 1994.

FLORES, E. M. M.; SAIDELLES, A. P. F.; BARIN, J. S.; MORTARI, S. R.; MARTINS, A. F. Hair sample decomposition using polypropylene vials for determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry, *J Anal At Spectrom*, 16:1419-1423, 2001.

KATZ, A. S.; CHATT, A. Hair Analysis - Applications in the Biomedical and Environmental Science, *VCH Publishers*, New York, 1988. 134p.

KINTZ, P. *Hair testing and doping control in sport. Toxicology Letters* 102-103:109-113, 1998.

MARZOCKI, M. C.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCKI, K. B. F. Chapter 10: Leishmaniose tegumentar americana In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais. *Atheneu*, São Paulo, p. 39-64, 1999.

MIEKELEY, N.; DIAS CARNEIRO, M. T. W.; PORTO DA SILVEIRA, C. L. How reliable are human hair reference intervals. *Sci Tot Environ* 218: 9-17, 1998.

MIEKELEY, N.; MORTARI, S. R.; SCHUBACH, A. O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated by leishmaniasis. *Anal Bioanal Chem* 372:495-502, 2002.

MORTARI, S. R. *Desenvolvimento de Procedimento para a Determinação de Selênio em Cabelo por HG-AAS*. Dissertação (Mestrado), Departamento de Química, UFSM, Santa Maria, 1997.

_____. *Determinação de concentração total de antimônio e de suas espécies químicas em amostras clínicas de pacientes com leishmanioses*. Tese (Doutorado), Departamento de Química, PUC-Rio, Rio de Janeiro, 2001.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; SCHUBACH, A.; MATTOS, M.; GONÇALVES, S. C.; PIRMEZ, C. Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dosage (5mg/kg/day) and high dosage (20mg/kg/day) antimony regimens. *Pathol Biol*, 45:496-499, 1997.

RAHMAN, L.; CORNS, W. T.; BRYCE, D. W.; STOCKWELL, P. B. Determination of mercury, selenium, bismuth, arsenic, and antimony in human hair by microwave digestion atomic fluorescence spectrometry. *Talanta* 52:833-843, 2000.

STEVENS, J. B. Determination of Aluminium, Copper and Zinc in Human Hair, *Atomic Spectroscopy*, 4:176-179, 1983.

TAGLIARO, F.; CAMILOT, M.; VALENTINI, R.; MENGARDA, F.; ANTONIAZZI, F.; TATÒ, L. Determination of thyroxine in the hair of newborns by radioimmunoassay with HPLC confirmation, *J Chromatogr, B*, 716:77-82, 1998.