

Cintia Xavier de Mello

Otimização do preparo de meio de cultura Schneider[®] para
o isolamento de *Leishmania* sp.

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2009

Otimização do preparo de meio de cultura
Schneider[®] para o isolamento de *Leishmania*
sp.

Cintia Xavier de Mello

Curso de Especialização em Controle da Qualidade em
Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância
Sanitária.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Prof^o. Dr^o Armi Wanderley da Nóbrega e
Prof^a. Dr^a Shirley de Mello Pereira Abrantes

Rio de Janeiro, 2009.

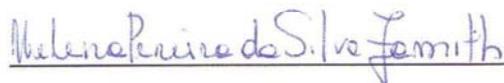
FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: Otimização do preparo de meio de cultura Schneider® para o isolamento de *Leishmania* sp.

Autor: Cintia Xavier de Mello

Monografia submetida à comissão examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Especialista em Controle de Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

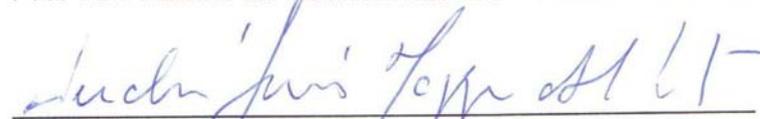
Aprovado:



Prof^a. Dr^a. Helena Pereira da Silva Zamith – INCQS/FIOCRUZ.



Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Madeira – IPEC/FIOCRUZ



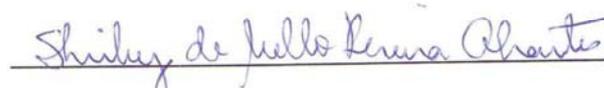
Prof^o. Dr^o. André Albert Mazzei – INCQS/FIOCRUZ

Orientadores:



e

Prof^o. Dr^o Armi Wanderley da Nóbrega



Prof^a. Dr^a Shirley de Mello Pereira Abrantes

Rio de Janeiro, 2009.

Mello, Cíntia Xavier de

Otimização do preparo de meio de cultura Schneider® para o isolamento de *Leishmania* sp./Cíntia Xavier de Mello. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

xiii, 39 p., il., tab., fig.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização em vigilância sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2008.

Orientadores: Armi Nóbrega e Shirley Abrantes

1. Leishmanioses. 2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 3. inibição do crescimento *in vitro*

A Deus

*“Se fui capaz de ver mais longe, é porque
me apoiei em ombros de gigantes”*

Newton

Agradecimentos:

A Deus, meu Pai celestial, fonte de toda a sabedoria e conhecimento e que até aqui me sustentou.

Aos meus pais, em especial minha mãe, pela dedicação dispensada a mim permitindo que eu chegasse até aqui.

As minhas irmãs Marcela e Rebeca por darem um colorido especial a minha vida.

Ao meu namorado Fábio pela compreensão e apoio durante todo o ano.

Ao INCQS, unidade na qual fui muito bem recebida e que me proporcionou um enorme crescimento e amadurecimento através deste curso me preparando para enfrentar novos desafios.

Ao IPEC, minha casa aonde venho desenvolvendo minha trajetória durante todos esses anos.

À Dr^a Fátima Madeira pelo incentivo e apoio, tendo um papel muito importante em mais essa etapa da minha vida.

Ao Dr^o Armi Nóbrega que não hesitou em aceitar o meu pedido de orientação, e me forneceu todo o apoio necessário durante o curso para realização deste trabalho.

À Dr^a Shirley Abrantes que abriu as portas do seu laboratório e se fez uma orientadora presente e amiga, sempre se dedicando e se empenhando para a finalização deste trabalho. Sua parceria ficará para sempre guardada em minha memória e coração.

Ao André Mazzei, sempre disposto para ajudar e sanar as dúvidas e que com a sua vasta experiência e competência me conduziu através dos caminhos da “cromatografia” enriquecendo sobremaneira todo o trabalho.

À Ana Paula Oliveira que me auxiliou e se tornou uma grande parceira de trabalho.

A toda a equipe do laboratório de contaminantes orgânicos sempre dispostos a ajudar em tudo que fosse necessário

Às coordenadoras deste curso, Kátia Leandro e Aparecida Boller, pela preocupação em oferecer sempre o melhor para nossa formação..

À toda equipe do laboratório de Vigilância em Leishmanioses pelo apoio sempre constante.

Aos colegas de turma pelos bons momentos que com certeza vão deixar saudades.

Resumo:

As Leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitidas pela picada de fêmeas de insetos conhecidos como flebotomíneos, apresentando-se sob duas formas clínicas: Leishmaniose tegumentar americana e Leishmaniose visceral. O diagnóstico de certeza é realizado por demonstração do parasito podendo ser feita através de inoculação de fragmentos de lesão ou outro material clínico em meios de cultura específicos. Um dos inconvenientes desse método é a possibilidade de contaminação da cultura, o que inviabiliza o exame. Para evitar essa contaminação alguns cuidados são tomados como a utilização de antibióticos (benzilpenicilina e estreptomicina) e antifúngico (flucitosina) que são adicionados à solução de coleta e a utilização de antibióticos no meio de cultura. O conhecimento da estabilidade e as concentrações ideais dos compostos utilizados são fatores importantes a serem considerados, pois podem determinar o sucesso do diagnóstico. Neste estudo avaliamos a estabilidade e o efeito dessas substâncias no crescimento do parasito *in vitro*. Para análise da estabilidade foi primeiramente desenvolvido um método para separação das substâncias de interesse por Cromatografia Líquida de alta eficiência que se mostrou muito eficaz para a separação, os resultados desta análise mostraram que o antibiótico benzilpenicilina sofreu cerca de 10% de degradação no prazo de 4 dias a 4 °C e cerca de 20% de degradação durante 24 horas a temperatura ambiente enquanto a concentração de estreptomicina permaneceu praticamente inalterada sob as mesmas condições. Esses resultados mostram a importância da utilização correta dessas soluções a fim de evitar perda da sua atividade. Com relação à inibição do crescimento do parasito *in vitro*, as concentrações de 1000, 500 U/mL de benzilpenicilina e 1000, 500 µg/mL de estreptomicina e flucitosina assim como 200 U/mL benzilpenicilina + 200 µg/mL estreptomicina mostraram inibição significativa do crescimento, mostrando que as concentrações de benzilpenicilina e estreptomicina na composição de culturas de *Leishmania sp.* devem ser abaixo de 200 U/mL e 200 µg/mL, respectivamente.

Abstract:

The Leishmaniasis is a group of infectious diseases, not contagious, caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania* and is transmitted by the bite of insects known as the female sandfly, presenting clinics in two forms: Leishmaniasis and Visceral Leishmaniasis. The diagnosis of certainty is achieved by demonstration of the parasite can be done by inoculation of fragments of injury or other clinical material in culture specific. One of the drawbacks of this method is the possibility of contamination of culture, which makes the examination to avoid contamination that some care is taken as the use of antibiotics (benzylpenicillin and streptomycin) and antifungal (flucytosine) that are added to the collection and use of solution of antibiotics in the culture medium. Knowledge of the stability and the optimal concentrations of the compounds used are important factors to be considered, as they may determine the success of the diagnosis. This study evaluated the stability and the effect of these substances in the growth of the parasite in vitro. For analysis of stability was first developed a method for separation of substances of interest by HPLC which was highly effective for the separation, the results of this analysis showed that the antibiotic benzylpenicillin suffered about 10% of degradation within 4 days to 4 °C and about 20% of degradation for 24 hours at room temperature while the concentration of streptomycin remained virtually unchanged under the same conditions. These results show the importance of correct use of these solutions to avoid loss of its activity. Regarding the inhibition of growth of the parasite in vitro, the concentrations of 1000, 500 U/mL benzylpenicillin and 1000, 500 µg/mL streptomycin and flucytosine and 200 U/mL benzylpenicillin + 200 µg/mL streptomycin showed inhibition significant growth, showing that concentrations of benzylpenicillin and streptomycin in the composition of cultures of *Leishmania sp.* must be below 200 U/mL and 200 µg/mL, respectively.

Lista de siglas e abreviaturas

CLAE: Cromatografia Líquida de alta eficiência

FDA: *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Ppm: Parte por milhão

U: unidades

UV: Ultravioleta

VIGILeish: Laboratório de vigilância em leishmanioses

μL: Microlitro

μg: Micrograma

Lista de tabelas:

Tabela 1	Constituição das duas fases móveis A e B em relação ao tempo	16
Tabela 2	Concentrações das substâncias analisadas com relação à inibição do crescimento do parasito <i>in vitro</i>	17
Tabela 3	Valores recomendados pelos ditames internacionais para os parâmetros de CLAE (FDA, 1994)	23

Lista de figuras:

Figura 1	Ácido 6-aminopenicilânico	10
Figura 2	Estrutura da benzilpenicilina	11
Figura 3	Estrutura tridimensional da estreptomicina	12
Figura 4	Estrutura da flucitosina	13
Figura 5	Espectro de absorção de benzilpenicilina.	18
Figura 6	Espectro de absorção de estreptomicina.	18
Figura 7	Espectro de absorção de flucitosina.	19
Figura 8	Espectro de absorção do meio de cultura Schneider®.	19
Figura 9	Cromatograma do meio de cultura Schneider sem adição de flucitosina, estreptomicina e benzilpenicilina (Branco).	20
Figura 10	Cromatograma do meio de cultura Schneider contendo flucitosina, estreptomicina e benzilpenicilina, nas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 200 U/mL.	21
Figura 11	Determinação da estabilidade de benzilpenicilina e estreptomicina durante 1440 min (24h) em temperatura ambiente.	24
Figura 12	Determinação da estabilidade de benzilpenicilina e estreptomicina durante 4 dias em temperatura 4 °C.	24
Figura 13	Curva de crescimento do parasito <i>L. braziliensis</i> , em diferentes concentrações de benzilpenicilina.	26
Figura 14	Curva de crescimento do parasito <i>L. braziliensis</i> em diferentes concentrações de estreptomicina.	28
Figura 15	Curva de crescimento do parasito <i>L. braziliensis</i> em diferentes concentrações de flucitosina.	29
Figura 16	Curva de crescimento do parasito <i>L. braziliensis</i> em associação de benzilpenicilina e estreptomicina	30

Lista de anexos:

Anexo 1	Instruções para o preparo do meio de cultura Schneider®
Anexo 2	Artigo publicado “Separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos antibióticos benzilpenicilina e estreptomicina e do antifúngico flucitosina em meio de cultura Schneider®”
Anexo 3	Certificado de participação na VI bienal de pesquisa da FIOCRUZ

Sumário:

1.	INTRODUÇÃO:	1
1.1.	Leishmaniose tegumentar Americana – LTA:.....	2
1.2.	Leishmaniose visceral americana - LVA	3
1.3.	Epidemiologia:	3
1.4.	Diagnóstico das leishmanioses:	5
1.4.1.	Isolamento em cultura de fragmentos de biópsia de lesão:	6
1.4.1.1.	Antimicrobianos utilizados:	9
1.4.1.2.	Benzilpenicilina	10
1.4.1.3.	Estreptomicina	11
1.4.1.4.	Flucitosina	12
2.	OBJETIVO:	13
2.1.	Objetivo geral	13
2.2.	Objetivos específicos	13
3.	METODOLOGIA:	13
3.1.	Materiais:	13
3.2.	Instrumental:	14
3.3.	Determinação do comprimento de onda para análise através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):	15
3.4.	Desenvolvimento do método de separação por CLAE:.....	15
3.5.	Análise da estabilidade dos antimicrobianos.....	16
3.6.	Avaliação do efeito de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina no crescimento do parasito <i>in vitro</i> :	16
4.	RESULTADOS:	17
4.1.	Determinação do melhor comprimento de onda para as análises:.....	17
4.2.	Desenvolvimento de método de separação das substâncias presentes no meio de cultura Schneider®:	19
4.3.	Análise da estabilidade:	23
4.4.	Avaliação do efeito de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina no crescimento do <i>L. braziliensis in vitro</i> :	25
5.	DISCUSSÃO:	31
5.1.	Análise da estabilidade:	31
5.2.	Avaliação do efeito de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina no crescimento de <i>L. braziliensis "in vitro"</i> :.....	33
6.	CONCLUSÕES:	35
7.	BIBLIOGRAFIA:	36
8.	ANEXOS:	

Anexo 1 - Instruções para o preparo de meio de cultura Schneider®

Anexo 2 - Artigo publicado "Separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos antibióticos benzilpenicilina e estreptomicina e do antifúngico flucitosina em meio de cultura Schneider®"

Anexo 3 - Certificado de participação na VI bienal de pesquisa da FIOCRUZ

1. INTRODUÇÃO:

As Leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

São parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra com flagelo internalizado ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007)

Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitos assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. Todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da sub-família Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos as leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Ali, as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sangüíneo, se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas, sendo posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante um segundo repasto sangüíneo. (GONTIJO e CARVALHO, 2003)

No Novo Mundo, as leishmanioses podem ser agrupadas em Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (que acomete a pele e as mucosas das vias aero-digestivas superiores) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA) (doença sistêmica que acomete particularmente fígado, baço, medula óssea e linfonodos) de acordo com os distintos tropismos das diferentes espécies envolvidas na infecção.

Estima-se que em todo o mundo 350 milhões de pessoas estejam expostas à doença e que 12 milhões adoecem. A incidência anual é de 1,5 - 2 milhões de novos casos da forma tegumentar e de 500 mil da forma visceral (WHO, 1990).

1.1. Leishmaniose tegumentar Americana – LTA:

A Leishmaniose tegumentar se caracteriza por apresentar lesões de pele, que podem ser localizadas (única ou múltiplas), disseminada (lesões numerosas em várias áreas do tegumento) e difusa. Na maioria das vezes, a doença apresenta-se como uma lesão ulcerada única. A forma mucosa é habitualmente secundária à lesão cutânea, podendo ocorrer concomitantemente ou após a resolução da doença cutânea. Em áreas de transmissão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* cerca de 3% dos pacientes com leishmaniose cutânea irão desenvolver a forma mucosa da doença denominada de espúndia.(LESSA et al., 2007).

Nas formas cutâneas localizadas e múltiplas, a lesão ulcerada é a mais comum e se caracteriza por apresentar bordas elevadas, em moldura, sendo o fundo granuloso, com ou sem exsudação. Em geral, as úlceras são indolores.

A forma cutânea disseminada caracteriza-se por lesões ulceradas pequenas, distribuídas por todo o corpo através de disseminação hematogênica. Seu prognóstico é ruim, por não responder adequadamente à terapêutica.

A apresentação mucosa da LTA é, na maioria das vezes, secundária às lesões cutâneas, surgindo geralmente meses ou anos após a resolução das lesões de pele. Às vezes, porém, não se identifica a porta de entrada, supondo-se que as lesões sejam originadas de infecção subclínica. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005)

No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007)

É uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle. (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

1.2. Leishmaniose visceral americana - LVA

A leishmaniose visceral, ou calazar é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem (GONTIJO e MELLO, 2004). Foi primariamente uma zoonose, caracterizada como doença de caráter eminentemente rural, entretanto vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte tornando-se um problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica. É uma doença crônica, sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, astenia, adinamia e anemia, dentre outras manifestações. Quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005)

O parasito tem tropismo por células do sistema reticulo endotelial (baço, fígado e medula óssea) e é causada por *L. donovani* no velho mundo e *L. infantum* (sin.: *L. chagasi*) no novo e velho mundo. (WHO, 1990)

1.3. Epidemiologia:

As Leishmanioses ocorrem em diferentes ambientes, sendo endêmicas em 88 países dos continentes Americano, Africano, Asiático e Europeu (WHO, 1990)

A notificação da doença é compulsória, no entanto, somente é realizado em cerca de 30 dos 88 países afetados, denotando que as taxas de incidência possam ser maiores que as declaradas. (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

A distribuição geográfica está associada às regiões tropicais e subtropicais, onde existe uma maior densidade de espécies vetoras, dos gêneros *Phlebotomus*, responsáveis pela transmissão no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Nos últimos anos, as leishmanioses têm sido incriminadas, junto com outras doenças também transmitidas por artrópodes, como uma doença emergente e reemergente, principalmente nos países da Europa e América do Sul, onde está associada à co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ALVAR et al., 1997).

Em muitos países tropicais e subtropicais ao redor do mundo, as infecções parasitárias como as Leishmanioses, afetam o desenvolvimento social e econômico. A urbanização, o aumento da população humana, da migração paralela ao desenvolvimento da agricultura, e a propagação do HIV /

AIDS, têm contribuído para o aumento da leishmaniose e disseminação desta em diversos países, sendo que a disseminação da doença em determinada região se dá devido à combinação entre espécies apropriadas de vetores (insetos flebotomíneos) e reservatórios. (LIMONCU et al., 2004).

Admite-se que nas Américas, a LTA seja autóctone, como sugerem os inúmeros registros da doença mucosa feitos em vasos de cerâmica pré-colombiana confeccionados por índios no Peru e no Equador. A prevalência da infecção humana varia de acordo com a região geográfica e a espécie de *Leishmania* envolvida (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994).

No Brasil apresenta-se em expansão geográfica, sendo que nas últimas décadas, estudos têm sugerido mudanças nos padrões epidemiológicos. Inicialmente considerada zoonose de animais silvestres que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, a LTA começa a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e em regiões periurbanas. Observa-se a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou de áreas próximas a eles, e pelo aparecimento de surtos epidêmicos associados a fatores decorrentes do surgimento de atividades econômicas como garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, em condições ambientais altamente favoráveis à transmissão da doença.

Ao analisar a evolução da LTA, observa-se uma expansão geográfica, sendo que no início da década de 1980 foram registrados casos autóctones em 19 unidades federadas. Nos últimos anos, todos os estados registraram autoctonia da doença. A região Nordeste vem contribuindo com o maior número de casos (cerca de 40% do total registrado no período) e a região Norte com os coeficientes mais elevados (93,84 por 100 mil habitantes), seguidas pelas regiões Centro-Oeste (42,70 por 100 mil habitantes) e Sudeste (26,50 por 100 mil habitantes).

A Leishmaniose é uma doença sazonal apresentando picos de incidência a cada cinco anos.

No Estado do Rio de Janeiro ocorrem cerca de 300 novos casos de leishmaniose tegumentar por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007) e casos de LTA são notificados em 90,2% dos 92 municípios. A maior concentração de casos ocorre no Município do Rio de Janeiro na região do Litoral Sul Fluminense.

A leishmaniose visceral é uma doença endêmica com registro de surtos freqüentes no Brasil. Inicialmente, sua ocorrência estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas atualmente encontra-se em franca expansão para grandes centros. A leishmaniose visceral está distribuída em 19 estados da Federação, atingindo quatro das cinco regiões brasileiras. Nos últimos dez anos, a média anual de casos de leishmaniose visceral foi de 3,38 casos; e a incidência, de 2,00 casos por 100 mil habitantes. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005)

A doença é mais freqüente em menores de 10 anos. A razão da maior susceptibilidade em crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular agravada pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de maior exposição ao vetor no peridomicílio. Por outro lado, o envolvimento do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da leishmaniose visceral, pelas formas oligossintomáticas ou assintomáticas, além das formas com expressão clínica.

No Estado do Rio de Janeiro ocorrem cerca 5 novos casos de Leishmaniose visceral por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003)

1.4. Diagnóstico das leishmanioses:

Deve ser baseado na clínica, histopatologia e aspectos imunológicos da doença. O diagnóstico laboratorial da leishmaniose consiste fundamentalmente em 3 grupos de exames: exames parasitológicos (demonstração direta do parasito e isolamentos *in vivo* e *in vitro*, histopatológicos), testes imunológicos (testes intradérmico e sorológicos), testes moleculares (PCR) e exames complementares (hematológicos, bioquímicos) (ÁVILA,1996; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). A confirmação do diagnóstico e a identificação da espécie de *Leishmania* têm extrema importância tanto pelas razões clínicas dos pacientes acometidos, como por razões epidemiológicas da região endêmica envolvida (BELLI, 1998), entretanto em diversas regiões do Brasil, o diagnóstico é muitas vezes baseado somente na apresentação clínica das lesões e quando possível associado ao teste intradérmico (Reação de Montenegro), que quando positivo, não exclui outras infecções.

Na LTA deve-se considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças como a sífilis, hanseníase, paracoccidiodomicose, sarcoidose, cromoblastomicose, úlceras decorrentes da anemia falciforme, piodermites,

tumores, vasculites, tuberculose, esporotricose entre outros, sendo para isso a comprovação parasitológica necessária (SCHUBACH et al., 2001).

A demonstração do parasito pode ser feita em material de biópsia de lesão no caso de suspeita de LTA ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos no caso de suspeita de LVA. O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório (GONTIJO e MELO, 2004), estas tem sido as técnicas convencionais geralmente utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses (VEGA-LÓPEZ, 2003)

A especificidade destes métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitos não é homogênea no mesmo tecido além da quantidade de parasitos ser muito pequena. Nesse contexto podemos citar também, a variação de métodos entre laboratórios, que interferem nesse processo (GONTIJO e MELO, 2004),

1.4.1. Isolamento em cultura de fragmentos de biópsia de lesão:

O isolamento em meio de cultura é considerado padrão ouro no diagnóstico, pois além de confirmar o diagnóstico clínico, preserva o parasito isolado para utilização em outros estudos, como identificação de espécies de *Leishmania* por métodos moleculares ou bioquímicos (IHALAMULLA, RAJAPAKSA E KARUNAWEEERA, 2005; VEGA-LÓPEZ, 2003).

O parasito cresce relativamente bem em diversos meios de cultura à temperatura ambiente (24-26 °C) (GONTIJO e CARVALHO, 2003). Os meios comumente empregados para o isolamento de amostras clínicas são bifásicos com uma fase sólida de Agar sangue e uma líquida dispostos em tubo de vidro (IHALAMULLA, RAJAPAKSA E KARUNAWEEERA, 2005). O meio mais empregado para isolamento é o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle – NNN, acrescido de meio líquido Schneider e suas modificações, suplementado com soro fetal bovino (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

A demonstração direta e cultivo dos parasitos das lesões de pacientes são muito difíceis por muitas razões, como o tamanho limitado da amostra (biópsia ou aspirados) que podem ser obtidos, o reduzido número de parasitos presentes e especialmente a contaminação secundária por bactérias e fungos. (PALOMINO, GUERRA e LUMBRERAS, 1983).

A positividade aumenta quando são tomados cuidados técnicos na coleta, tais como desinfecção prévia da lesão, acondicionamento do fragmento em solução salina com antibiótico, transporte sob refrigeração e processamento do material em condições assépticas. Essas medidas diminuem a possibilidade de contaminação, que dificultam o crescimento da *Leishmania* e conseqüentemente diminuem a possibilidade de isolamento (DA-CRUZ e PIRMEZ, 2005).

A persistência de contaminação de culturas primárias não somente por bactérias, mas também por fungos dificulta o isolamento de protozoários hemoflagelados patogênicos (OKOT-KOTBER, 1985), sendo a contaminação por fungos comum especialmente em material obtido de lesões de pacientes (KIMBER et al., 1981). No caso de material obtido de lesões mucosas o isolamento do parasito é muito difícil devido à presença de contaminantes provenientes da microbiota natural do paciente (PALOMINO, GUERRA e LUMBRERAS, 1983).

É desejável obter um meio de cultura que permita o crescimento do protozoário, mas iniba ou retarde o crescimento de contaminantes (bactérias e fungos), permitindo dessa forma o isolamento dos parasitos. (PALOMINO, GUERRA e LUMBRERAS, 1983)

Para diminuir o índice de contaminação secundária das culturas, o que inviabiliza o exame, são utilizados antibióticos como benzilpenicilina e estreptomicina no meio de cultura (PALOMINO, GUERRA e LUMBRERAS, 1983), porém a escolha da concentração destes antibióticos para o cultivo de protozoários tem sido empírico e necessita de padronização para o uso correto (MÄSER et al., 2002). De acordo com Palomino, Guerra e Lumbreras, 1983, o uso de antifúngicos deve ser evitado porque se supõem que eles causem dano a *Leishmania sp.*, que são organismos eucarióticos, porém o índice de contaminação secundária por fungos em meio de cultura é alto, sendo este um fator que pode impossibilitar o diagnóstico da doença.

Muitas soluções de antibióticos e antifúngicos não são estáveis e não podem ser mantidas por longos períodos (VERMES, VAN DER SIJS e GUCHELAAR, 1999; OKERMAN, VAN HENDE, e ZUTTER, 2007) dessa forma, o conhecimento da estabilidade e viabilidade dessas substâncias que são adicionadas aos meios de cultura para esse fim é de extrema importância, por outro lado, devem se buscar concentrações que sejam ideais, de modo que

tais substâncias não provoquem interferências no isolamento e crescimento do protozoário (PALOMINO, GUERRA e LUMBRERAS, 1983).

Existem variações com relação à técnica de isolamento de *Leishmania* sp. a partir de fragmentos de lesão. No laboratório de vigilância em leishmanioses (VIGILeish) – IPEC/FIOCRUZ que faz parte da rede de laboratórios de referência para o Ministério da Saúde, onde parte desse trabalho foi realizado essa técnica segue o descrito a seguir. Anteriormente ao procedimento de biópsia da lesão é importante que se tomem alguns cuidados para evitar a contaminação do meio de cultura o que inviabilizaria o exame. Alguns desses cuidados são administrados por via oral de antibióticos ao paciente, a lavagem da lesão com água e sabão antes da biópsia, a utilização de antibióticos como benzilpenicilina e estreptomicina e antifúngico como flucitosina no recipiente de coleta e a utilização de antibióticos como benzilpenicilina e estreptomicina no meio de cultura. Apesar de possuir utilização bastante controversa no VIGILeish o antifúngico flucitosina é utilizado na solução salina de coleta da amostra (biópsia de tecido), porque entende-se que como o parasito é intracelular ele estaria protegido da ação do antifúngico nestas condições.

A biópsia é realizada retirando-se um fragmento do bordo da lesão. É importante que esse fragmento possua camadas de epiderme, derme e endoderme na sua profundidade e borda externa e interna na sua espessura, isso se faz necessário devido à distribuição não uniforme do parasito na lesão, dessa forma então se aumentam as chances de isolamento do parasito.

Esse fragmento é inoculado em recipiente contendo solução salina estéril, suplementada com antibióticos como benzilpenicilina (1200 U/mL) de estreptomicina (1000 µg/mL) e o antifúngico flucitosina (100 µg/mL), e enviado ao laboratório. No laboratório em capela de fluxo laminar o fragmento de biópsia é colocado em um novo recipiente contendo solução salina estéril com a mesma composição acima citada, permanecendo nesta solução por 24 horas. Esse procedimento é realizado a fim de diminuir a carga microbiana proveniente da lesão.

Após 24 horas esse fragmento de biópsia é inoculado em meio de cultura bifásico contendo uma fase sólida de Agar sangue, preparado com sangue de coelho desfibrinado e meio de cultura líquido Schneider[®]. O Agar sangue fornece ao parasito o nutriente chamado hemina, e o meio líquido

Schneider[®] possui muitos aminoácidos sendo um dos mais ricos existentes no mercado, sua composição se encontra em anexo (anexo 1). Essa composição completa de aminoácidos facilita o crescimento do parasito, além disso, esse meio é suplementado com soro fetal bovino inativado (Inativação do sistema complemento) e estéril que possui o hormônio fator de crescimento estimulando ainda mais o crescimento do parasito. Esse meio pode ainda ser suplementado com urina humana estéril que devido a alta concentração de nitrogênio fornece nutrientes a mais para o parasito. Para inibir a contaminação são adicionados também ao meio de cultura antibióticos como benzilpenicilina e estreptomicina na concentração de 200 U/mL e 200 µg/mL, respectivamente.

O fragmento de lesão permanece por até um mês no meio de cultura para que seja dado um resultado negativo para o exame, em caso de resultado positivo, ou seja, isolamento do parasito este é armazenado no laboratório em botijões de nitrogênio líquido para estudos futuros.

O isolamento em cultura tem a vantagem de amplificar o parasito presente na lesão, geralmente em pequenas quantidades, aumentando a chance de visualização deste.

1.4.1.1. Antimicrobianos utilizados:

Os antibióticos utilizados a longo tempo na rotina laboratorial para inibição da contaminação em meios de cultura são benzilpenicilina e estreptomicina (COHEN, LOOIJ e WITTNER, 1977; PALOMINO, GUERRA e LUMBRERAS, 1983), apesar do crescimento dos protozoários ser variável, geralmente toleram estas substâncias em concentrações muito mais elevadas do que a concentração inibitória mínima (MIC) para a maioria das bactérias. O uso de antifúngicos tem sido evitado porque se supõe que seja danoso aos parasitos (PALOMINO, GUERRA e LUMBRERAS, 1983). Essa afirmativa é uma verdade para antifúngicos do grupo dos poliênicos (anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, fluconazol) que tem seu mecanismo de ação baseado no bloqueio da biosíntese de ergosterol, por interferir na demetilação do lanosterol, causando acumulação de 14 α - metilesterol na membrana gerando alterações na permeabilidade da célula, levando-a a morte. A via de biossíntese de esterol de fungos e *Leishmania* são bastante similares o que leva a uma resposta similar à ação desses antifúngicos (BEACH, GOAD e

HOLZ, 1988; BERMAN, HOLZ e BEACH, 1984). Para antifúngicos de outros grupos como, por exemplo, os antimetabólicos que inibem a síntese de DNA e RNA, no qual está incluída o antifúngico flucitosina, não há confirmação de uma ação leishmanicida, porém alguns autores não aconselham sua utilização devido à possibilidade da inibição do crescimento do parasito.

1.4.1.2. Benzilpenicilina

A Penicilina é um antibiótico β -lactâmico, natural ou sintético derivado de fungos, que possui a estrutura básica composta por um anel tiazolidínico (a) fixado a um anel β -lactâmico (b), que contém um grupo amino secundário (c) podendo haver ligação de substituintes ao grupo amino. A integridade estrutural do núcleo de ácido 6-aminopenicilânico (Figura 1) é essencial para a atividade biológica dessas substâncias (MILLER, 2002).

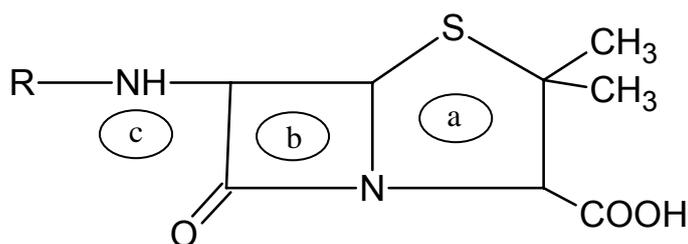


Figura 1: Ácido 6-aminopenicilânico

A benzilpenicilina (Figura 2) como todos os antibióticos β -lactâmicos inibem o crescimento bacteriano ao interferir em uma etapa da síntese da parede celular bacteriana, ao se ligar a enzimas que produzem ligações cruzadas para formação da parede celular bacteriana, gerando morte celular. (MILLER, 2002). As penicilinas são ativas contra bactérias Gram - positivas.

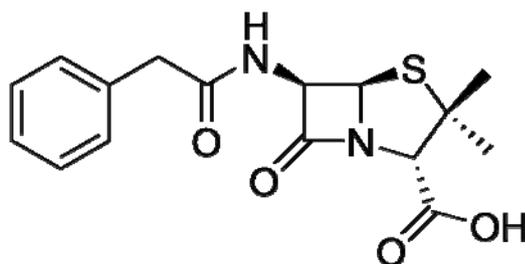


Figura 2: Estrutura da benzilpenicilina.

1.4.1.3. Estreptomicina

A estreptomicina (Figura 3) é um antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos, com ação bactericida originalmente obtido de várias espécies de *Streptomyces*. São utilizados amplamente contra bactérias Gram – negativas. Os aminoglicosídeos possuem um núcleo de hexose, a estreptidina (na estreptomicina) ao qual estão fixados vários aminoaçúcares por ligações glicosídicas. Os aminoglicosídeos são estáveis em solução e mais ativos em pH alcalino do que em ácido. Com frequência apresentam sinergismo com os β -lactâmicos ou com a vancomicina *in vitro*. Todavia os aminoglicosídeos em altas concentrações podem formar complexos com agentes β -lactâmicos, resultando em perda de atividade, de modo que estes fármacos não devem ser misturados para a administração. Esse antibiótico inibe o crescimento bacteriano por inibição irreversível da síntese de proteínas, induzindo assim a morte celular (KATZUNG, 2005).

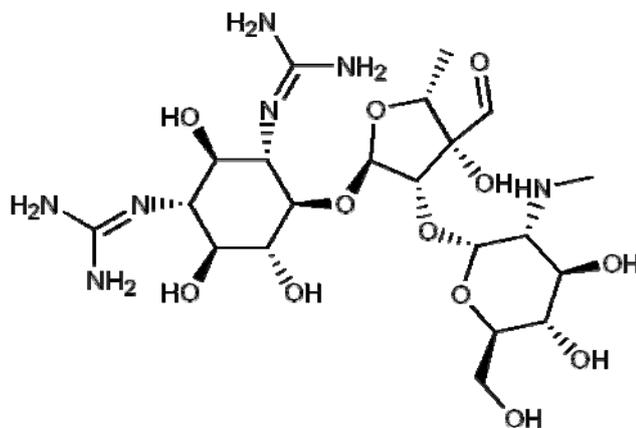


Figura 3: Estrutura tridimensional da estreptomicina

1.4.1.4. Flucitosina

O antifúngico flucitosina (5-FC) (Figura 4) foi descoberto durante pesquisa de novos fármacos antineoplásicos, embora desprovida de propriedades antineoplásicas, tornou-se evidente que se tratava de um potente antifúngico. A flucitosina é um análogo hidrossolúvel da pirimidina relacionado com o agente quimioterápico fluorouracil.

Seu mecanismo de ação se dá pela sua captação pelas células fúngicas através da enzima citosina permease. No interior da célula é convertida inicialmente em fluorouracil e, a seguir, em 5 – fluorodesoxiuridina monofosfato (F-dUMP) e fluorouridina trifosfato (FUTP), que inibem a síntese de DNA e RNA, respectivamente. As células humanas são incapazes de converter o fármaco em seus metabólitos ativos (KATZUNG, 2005).

A flucitosina não se encontra mais disponível para uso no Brasil (Moreira, 2005). Na América do Norte a flucitosina é disponível apenas em formulação oral, seu uso clínico atualmente se limita à associação com anfotericina B para tratamento da meningite criptocócica ou com Itraconazol para cromoblastomicose, pelo seu sinergismo e boa penetração no sistema nervoso central (KATZUNG, 2005).

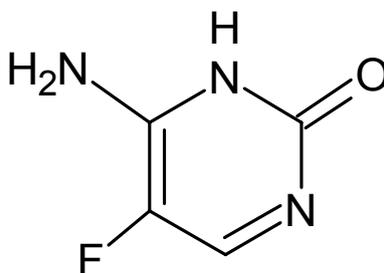


Figura 4: Estrutura da flucitosina.

Tendo em vista a dificuldade de diagnóstico da doença e o crescente aumento desta endemia, considera-se, ser de grande importância procurar, hoje, dentro da realidade do país, aperfeiçoar os métodos disponíveis em todos os níveis de saúde que permitam direcionar a terapêutica e melhorar o prognóstico da doença (Sampaio et al. 2002).

2. OBJETIVO:

2.1. Objetivo geral

Avaliar a estabilidade de antimicrobianos (benzilpenicilina e estreptomicina) incorporados no meio de cultura Schneider[®] e verificar os efeitos de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina no crescimento de *Leishmania (Viannia) braziliensis in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver o método de separação dos antibióticos benzilpenicilina e estreptomicina e do antifúngico flucitosina pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Avaliar a estabilidade de benzilpenicilina e estreptomicina em meio de cultura Schneider[®], utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.
- Verificar efeitos de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina em meio de cultura Schneider[®], em diferentes concentrações, no crescimento *in vitro* de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

3. METODOLOGIA:

3.1. Materiais:

Para os diferentes ensaios deste estudo foram utilizados os seguintes reagentes:

- a) Meio de cultura Schneider[®] (Sigma S9895). Este meio foi preparado segundo recomendações do fabricante e conservado a temperatura de 4 °C.
- b) Benzilpenicilina (Padrão USP, n° cat: 1502508) – Este reagente foi utilizado na fase de desenvolvimento da técnica de separação por CLAE, sendo solubilizado em água obtida por processo de osmose reversa.
- c) Sulfato de estreptomicina (Padrão USP, n° cat: 1623003) – Este reagente foi utilizado na fase de desenvolvimento da técnica de separação por CLAE, sendo solubilizado em água obtida por processo de osmose reversa.

- d) Flucitosina (Padrão USP, n° cat: 1272000) – Este reagente foi utilizado na fase de desenvolvimento da técnica de separação por CLAE, sendo solubilizado em água obtida por processo de osmose reversa.
- e) Benzilpenicilina (Calbiochem) – A solução foi preparada dissolvendo-se determinada quantidade de benzilpenicilina em pó em água obtida por processo de osmose reversa. Quando necessário a solução foi esterilizada por filtração utilizando membrana de 0,22 micrômetros, em capela de fluxo laminar. Essa substância é destinada somente para uso *in vitro*.
- f) Sulfato de Estreptomicina (FURP - Fundação para o remédio popular)- Essa amostra foi fornecida pelo serviço de farmácia do IPEC. Foi preparada dissolvendo todo o conteúdo (1 g) em 20 mL de água obtida por processo de osmose reversa (quando necessário utilizava-se água esterilizada) e posteriormente eram realizadas as diluições para as concentrações desejadas. Essa substância é destinada somente para uso *in vivo*.
- g) Flucitosina (Sigma, n° cat: F7129) – Todo o conteúdo do frasco (1g) foi dissolvido em 100 mL de água obtida por processo de osmose reversa, Quando necessário essa solução foi esterilizada por filtração utilizando membrana de 0,22 micrômetros, em capela de fluxo laminar e se necessário diluída para a concentração desejada. Essa substância é destinada somente para uso *in vitro*.
- h) Ácido heptano-sulfônico – (Sigma, n° cat: H-8901).
- i) Ácido *orto*-fosfórico – (Merck)
- j) Acetonitrila (VETEC)
- k) *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). Cepa referência obtida de infecção em mamífero, humano, do sexo feminino, em 1975, no Brasil, sendo caracterizada por diferentes métodos de identificação.

Todas as soluções foram preparadas no momento do uso.

3.2. Instrumental:

Para as diferentes análises realizadas foram utilizados os seguintes equipamentos:

Espectrofotômetro modelo Cary 50 - Marca Cary.

Cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Waters composto de bomba quaternária modelo 600, auto-injetor 747 e detector UV modelo 2487. A coluna utilizada foi octadecilsilano marca SYMMETRY™, 5 µm, (250 x 4,6) mm e 100 Å de diâmetro de poro.

3.3. Determinação do comprimento de onda para análise através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

Para determinação do comprimento de onda para realização das análises foram preparadas soluções de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina na concentração de 10 µg/mL (ppm), solubilizadas em água e uma amostra de meio de cultura puro. Posteriormente foi obtido um espectro de varredura no UV das soluções.

3.4. Desenvolvimento do método de separação por CLAE:

Para o desenvolvimento de um método eficaz de separação por CLAE, primeiramente foi analisado o meio de cultura Schneider® sem adição de nenhum antimicrobiano.

A fase móvel utilizada na eluição por gradiente foi composta por duas fases. Fase A: solução 1 g/L de heptano-sulfonato de sódio (HEPSO₃⁻Na⁺) e quantidade suficiente de ácido *orto*-fosfórico 85% para ajustar o pH em 2,2 e fase B: acetonitrila grau CLAE (ACN), seguindo o gradiente descrito na tabela 1 apresentada a seguir:

Tabela 1: Constituição das duas fases móveis A e B em relação ao tempo

Tempo (min)	Fase A H ₂ O:HEPSO ₃ ⁻ Na ⁺	Fase B ACN
0	95	5
5,0	95	5
5,3	80	20
20	67,5	32,5

30	55	45
30,3	95	5
50	95	5

O fluxo da fase móvel foi 1 mL/min. A coluna foi mantida a 27 °C e o volume de injeção foi 20 µL.

3.5. Análise da estabilidade dos antimicrobianos

Para análise da estabilidade dos antimicrobianos o meio de cultura Schneider[®] foi suplementado com benzilpenicilina na concentração de 200 U/mL e estreptomicina na concentração de 200 µg/mL e as análises foram realizadas de acordo com o método descrito anteriormente.

A solução a ser analisada foi injetada 3 vezes sucessivas no equipamento para obtenção de uma maior precisão analítica.

3.6. Avaliação do efeito de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina no crescimento do parasito *in vitro*:

Para avaliar efeito de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina no crescimento do parasito *in vitro* foram realizadas curvas de crescimento utilizando uma cepa referência de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). Essa cultura se encontrava em crescimento exponencial, em meio de cultura líquido Schneider[®] suplementado de 10% de soro fetal bovino, contendo diferentes concentrações dos insumos a serem testados. A quantificação parasitária foi realizada em câmara de Neubauer, em triplicata, diariamente até a fase de declínio da cultura. Utilizou-se como controle dos experimentos o mesmo meio de cultura, porém sem adição de quaisquer antibióticos e antifúngico. As concentrações testadas são mostradas na Tabela 2 a seguir:

Tabela 2: Concentrações das substâncias avaliadas com relação à inibição do crescimento de *Leishmania braziliensis in vitro*

Substâncias avaliadas	Concentrações de antimicrobianos inoculados em cultura axênica de <i>L. braziliensis</i> .			
Benzilpenicilina	1000 U/mL (B1000)	500 U/mL (B500)	200 U/mL (B200)	100 U/mL (B100)
Estreptomicina	1000 µg/mL (E1000)	500 µg/mL (E500)	200 µg/mL (E200)	100 µg/mL (E100)
Flucitosina	1000 µg/mL (F1000)	500 µg/mL (F500)	200 µg/mL (F200)	100 µg/mL (F100)
Benzilpenicilina e Estreptomicina	-	-	200 U/mL benzilpenicilina + 200µg/mL estreptomicina (P+E)	-

A concentração de 200 U/mL benzilpenicilina + 200 µg/mL estreptomicina (P+E), foi analisada por ser a concentração utilizada nos exames de rotina para o diagnóstico parasitológico indireto do Laboratório de vigilância em leishmanioses - VIGILeish, onde parte deste trabalho foi desenvolvido.

A análise estatística dos dados foi realizada através do teste *t* de Student, paramétrico unicaudal em nível de significância de 2,5% (0,025), para verificação da inibição do crescimento do parasito *in vitro* considerando o dia de pico da fase log da curva.

4. RESULTADOS:

4.1. Determinação do melhor comprimento de onda para as análises:

Para análise da estabilidade das substâncias por CLAE, primeiramente determinou-se qual seria o melhor comprimento de onda para se trabalhar. As análises por espectrofotometria no UV revelaram o comprimento de onda de 200 nm preferencial para detecção, pois nesse comprimento de onda há uma absorção razoável de todas as substâncias inclusive do meio de cultura, como mostram os espectros de varredura de 190 a 300 nm das substâncias:

benzilpenicilina (Figura 5), estreptomicina (Figura 6), flucitosina (Figura 7) e do meio de cultura (Figura 8).

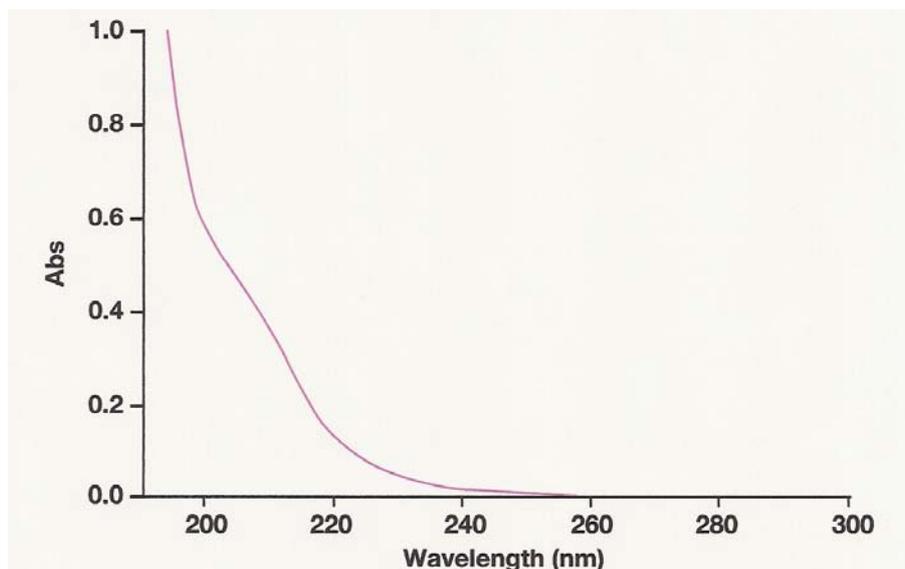


Figura 5: Espectro de absorção de benzilpenicilina

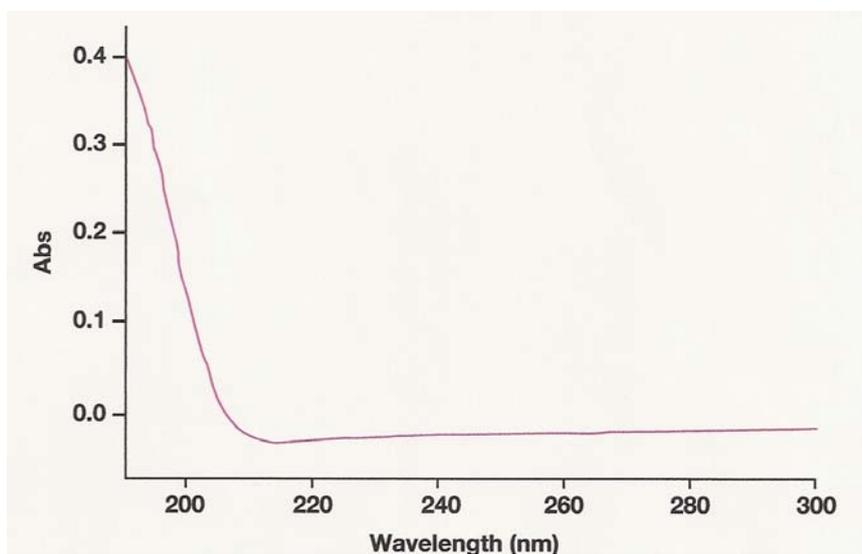


Figura 6: Espectro de absorção de estreptomicina

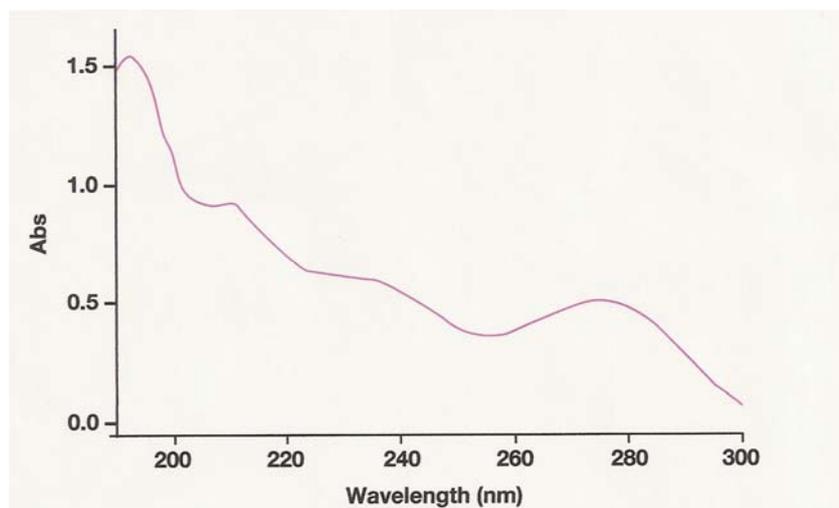


Figura 7: Espectro de absorção de flucitosina.

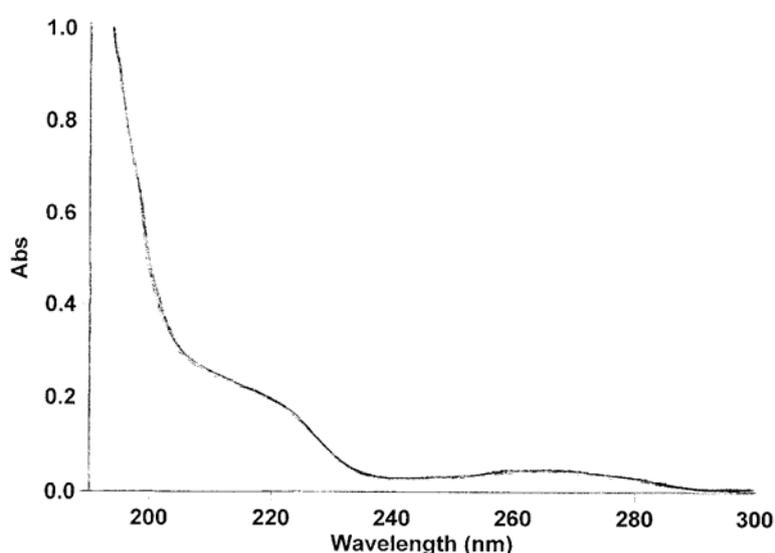


Figura 8: Espectro de absorção do meio cultura Schneider[®].

4.2. Desenvolvimento de método de separação das substâncias presentes no meio de cultura Schneider[®]:

Para análise da estabilidade das substâncias foi necessário otimizar o cromatograma para separação, já que as substâncias de interesse se encontravam adicionadas a um meio de cultura. As condições cromatográficas empregadas, possibilitaram a separação das substâncias presentes no meio de cultura, já que este constituía o maior desafio do método desenvolvido, pois esse meio onde estavam as substâncias de interesse possuía muitos aminoácidos em sua composição que absorviam também no comprimento de

onda utilizado gerando muitos sinais no cromatograma, sendo assim o método desenvolvido deveria permitir a separação sem coeluição.

O cromatograma mostrado na Figura 8 abaixo é referente ao meio de cultura sem adição de flucitosina, estreptomicina e benzilpenicilina.

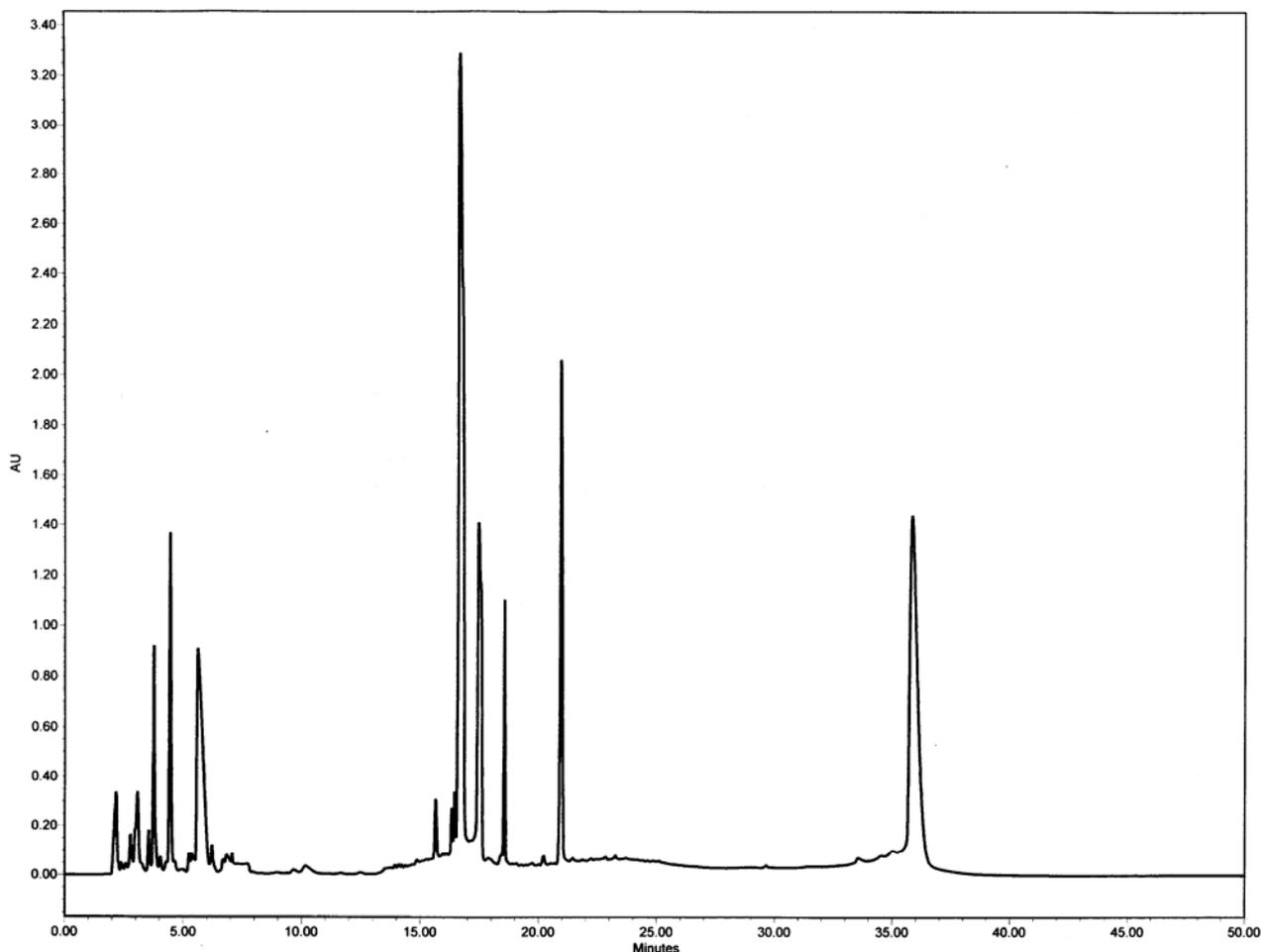


Figura 9: Cromatograma do meio de cultura Schneider sem adição de flucitosina, estreptomicina e benzilpenicilina (Branco).

O cromatograma mostrado na Figura 9 apresenta a separação dos picos correspondentes a flucitosina, estreptomicina e benzilpenicilina em meio de cultura Schneider[®] nas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 200 U/mL, com tempos de retenção de 10,98; 21,92 e 23,62 minutos, respectivamente.

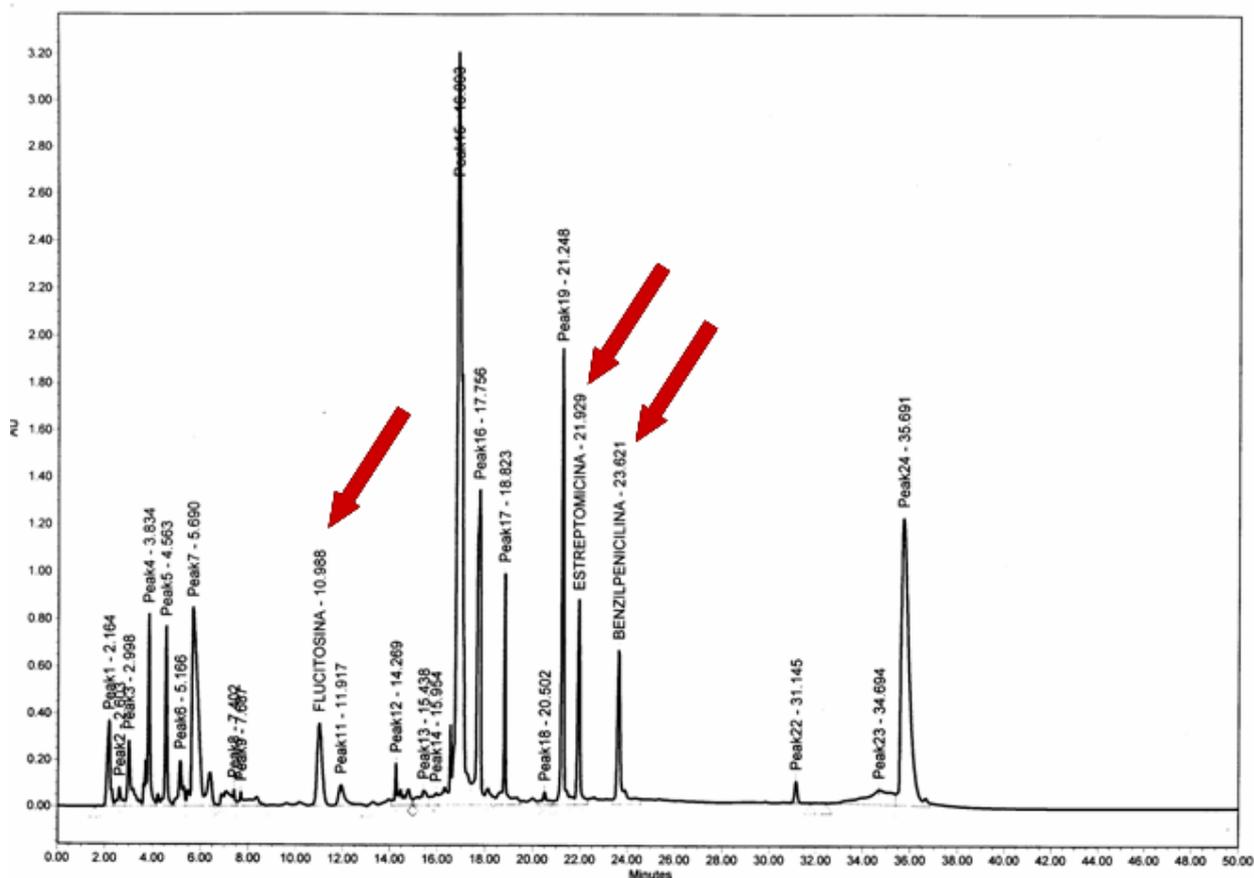


Figura 10: Cromatograma do meio de cultura Schneider contendo flucitosina, estreptomicina e benzilbenzilpenicilina, nas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 200 U/mL, respectivamente.

Observando-se as estruturas da benzilpenicilina (Figura 2), da estreptomicina (Figura 3) e da flucitosina (Figura 4) e os seus respectivos valores de pKa optou-se por trabalhar fazendo pareamento iônico dos grupamentos amina com alquilsulfonato em meio ácido em pH de 2,2. Este valor de pH esta dentro da faixa operacional da coluna, recomendada pelo fabricante, de 2,0 a 8,0. A estreptomicina possui três grupos amina tituláveis, sendo que dois deles são grupos guanidina fortemente alcalinos ($pK_{a2} = 11,5$ e $pK_{a3} = 12,1$). O outro grupo trata-se do metilamino que pode ser considerado como fracamente básico ($pK_{a1} = 8$) em comparação aos demais. (NYS, 1971)

Nestas condições de pH a estreptomicina estará na forma totalmente ionizada facilitando assim o pareamento iônico com o ácido 1-heptanosulfônico. A flucitosina possui dois valores de pKa, um referente a lactama que é uma amina aromática de anel heterocíclico, considerada uma base forte, cujo valor é 10,7 (pK_{a1}) e o outro refere-se a amina primária, de caráter ácido devido a

deslocamento do par de elétrons pelo anel aromático, cujo valor é 2,9 (pK_{a2}) (WAYSEK e JOHNSON, 1977). Nestas condições de pH o grupamento básico estará na forma totalmente ionizada facilitando assim o pareamento iônico com o ácido 1-heptanosulfônico.

Em pH 2,2 a benzilpenicilina estará parcialmente ionizada visto seu pK_a ser 2,8. Para se obter a total supressão da ionização da benzilpenicilina teríamos que trabalhar em valores inferiores a 2,0 porém, isso não é recomendado pois a faixa de pH operacional da coluna, segundo o fabricante é de 2 a 8. No entanto como o sinal cromatográfico referente a benzilpenicilina foi considerado satisfatório nenhuma alteração nas condições cromatográficas foi requerido.

A ordem de eluição tem a ver com a polaridade das moléculas em função das fases estacionária e móvel.

Em termos dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico (FDA, 1994) os ditames internacionais recomendam valores relacionados ao fator de capacidade, número de pratos teóricos, fator de cauda e resolução do sistema. Os relatórios obtidos para cada substância demonstram que os resultados obtidos em relação a esses parâmetros foram muito satisfatórios em relação aos ditames internacionais conforme apresentado na tabela 3, a seguir.

Tabela 3: Valores recomendados pelos ditames internacionais para os parâmetros de CLAE (FDA, 1994)

Parâmetro	benzilpenicilina	estreptomicina	flucitosina	Limites recomendados
K' (Fator de capacidade)	13,8	12,7	5,9	K' > 2, em relação ao Volume morto ou a outro pico.
N (Pratos teóricos)	223045	269459	12861	N > 2000
T (Fator de cauda ou assimetria)	0,99	0,99	1,2	Máximo 2
R (resolução)	8,9	4,3	2,3	R > 2, entre o pico de interesse e quaisquer interferentes.

4.3. Análise da estabilidade:

A estabilidade das substâncias analisadas foi determinada à temperatura ambiente pelo período de 24 horas, totalizando 24 injeções, e sob refrigeração a 4 °C durante 4 dias.

A estabilidade da estreptomicina e benzilpenicilina foram acompanhadas através da área do sinal obtido no cromatograma. A diminuição dessa área é proporcional a uma diminuição na concentração inicial das substâncias. Os resultados obtidos são mostrados nos gráficos a seguir.

Analisando a figura 11 podemos observar um decréscimo significativo na concentração inicial de benzilpenicilina atingindo concentração de 78% em relação a concentração inicial em um período de 24 horas a temperatura ambiente, enquanto a concentração de estreptomicina permanece praticamente inalterada.

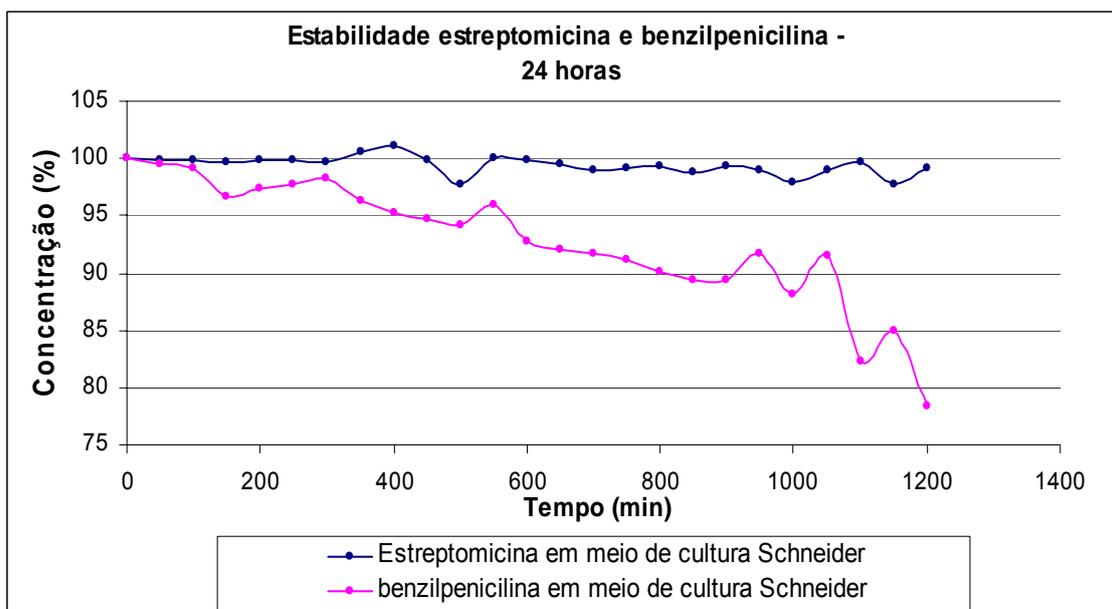


Figura 11: Determinação da estabilidade de benzilpenicilina e estreptomicina durante 24 horas em temperatura ambiente.

As análises realizadas a temperatura de 4 °C apresentadas na figura 12 mostraram também um decréscimo acentuado da concentração inicial de benzilpenicilina, mostrando uma perda de 12% da sua concentração inicial, da mesma forma que ocorrido anteriormente, a concentração de estreptomicina permaneceu praticamente inalterada.

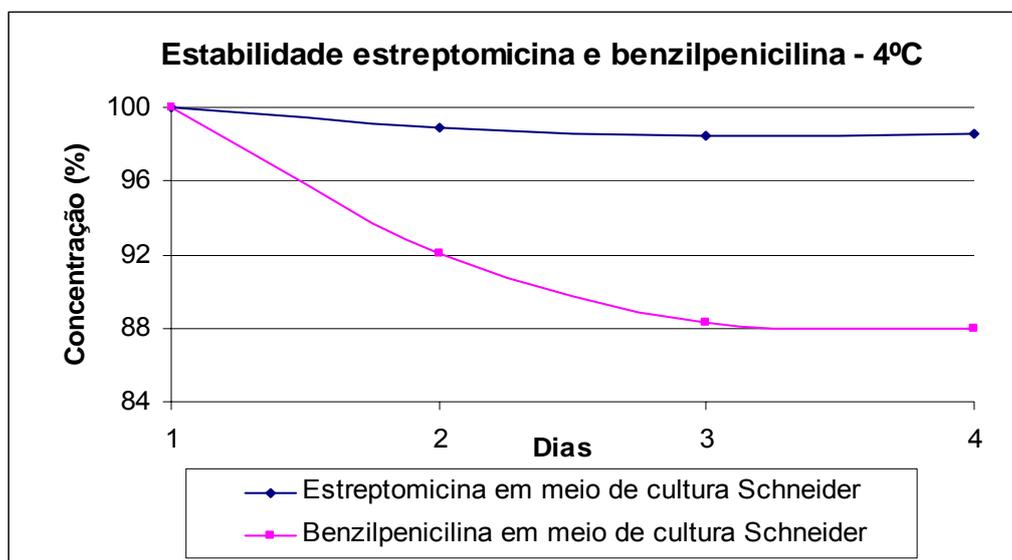


Figura 12: Determinação da estabilidade de benzilpenicilina e estreptomicina durante 4 dias em temperatura 4 °C.

4.4. Avaliação do efeito de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina no crescimento do *L. braziliensis in vitro*:

As análises do efeito dessas substâncias no crescimento do parasito *in vitro* mostraram uma inibição do crescimento do parasito em altas concentrações de antibióticos e antifúngico.

Analisando a figura 13, observamos que o padrão da curva controle se apresentou de acordo com o relatado na literatura, mostrando um pico de crescimento no quarto dia da curva. Com a adição da benzilpenicilina, em diferentes concentrações, observou-se o mesmo padrão da curva do controle, apresentando somente inibição do crescimento parasitário, proporcionalmente à concentração do antimicrobiano.

Na curva onde se utilizou a concentração de 1000 U/mL de benzilpenicilina (B1000) observou-se um pico de crescimento no 3º dia e uma inibição do crescimento do parasito bastante pronunciada a partir do 4º dia da curva permanecendo assim até o final do experimento.

Para a análise estatística tomou-se como referência o valor do número de parasitos (obtidos pela média de três contagens) no quarto dia da curva para comparação entre a curva controle e a curva B1000. Aplicando o teste *t* de Student obteve-se um valor *p* de 0,01; que comparado ao nível de significância de 0,025, estão situados na área de rejeição da curva *t*. Nesse caso podemos afirmar que as médias são estatisticamente diferentes em nível de significância de 2,5%, ou seja, pode-se observar que houve uma inibição significativa do crescimento do parasito.

Na curva de crescimento com 500 U/mL (B500), pode-se observar um padrão bastante parecido com o da curva B1000, com pico de crescimento no 3º dia e inibição do crescimento bastante pronunciada a partir do 4º dia.

Para a análise estatística tomou-se como referência o valor do número de parasitos (obtidos pela média de três contagens) no quarto dia da curva para comparação entre a curva controle e a curva B500. Aplicando o teste *t* de Student obteve-se um valor *p* de 0,016; que comparado ao nível de significância de 0,025 (2,5%), estão situados na área de rejeição da curva *t*. Nesse caso podemos afirmar que as médias são estatisticamente diferentes em nível de significância de 2,5%.

As curvas de crescimento utilizando as concentrações de 200 U/mL (B200) e 100 U/mL (B100), apresentaram um padrão bastante semelhante entre si, mantendo-se próximas durante todo o período, fizeram um pico de crescimento no 3º dia e apresentaram uma diminuição do crescimento a partir do 4º dia menos expressiva aparentemente, o que pôde ser confirmado através da aplicação do teste *t* de Student no ponto de referência do quarto dia da curva onde se obteve um valor *p* de 0,040 e 0,071 respectivamente; se situando na zona de aceitação da curva T, ao nível de significância de 2,5%.

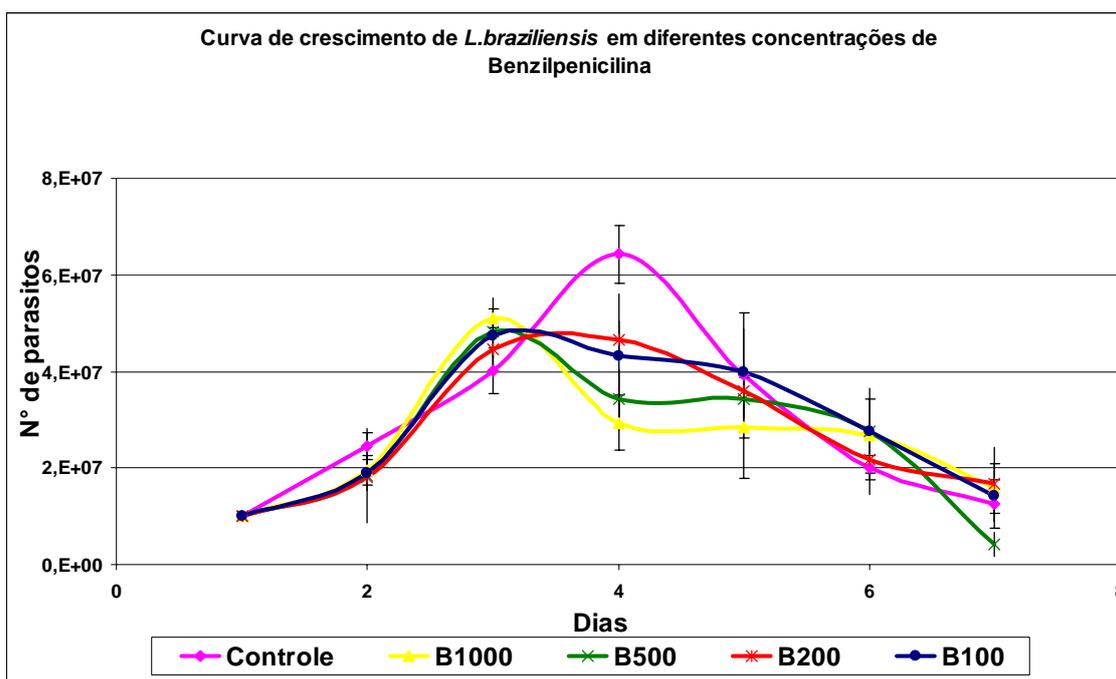


Figura 13: Curva de crescimento do parasito *L. braziliensis*, em diferentes concentrações de benzilpenicilina.

Com relação à curva de crescimento realizada sob diferentes concentrações de estreptomicina, figura 14 observa-se que a curva controle desse gráfico apresentou um formato esperado para o crescimento do protozoário tendo um pico de crescimento no quarto dia do experimento com queda subsequente até o sétimo dia.

O padrão da curva, utilizando a concentração de 1000 ug/mL (E1000) mostrou uma inibição do crescimento parasitário bastante significativa ao longo do período, porém sem quedas bruscas no número de parasitos. A curva apresentou um platô do 3º ao 5º dia de experimento entrando em queda após o quinto dia.

Para a análise estatística tomou-se como referência o valor do número de parasitos (obtidos pela média de três contagens) no quarto dia da curva para comparação entre a curva controle e a curva E1000. Aplicando o teste *t* de Student obteve-se um valor *p* de 0,00048; que comparado ao nível de significância de 0,025, estão situados na área de rejeição da curva *t*. Nesse caso podemos afirmar que as médias são estatisticamente diferentes a esse nível de significância.

A curva utilizando a concentração de 500 µg/mL (E500), também apresentou inibição significativa do crescimento parasitário, com uma queda mais expressiva no número de parasitos somente no sexto dia de experimento.

Analisando o crescimento do parasito tomado como referência os valores obtidos na contagem dos parasitos no quarto dia da curva através do teste *t* de Student para a concentração E500 em relação a curva controle, obteve-se um valor *p* de 0,008, se situando também abaixo do nível de significância de 2,5% (0,025), mostrando que as médias são estatisticamente diferentes em nível de significância de 2,5%, confirmando a inibição do crescimento do parasito

As curvas utilizando a concentração de 200 µg/mL e 100 µg/mL (E200 e E100), também apresentaram padrões semelhantes de crescimento com uma inibição menos pronunciada do crescimento parasitário e sem apresentar queda brusca em nenhum dia do experimento.

Através da aplicação do teste *t* de Student tomando-se como referência o quarto dia da curva para comparação entre a curva controle e as curvas E200 e E100 obteve-se os valores *p* de 0,033 e 0,034 respectivamente; se situando na zona de aceitação da curva *T*, acima de 0,025 (2,5%), não existindo dessa forma dados estatísticos que comprovem que as médias (número de parasitos) são diferentes.

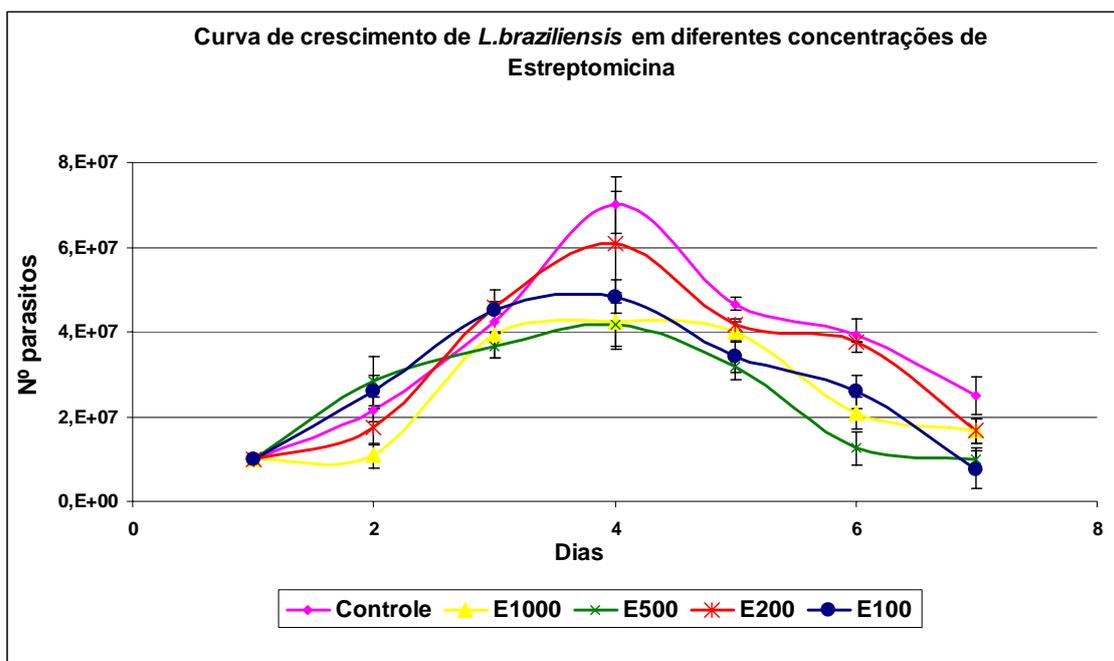


Figura 14: Curva de crescimento do parasito *L. braziliensis* em diferentes concentrações de estreptomicina

Analisando a curva de crescimento de *L. braziliensis* em diferentes concentrações de flucitosina, figura 15, observa-se uma forte inibição do crescimento do protozoário em relação curva controle, sofreu também (para algumas concentrações – F1000, F500 e F200) uma queda acentuada do número de parasitos no quinto dia do experimento.

A curva utilizando a concentração de 1000 µg/mL (F1000) se mantém afastada de todas as outras desde o segundo dia com número muito baixo de parasitos, é interessante também que nessa concentração a partir do sexto dia o número de parasitos alcança a magnitude de 10^6 , grandeza inferior a quantidade de parasitos inoculados, essa forte inibição do crescimento parasitário não foi conseguida por nenhum antimicrobiano utilizado.

A curva utilizando a concentração de 500 µg/mL (F500) se manteve próxima as outras com menores concentrações de flucitosina até o quarto dia, porém no quinto dia sofreu uma forte queda no número de parasitos, permanecendo assim até o final do experimento.

A análise estatística pelo teste *t* de Student para as curvas F1000 e F500 forneceu um valor *p* de 0,014 indicando que o número de parasitos contados no quarto dia da curva quando comparados à curva controle são

estatisticamente diferentes em nível de significância de 2,5%, ou seja, essa concentração produziu uma inibição significativa no crescimento do parasito.

A curva utilizando a concentração de 200 µg/mL (F200) não apresentou diferença significativa com relação ao seu formato nos primeiros quatro dias de experimento, apresentando somente no quinto dia uma queda expressiva no número de parasitos, padrão semelhante ao observado na curva F500.

Através da análise estatística para a curva F200 comparando o número de parasitos determinados na contagem, no quarto dia da curva, em relação ao curva controle, obteve-se um valor p de 0,037, valor situado na área de aceitação da curva t . Esse valor mostra que não existem dados estatísticos que comprovem que as médias (número de parasitos contados) são diferentes, indicando que não houve inibição significativa do crescimento dos parasitos.

A curva utilizando a concentração de 100 µg/mL (F100) a partir do terceiro dia apresentou um padrão de crescimento bastante parecido com o da curva controle.

Através da análise estatística o valor p obtido foi de 0,18 comprova essa observação permitindo alcançar a mesma conclusão anterior de que não há diferença significativa entre o número de parasitos quantificados .

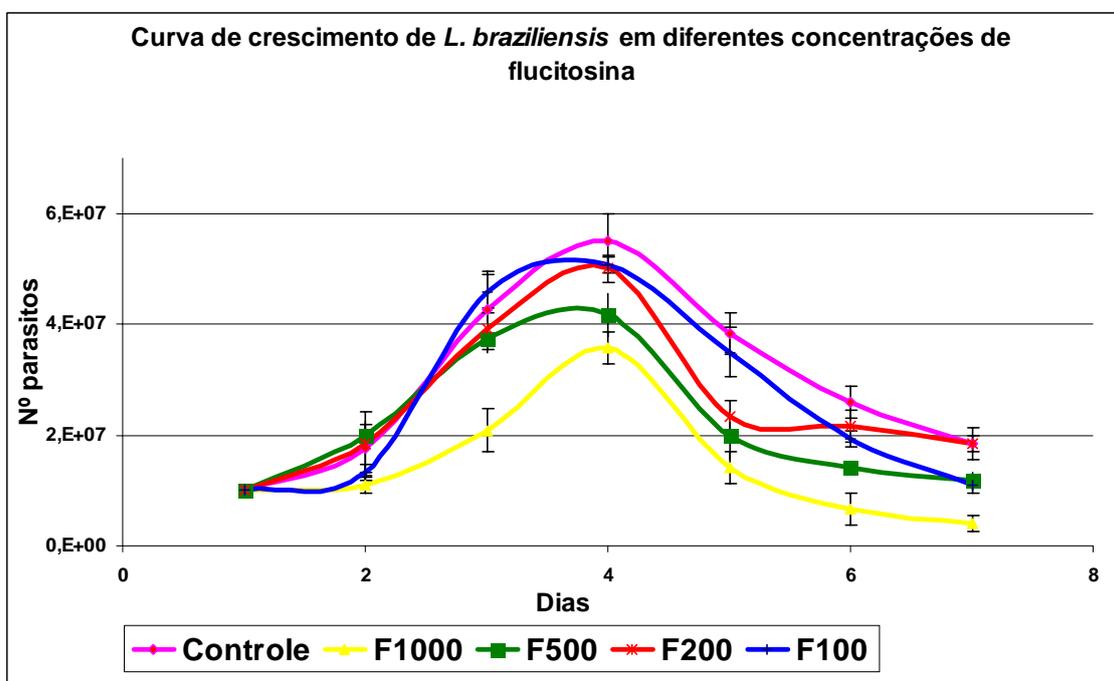


Figura 15: Curva de crescimento do parasito *L. braziliensis* em diferentes concentrações de flucitosina.

Observando a figura 16 que apresenta a curva de crescimento em benzilpenicilina associada à estreptomicina o padrão da curva controle se apresentou de acordo com o relatado na literatura, mostrando um pico de crescimento no quarto dia da curva com declínio nos dias subsequentes.

Na curva de crescimento realizada com associação de 200 U/mL de benzilpenicilina e 200 µg/mL de estreptomicina (E+P), observou-se um padrão levemente diferenciado das curvas contendo somente um antimicrobiano apresentando uma fase estacionária do crescimento pronunciada.

A análise estatística revelou um valor p de 0,0055; através da comparação do número de parasitos contados na curva E+P em relação a curva controle no quarto dia do experimento. Esse valor se situa na zona de rejeição da curva t, mostrando que as médias são estatisticamente diferentes em nível de significância de 2,5%, indicando que houve uma inibição significativa do crescimento do parasito.

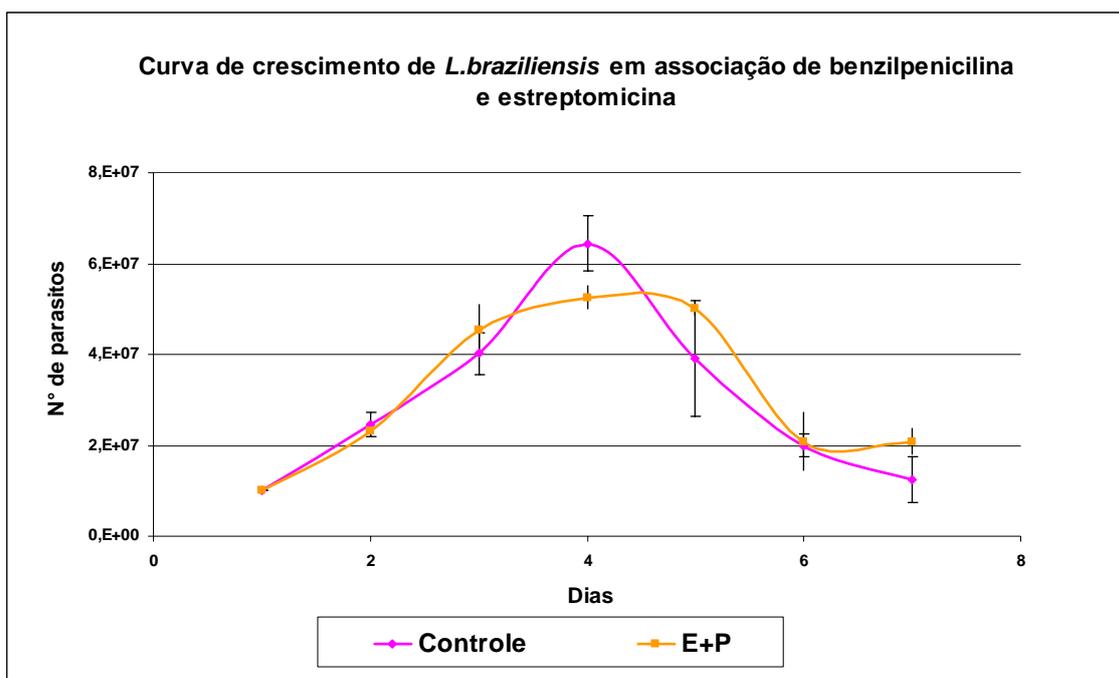


Figura 16: Curva de crescimento de do parasito *L. braziliensis* em associação de benzilpenicilina e estreptomicina.

5. DISCUSSÃO:

5.1. Análise da estabilidade:

Geralmente soluções de antibióticos, para utilização em laboratório, são preparadas em soluções estoques que são mantidas por dias, semanas e até meses, entretanto muitas soluções de antibióticos não são estáveis e não podem ser mantidas por um longo tempo (OKERMAN, HENDE e ZUTTER, 2007).

Um tempo de preservação mais longo é uma vantagem para o laboratório e para o ambiente, mas na maioria das vezes não é sabido se a solução do antibiótico é estável (OKERMAN, HENDE e ZUTTER, 2007).

Os dados disponíveis na literatura geralmente fornecem informações com relação à estabilidade de antibióticos em solução salina, porém, na utilização laboratorial, tais substâncias são adicionadas ao meio de cultura, sendo os dados de estabilidade, nessa condição, desconhecidos.

As análises de estabilidade da benzilpenicilina em meio de cultura mostraram uma degradação de cerca de 12% a temperatura de 4 °C em 4 dias, esse resultado é muito preocupante pois como o meio de cultura é utilizado por até 1 mês (por orientação do fabricante devido à degradação do aminoácido L-glutamina), e se essa taxa de degradação permanecer contínua, no final desse período a concentração de benzilpenicilina será muito pequena não sendo suficiente para inibição do crescimento de contaminantes.

Estudos mostram que a benzilpenicilina apresenta essa mesma instabilidade até mesmo sob congelamento, pois ainda assim permanecem com uma pequena atividade sofrendo degradação sob estas condições, perdendo cerca de 20% de sua atividade em soluções congeladas em um período de três meses, sendo aconselhável por isso estocar essas soluções em temperatura de -70 °C ao invés de -20 °C como convencional (OKERMAN, HENDE e ZUTTER, 2007).

O antibiótico clortetraciclina é um outro exemplo, pois possui um tautomerismo ceto-enólico entre o C-11 e C-12 durante o congelamento gerando degradação mesmo armazenada sob estas condições. (OKERMAN, HENDE e ZUTTER, 2007).

Apesar do meio de cultura ser armazenado em geladeira, na temperatura de 4 °C, foram realizadas análises a temperatura ambiente para verificar se

situações de transporte seriam críticas para a estabilidade dos compostos e os resultados mostraram degradação de cerca de 20% da benzilpenicilina a temperatura ambiente por 24 horas mostrando que a temperatura é um fator crítico para a estabilidade da benzilpenicilina.

Experimentos realizados analisando benzilpenicilina em preparações de dose unitária em hospitais mostraram uma alta degradação da substância a temperatura ambiente e um marcado controle na diminuição da degradação quando as soluções foram acondicionadas a 4 °C, (NICHOLAS, HESS e COLTEN, 1982) concordando com os resultados obtidos no presente estudo. Os autores observaram ainda o surgimento de sinais correspondentes a produtos de degradação, nos cromatogramas obtidos através das análises por CLAE, que aumentavam com o passar do tempo.

Essa acentuada degradação da benzilpenicilina pode ser explicada pela sua estrutura molecular (figura 3), que apresenta um anel de 4 lados bastante instável sendo assim bastante suscetível à degradação em meio aquoso e nesse caso tendo a temperatura alta como um agravante. A mais importante fonte de instabilidade da benzilpenicilina é a hidrólise do anel β - lactâmico, que dependendo do pH da solução na qual se encontra pode formar diferentes produtos de degradação (CONNORS, AMIDON e STELLA, 1986).

Devido à instabilidade dessa substância já descrita na literatura e também observada em nosso estudo é aconselhável que sejam preparadas soluções frescas para o uso e que estas sejam conservadas em temperatura de 4 °C a fim de garantir a estabilidade do antibiótico.

Seria interessante avaliar a estabilidade da benzilpenicilina por um período de tempo maior, para obtenção de resultados mais esclarecedores com relação a sua utilização no laboratório.

Com relação à estreptomicina é conhecido um mecanismo de degradação por hidrólise em um derivado ototóxico a streptidina (GRANADOS e MEZA, 2007), porém esse mecanismo de degradação é mais lento do que o observado para a benzilpenicilina, por isso não foi observada degradação expressiva da estreptomicina nas temperaturas e períodos avaliados. Provavelmente a estreptomicina não representaria problema com relação à degradação no meio de cultura em curto prazo, porém seria interessante realizar análises por um maior período de tempo a fim de verificar sua estabilidade em longo prazo.

Essas análises ressaltam a importância da utilização no laboratório de soluções de antibióticos recém preparadas e conservadas em geladeira a fim de evitar degradação das mesmas e consequente perda da atividade.

5.2. Avaliação do efeito de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina no crescimento de *L. braziliensis* “in vitro”:

Observando os gráficos da curva de crescimento de *L. braziliensis* sob diferentes concentrações de antimicrobianos *in vitro*, nota-se que curva controle manteve o mesmo padrão em todos os experimentos, apresentando pequenas diferenças com relação ao número de parasitos, o que pode ter ocorrido pela utilização de meio de cultura preparado em diferentes momentos para realização das curvas.

É interessante notar que a as curvas de crescimento de *L. braziliensis* nas diferentes concentrações de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina; apresentaram um formato bastante semelhante em todos eles, guardando diferenças somente em relação ao número de parasitos quantificados.

Para todas as curvas de crescimento nas concentrações de antimicrobianos, a partir de 500 e 1000 µg/mL ou U/mL, foi observado diferença estatística significativa entre as médias (número de parasitos) através de análise pelo teste *t* de Student, mostrando que essas concentrações não são seguras para o uso pois afim de evitar a contaminação da cultura por bactérias e fungos promoverá a inibição do crescimento do parasito que se deseja isolar.

Esses resultados concordam com artigos que relatam bons resultados na utilização de um antibiótico como a azitromicina no tratamento de pacientes com LTA. (SILVA-VERGARA, 2004).

Por outro lado esses resultados discordam dos encontrados por KIMBER et al., 1981, que em concentrações de 625 µg/mL de flucitosina não encontrou diferença significativa no crescimento de promastigotas de *L. infantum*, *L. tropica* e *L. mexicana*, porém esse autor não cita nenhum tratamento estatístico dado aos seus resultados para realizar essa afirmação.

Marzochi et al., 1992, utilizou 500 µg de flucitosina em um kit de punção aspirativa para ser utilizado em coletas de campo obtendo um bom rendimento no isolamento.

Vale ressaltar a importância do sinergismo existente entre os antibióticos benzilpenicilina e estreptomicina, pois quando utilizados separadamente em concentrações de 200U/mL e 200µg/mL, não geram inibição estatisticamente significativa no crescimento do parasito porém quando utilizados em combinação promovem essa inibição, concordando com a afirmação de Katzung, 2005, que relata um sinergismo entre esses antibióticos. Essa combinação de antimicrobianos tem sido utilizada a muitos anos de forma empírica no VIGILeish para o isolamento a partir de fragmentos de biopsias de lesões cutâneas e manutenção de *Leishmania* sp. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que tais antibióticos em associação nas concentrações de 200 U/mL e 200ug/mL, podem inibir o crescimento de *L. braziliensis in vitro*, porém uma certa inibição do crescimento deve ser admitida para que não haja uma larga contaminação das amostras, pois se trata de uma relação custo-benefício. Devem ser realizados maiores estudos para determinação de concentrações seguras para essa combinação de antibióticos.

Em todas as curvas de crescimento as concentrações de antimicrobianos nas faixas de 100 e 200 µg/mL ou U/mL, não apresentaram inibição do crescimento estatisticamente significativa no 4º dia da curva, mostrando serem concentrações seguras para o uso no laboratório a fim de impedir o crescimento de contaminantes e inviabilização do exame.

A cepa escolhida para realização dos experimentos foi *L. braziliensis*, devido a sua ampla distribuição no estado do Rio de Janeiro representando a maioria dos isolados do VIGILeish, porém os resultados aqui obtidos podem não se repetir com outras espécies de *Leishmania*. Seria interessante realizar estudos posteriores contemplando outras espécies para análise de seu comportamento frente a esses antimicrobianos.

A cepa utilizada também já havia passado por um período de adaptação ao meio de cultura e é sabido que cepas já adaptadas ao meio de cultura apresentam um crescimento aproximadamente até três vezes maior que cepas não adaptadas (CELESTE E GUIMARÃES, 1988), dessa forma pode-se esperar que os resultados não se repitam com amostras recém isoladas, ou seja, aquelas provenientes de fragmentos de lesões, nesse caso a inibição do crescimento do parasito pode ser ainda mais significativa, pois o parasito além

de não estar adaptado ao meio, é inoculado em ambiente com alta concentração de antimicrobianos.

Os resultados da curva de crescimento em diferentes concentrações de flucitosina se mostraram muito semelhantes aos dos antibióticos benzilpenicilina e estreptomicina, é sabido que existe uma maior preocupação com relação ao uso de flucitosina quando comparado ao de qualquer antibiótico, esses resultados mostram que deve se ter muita precaução no uso de qualquer substância microbicida em culturas de *Leishmania*.

6. CONCLUSÕES:

As conclusões obtidas a partir dos resultados desse estudo foram as seguintes:

O método de separação por CLAE desenvolvido mostrou-se muito eficaz para separação de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina.

A partir da análise da estabilidade em meio Schneider, os resultados mostraram que o antibiótico benzilpenicilina sofre degradação durante o período de 4 dias a temperatura de 4 °C e 24 horas a temperatura ambiente, enquanto que a estreptomicina apresentou maior estabilidade, sob essas condições, permanecendo praticamente inalterada no prazo de 4 dias a 4 °C.

Observou-se que a adição de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina em diferentes concentrações inibiram o crescimento de *L. braziliensis in vitro*, sendo mais evidente nas concentrações de 500 e 1000 U/mL de Benzilpenicilina, 500 e 1000 µg/mL de estreptomicina de 500 e 1000 µg/mL de flucitosina.

7. BIBLIOGRAFIA:

- ALVAR, J; Cañavate C; GUTIÉRREZ-SOLAR B.; JIMÉNEZ M.; LAGUNA F.; LÓPEZ-VELEZ R.; MOLINA R MORENO J. **Clin Microbiol.** *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Rev 10*: 289-319. 1997.
- AVILA S.L., FERREIRA A.W. **Braz J Med Biol Res.** Malaria diagnosis: a review.. Apr;V.29, n.4, p. 431-43, 1996.
- BEACH, H. D.; GOAD, L.J.; HOLZ, G.G. **Molecular and Biochemical Parasitology.** Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. v. 31, p. 149-162, 1988.
- Belli A, Rodriguez B, Aviles H & Harris E. **AM. J. Trop. Med. Hyg** Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis.. , V. 58, n.1,p. 102-109, 1998.
- BERMAN, J.D.; HOLZ, G.G, BEACH, H. D. **Molecular and Biochemical Parasitology.** Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes culture. v. 12, p. 1-13, 1984.
- CELESTE, B.J.; GUMARÃES, C.S. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** Growth curves of *Leishmania braziliensis braziliensis* promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to Schneider's drosophila medium as assessed by anti-leishmania human sera.v.30, n. 2, 1988.
- COHEN, B.A.J., LOOIJ, B.J., WITTNER, M. **Ann. Soc. Belge Méd. Trop.** 5-Fluorocytosine, a valuable fungicidal agent in specific culture media. v. 57, n. 1, p. 55-56, 1977.
- CONNORS, K.A.; AMIDON, G.L.; STELLA, V.G. **Chemical stability of pharmaceuticals:** A handbook for pharmacists. Canadá: Jonh wiley & Sons, 1986.
- DA-CRUZ, A.M., PIRMEZ. C. Leishmaniose tegumentar americana. In: . COURA, J.R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.** 1. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2005. cap.52.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v.36, n.1, p. 71-80, jan./fev. 2003.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO,M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo, v.7, n.3, p.338-349, set. 2004.
- GRANADOS, O; MEZA, G. A direct HPLC method to estimate streptomycin and its putative ototoxic derivative, streptidine, in blood serum: Application to streptomycin-treated humans. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, p. 625-630, 2007.
- IHALAMULLA, R.L.; RAJAPAKSA, U.S.; KARUNAWEEERA, N.D. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology.** Microculture for the isolation of

- Leishmania* parasites from cutaneous lesions – Sri lankan experience. v. 99, n. 6, p. 571-575, 2005.
- KIMBER, C.D.; EVANS, D.A.; ROBINSON, B.L.; PETERS, W. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**. Control of yeast contamination with 5-fluorocytosine in the *in vitro* cultivation of *Leishmania* spp. v. 75, n. 4, p. 453-454, 1981.
- KATZUNG, G.B., Farmacologia básica e clínica. 9.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2005. 991p.
- LESSA M. M.; LESSA, H. A.; CASTRO, T. W. N.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A., MACHADO, P.; CARVALHO, E. M. **Rev Bras Otorrinolaringol** Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos, V. 73, n. 6, p.843-7, 2007.
- LIMONCU, Me, ÖZBILGIN, A.; BALCIOGLU, IC.; ÖZBEL, Y. Evaluation of three new culture media for the cultivation and isolation of *Leishmania* parasites. **J. Basic Microbiol**. V.44, n.3, p. 197-202, 2004.
- MARZOCHI, M.C.A.; SILVA, P.C.T.; MARZOCHI, K.B.F; CONCEIÇÃO. V.F., COUTINHO, V., BRITO, D.B. **Rev Soc Bras Med Trop**. Sistema de punção aspirativa a vácuo para cultivo, isolamento e transporte de *Leishmania* em condições de campo. V. 25, n. supl. p. 70, 1992.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. **Cad Saúde Publ**. Tegumentary and visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. V. 10, p. 359-375, 1994.
- MÄSER, P.; GREYER-BÜHLER, Y.; KAMINSKY, R.; BRUN, R **Parasitol Res**. An anti-contamination cocktail for the *in vitro* isolation and cultivation of parasitic protozoa. v. 88, p. 172-174, 2002.
- MILLER, E.L. **Journal of Midwifery & Women's Health**. The penicillins: a review and update. v. 47, n.6, p.426-434, nov/dec, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. In: Ministério da Saúde - MS (ed), Brasília, 2003, 122p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretária de vigilância em saúde Guia de vigilância epidemiológica, Brasília, 2005, 816 p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Fundação Nacional de Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasília, 2007, 182 p.
- Moreira, M. E. L. ; **Jornal de Pediatria**. Controvérsias a respeito da sepse fúngica no pré-termo extremo: profilaxia e esquemas terapêuticos. V. 81, n.1(Supl), p. s52 – s58, 2005.
- NYS, E.M. *et al*. **Pharmaceutical chemistry journal**. Determination of ionization constants of streptomycin by the indicator method. V.5 (9), p.576, 1971.

- NICHOLAS, E.; HESS, G.; COLTEN, H.R. **The new England journal of medicine.** Degradation of penicillin, ticarcillin and carbenicillin resulting from storage of unit doses. V. 306, n. 9, 1982.
- OKOT-KOTOBER, B.M. **Parasitology.** A rapid chromatographic method for elimination of fungal contamination in *in vitro* cultures of leishmania spp. v. 91, p. 1-7, 1985.
- OKERMAN, L.; HENDE, J.V.; ZUTTER, L.D. **Analytica chimica acta.** Stability of frozen stock solutions of beta-lctam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing. V. 586, p. 284-288, 2007.
- PALOMINO, J.C.; GUERRA, H.; LUMBRERAS, H. **Tropenmed. Parasit.** A Selective liquid Medium for Primary Isolation of South American Leishmanias. v.34, p. 229-232, 1983.
- SAMPAIO, R.N.R.; ANDRADE, G.B.; PEREIRA, A.C.; SILVA, E.A.; CUBA, C.A.C. **An. Bras. Dermatol.** Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro, v.77, n.5, set./out, 2002.
- SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V., SARTORI, A.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; MATTOS, M.S.; ARAUJO, M.L.; SOUZA, W.J.; HADDAD, F.; PEREZ, M.A.; PACHECO, R.S.; MOMEN, H.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; COSTA, S.C.; **Mem Inst Oswaldo Cruz** Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. v. 96, p. 987-996, 2001.
- VEGA-LÓPEZ, F. **Curr Opin infect dis.** Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. V. 16, p. 97-101, 2003.
- VERMES, A.; SIJS, H.V.D.; GUCHELAAR, H. **Pharmacy World and Science.** An accelerated study of 5-fluorocytosine in intravenous solution. v. 21, n. 1, p. 35-39, 1999.
- Food and drug administration – FDA. Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods, November 1994.
- SILVA-VERGARA, M.L.; SILVA, L. A.; MANEIRA, F.R.Z.; SILVA A.G.; PRATA, A. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.** Azithromycin in the treatment of mucosal leishmaniasis. V.46, n.3, Mai/Jun, 2004.
- WAYSEK, E.H.; JOHNSON, J.H. **Analyt profiles.** 5:128, 1977.
- World Health Organization Technical Report Series. **Report of the Scientific Working Groupmeeting on Leishmaniasis.** 793:1-158, 1990.

Anexo 1

Instruções para o preparo do meio
de cultura Schneider[®]



SCHNEIDER'S INSECT MEDIUM

With L-glutamine

Without Calcium Chloride and Sodium Bicarbonate

Product Code **S9895**

Storage Temperature 2-8 °C

Product Description

Many insect tissue culture media were formulated to mimic the main physico-chemical properties of the body fluid of specific insects. A cursory survey of the formulas of culture media designed for insect tissues reveals great qualitative and quantitative disparities in composition. Different media designed for the same species may exhibit less similarity than do two media designed for insects of different orders. Various media have been devised for the in vitro culture of *Drosophila* cells and tissues.^{2,5} The most extensively used are Schneider's medium and Echalié and Ohanessian's D-22 medium. *Drosophila* cells have been employed to study a variety of biological processes⁴ including genetics, endocrinology, physiology and cell biology as well as recombinant protein expression.⁵

When supplemented with 5-20% heat-inactivated fetal bovine serum, Schneider's medium has been found to support the rapid growth of both primary and established cultures of cells derived from *Drosophila melanogaster*.^{6,7} The medium has been used for the growth and maintenance of the cell lines originally derived by Schneider⁸ from *Drosophila* embryos as well as the culture of cells from other dipteran species.⁹

SCHNEIDER'S INSECT MEDIUM is one of the cell culture media available from Sigma. The selection of a nutrient medium is strongly influenced by 1] type of cell, 2] type of culture [monolayer, suspension, clonal] and 3] degree of chemical definition necessary. It is important to review the literature for recommendations concerning medium, supplementation and physiological parameters required for a specific cell line.

Components	g/l
β-Alanine	0.5
L-Arginine, free base	0.6
L-Aspartic Acid, free acid	0.4
L-Cystine, Dihydrochloride	0.026732
L-Cysteine, free base	0.06
L-Glutamic Acid	0.8
L-Glutamine	1.8
Glycine, free base	0.25
L-Histidine, free base	0.4
L-Isoleucine	0.15
L-Leucine	0.15
L-Lysine-HCl	2.0608
L-Methionine	0.15

L-Proline	1.7
L-Serine	0.25
L-Threonine	0.35
L-Tryptophan	0.1
L-Tyrosine, Disodium	0.720199
L-Valine	0.3
Fumaric Acid, free acid	0.06
α-Ketoglutaric acid, free acid	0.35
L(-) Malic Acid, free acid	0.6
Succinic Acid	0.06
Magnesium Sulfate, anhydrous	1.807221
Potassium Chloride	1.6
Potassium Phosphate, Monobasic	0.45
Sodium Chloride	2.1
Sodium Phosphate, Dibasic	0.7
D(+) Glucose	2.0
D(+) Trehalose	2.0
Yeast Extract	2.0

Precautions and Disclaimer

For research use only. Not for drug, household or other uses.

Preparation Instructions

Powdered media are extremely hygroscopic and should be protected from atmospheric moisture. The entire contents of each package should be used immediately after opening. Preparing a concentrated solution of medium is not recommended as precipitates may form.

Supplements can be added prior to filtration or introduced aseptically to sterile medium. The nature of the supplement may affect storage conditions and shelf life of the medium.

1. Measure out 80% of final required volume of water. Water temperature should be 15-20 °C.
2. While gently stirring the water, add the powdered medium. Stir until dispersed. Material will not go in solution completely. Do NOT heat water.
3. Rinse original package with a small amount of water to remove all traces of powder. Add to solution in step 2.
4. To the solution in step 3, add 0.4 g sodium bicarbonate or 5.3 ml of sodium bicarbonate solution [7.5% w/v] for each liter of final volume of medium being prepared. Stir until dissolved.
5. While stirring, adjust the pH to at least 9.2 ± 0.2 with sodium hydroxide. Stir for a minimum of 10 minutes. Solution may become turbid.

6. While stirring, adjust the pH to 6.7 ± 0.2 with HCl, solution will clear.
7. Prepare a calcium chloride solution by dissolving 0.6 g of anhydrous calcium chloride [C5670] in 50 ml of tissue culture grade water for EACH liter of final volume of medium being prepared. Slowly add the calcium chloride solution dropwise to the medium with rapid mixing to avoid precipitate formation.
8. While stirring, adjust the pH of the medium to 0.1-0.3 pH units below the desired pH since it may rise during filtration. The use of 1N HCl or 1N NaOH is recommended.
9. Add additional water to bring the solution to final volume.
10. An osmotic pressure of 360 mOsm \pm 5% is suitable for the growth of cells derived from *Drosophila melanogaster*. If desired the osmotic pressure can be increased 10 mOsm by adding potassium chloride (0.4 g salt OR 2 ml of a 20% (w/v) solution) OR sodium chloride (0.3 g of salt OR 2 ml of a 15% (w/v) solution) for EACH liter of final volume of medium being prepared. The osmotic pressure can be decreased 10 mOsm by adding 27.8 ml of water for EACH liter of final volume of medium being prepared. Stir until dissolved.
11. Sterilize immediately by filtration using a membrane with a porosity of 0.22 microns or less.
12. Aseptically dispense medium into sterile container.

Storage/Stability

Store the dry powdered medium at 2-8 °C under dry conditions and liquid medium at 2-8 °C in the dark. Deterioration of the powdered medium may be recognized by any or all of the following: [1] color change, [2] granulation/clumping, [3] insolubility. Deterioration of the liquid medium may be recognized by any or all of the following: [1] pH change, [2] precipitate or particulate matter throughout the solution, [3] cloudy appearance [4] color change. The nature of supplements added may affect storage conditions and shelf life of the medium. Product label bears expiration date.

Procedure

Materials Required but Not Provided
 Water for tissue culture use [W3500]
 Sodium Bicarbonate [S5761] or
 Sodium Bicarbonate Solution, 7.5% [S8761]
 1N Hydrochloric Acid [H9892]
 1N Sodium Hydroxide [S2770]
 Medium additives as required

Product Profile

Appearance	off-white powder
Moisture content	\leq 5.0%
Solubility	turbid solution at 1x concentration prior to pH adjustment
pH at RT	*
Osmolality	250 mOsm/kg H ₂ O \pm 10% [without sodium bicarbonate and pH adjustment]

Amino Acid Analysis by HPLC	Analysis has confirmed that amino acids are present at concentrations consistent with the formula.
-----------------------------	--

Key Element Analysis by ICAP	Analysis has confirmed that key elements are present at concentrations consistent with the formula.
------------------------------	---

Biological Performance Characteristics

Biological performance is assessed using an appropriate cell line(s).

*Specification not established. Reported as lot-specific data.

References

1. Mitsuhashi, J. (1982) Media for insect cell cultures. In: *Advances in Cell Culture* vol. 2, K. Maramorosch ed., Academic Press, N.Y., pp. 133-196.
2. Echaliier, G. (1976) In vitro culture of *Drosophila* cells and applications in physiological genetics. In: *Invertebrate Tissue Culture*, E. Kurstak and K. Maramorosch eds., Academic Press, N.Y., pp. 131-150.
3. Schneider, I. and A. Blumenthal. (1978) *Drosophila* cell and tissue culture. In: *Biology and Genetics of Drosophila* vol. 2B, M. Ashburner and T.R.F. Wright eds., Academic Press, N.Y., pp. 266-315.
4. Kuroda, Y. (1982) *Drosophila* tissue culture: Retrospect and prospect. In: *Invertebrate Cell Culture Applications*, K. Maramorosch and J. Mitsuhashi eds., Academic Press, N.Y., pp. 53-104.
5. Van der Straten, A. et al. (1989) Efficient expression of foreign genes in cultured *Drosophila melanogaster* cells using hygromycin B selection. In: *Invertebrate Cell System Applications* vol. 1, J. Mitsuhashi ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp 183-195.
6. Schneider, I. (1964) Differentiation of larval *Drosophila* eye-antennal discs in vitro. *J. Exp. Zool.* 156: 91-104.

Sigma-Aldrich Inc.
 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765
 Technical Service: 800-325-5832 or call collect 314-771-5765
 Or e-mail at techserv@sial.com
 To order: 800-325-3010 or call collect 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

7. Schneider, I. (1966) Histology of larval eye-antennal disc and cephalic ganglia of *Drosophila* cultured in vitro. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 15:271-279.
8. Schneider, I. (1972) Cell line derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27:353-365.
9. Schneider, I. (1979) In: *Handbook of Practical Tissue Culture Applications*, K. Maramorosch and H. Hirumi eds., Academic Press, N.Y.

Revised: June 2006

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

Sigma-Aldrich Inc.
3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765
Technical Service: 800-325-5832 or call collect 314-771-5765
Or e-mail at techserv@sial.com
To order: 800-325-3010 or call collect 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

Anexo 2 –

Artigo publicado na Revista Analytica:
“Separação por cromatografia líquida de alta
eficiência (CLAE) dos antibióticos benzilpenicilina
e estreptomicina e do antifúngico flucitosina em
meio de cultura Schneider®”

SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DOS ANTIBIÓTICOS BENZILPENICILINA E ESTREPTOMICINA E DO ANTIFÚNGICO FLUCITOSINA EM MEIO DE CULTURA SCHNEIDER®

RESUMO

Os antibióticos benzilpenicilina e estreptomicina e o antifúngico flucitosina são utilizados no diagnóstico parasitológico indireto das leishmanioses, que é realizado por isolamento em cultura, para inibir o crescimento de contaminantes oriundos das amostras analisadas. Benzilpenicilina e estreptomicina atuam contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas respectivamente, e flucitosina é um antifúngico. É importante conhecer a estabilidade das substâncias no meio de cultura Schneider® para impedir a contaminação microbiológica deste, o que acarretaria na interrupção do exame, para isso foi necessário a otimização de método analítico de separação por cromatografia líquida de alta eficiência. Utilizou-se coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈ marca SYMMETRY™ com partículas de 5 µm, com dimensões de 250 mm x 4,6 mm. O sistema de eluição cromatográfico se baseou em um gradiente composto por duas fases: acetonitrila e solução de ácido 1-heptano sulfônico, com detecção por absorção no ultravioleta no comprimento de onda de 200 nm, para separação de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina do meio de cultura.

Palavras-chave: leishmanioses, separação, cromatografia líquida, benzilpenicilina, estreptomicina, flucitosina

SUMMARY

The antibiotics benzilpenicillin and streptomycin, and flucytosine, an antifungal, are used in the indirect parasitological diagnosis of leishmaniasis. This test is carried out by isolation in culture. These antimicrobials are used to inhibit the growth of microbiological contaminants that maybe present in the samples being analyzed. Benzilpenicillin and streptomycin are effective, respectively, against Gram-positive and Gram-negative bacterias, and flucytosine is an antifungal. It is important to verify the stability of antimicrobial substances in the culture medium Schneider® to inhibit any possible microbiological contamination that maybe present. This contamination would lead to the interruption of the assay. A method of separation by high performance liquid chromatography was optimized to separate and quantify these antimicrobial agents. A column of reversed phase C₁₈ SYMMETRY™ with 5 µm particles, in the dimensions of 250 mm x 4.6 mm was used. The elution was based on a gradient of two phases: acetonitrile and a solution of 1-heptane sulphonic acid, with detection by ultraviolet absorption in the wavelength of 200 nm.

Keywords: leishmaniasis, separation, liquid chromatography, benzilpenicillin and streptomycin, flucytosine

Cintia Mello¹,
André Mazzei¹,
Maria de Fátima Madeira¹,
Ana Paula Oliveira²,
Armi Nóbrega² e
Shirley Abrantes^{2*}

¹Instituto de Pesquisa Clínica
Evandro Chagas - IPEC /
FIOCRUZ

²Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde - INCQS /
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz /
FIOCRUZ

*Autora para correspondência:
Av. Brasil, 4365
Manguinhos
CEP 21045-900
Rio de Janeiro, RJ
shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br

INTRODUÇÃO

As Leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (1). Testes parasitológicos são considerados confirmatórios e podem ser obtidos através de exames diretos e indiretos (2, 3).

O isolamento parasitário em meio de cultura é considerado padrão, principalmente pela elevada sensibilidade e especificidade, além de preservar o parasito para diversos outros estudos. Entretanto, a possibilidade de contaminações de origem bacteriana e/ou fúngica, pode inviabilizar o diagnóstico por esta metodologia. Para diminuir o índice de contaminação secundária das culturas, são utilizados antibióticos como benzilpenicilina e estreptomicina no meio de cultura (4).

Muitas soluções de antibióticos e antifúngicos não são estáveis e não devem ser mantidas por longos períodos (5, 6). O desenvolvimento de métodos de detecção e de determinação da estabilidade dessas substâncias adicionadas ao meio de cultura é de extrema importância.

Diferentes métodos têm sido descritos para determinação e quantificação de antibióticos e antifúngicos em solução, como espectrofotometria, eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência (7, 8, 9). Nos últimos anos o aumento da sensibilidade e da reprodutibilidade de métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi obtido. A cromatografia líquida é um método rápido, sensível e reprodutível para as análises qualitativas e quantitativas, como também para separação de substâncias. Tem como vantagens a alta especificidade, o alto grau de resolução intrínseco ao sistema, automação do processo, capacidade de indicar estabilidade e a possibilidade de ser empregada em um grande número de amostras (10).

A separação de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina tem sido descrita por diversos autores, geralmente em solução aquosa, solução para administração parenteral e até mesmo em soro humano (9, 5, 11, 12). No entanto, em um meio de cultura que possui uma matriz extremamente complexa, não existe um método de separação dessas três substâncias, descrita na literatura, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação simultânea das substâncias: benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina quando incorporados em meio de cultura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e amostras

Os reagentes utilizados foram: 1-heptanosulfonato de sódio (Sigma); ácido orto-fosfórico 85% (Merck) e acetonitrila grau CLAE (Vetec)

As amostras estudadas foram: meio de cultura Schneider's insect médium (Sigma), benzilpenicilina (Calbiochem), sulfato de estreptomicina (FURP - Fundação para o remédio popular) e flucitosina (Sigma).

Equipamentos

Cromatógrafo líquido de alta eficiência composto de bomba quaternária modelo 600, auto-injetor 747 e detector UV modelo 2487. A coluna utilizada foi octadecilsilano marca SYMMETRY™, 5 µm, (250 x4,6) mm e 100 Å de diâmetro de poro.

PARTE EXPERIMENTAL

O meio de cultura Schneider® foi preparado de acordo com as instruções do fabricante Sigma – Aldrich.

As amostras de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina foram diluídas em água destilada resultando em soluções com concentrações de 200, 200 e 100 µg/mL, respectivamente.

A fase móvel utilizada na eluição por gradiente foi composta de fase A: solução 1g/L de 1-heptanosulfonato de sódio e quantidade suficiente de ácido fosfórico para ajustar o pH em 2,2 e fase B: acetonitrila.

O gradiente utilizado está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Gradiente utilizado para separação da benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina

Tempo (min)	Fase A	Fase B
0	95	5
5,0	95	5
5,3	80	20
20	67,5	32,5
30	55	45
30,3	95	5
50	95	5

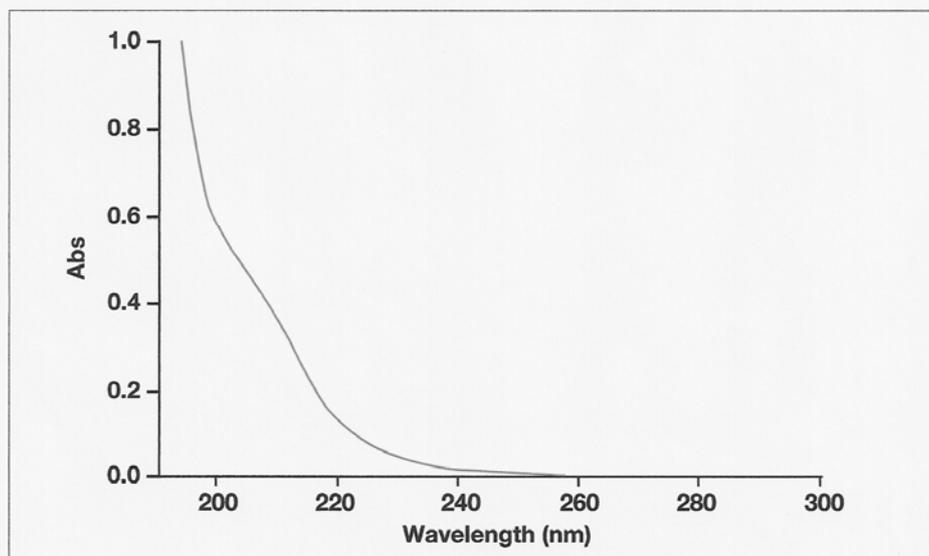


Figura 1. Espectro de absorção da benzilpenicilina, na faixa de 200 a 300 nm com absorção máxima em torno de 200 nm

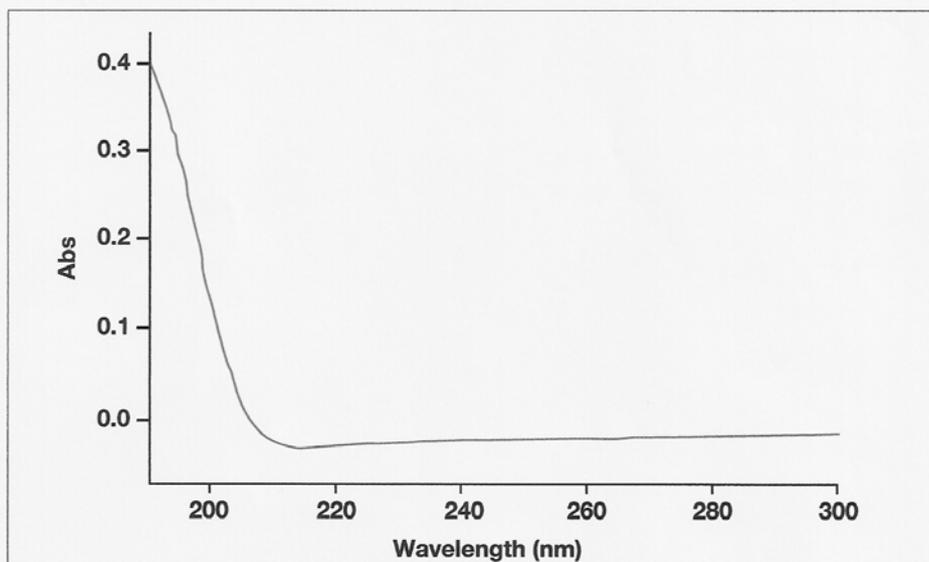


Figura 2. Espectro de absorção da estreptomicina, na faixa de 200 a 300 nm com absorção máxima em torno de 200 nm

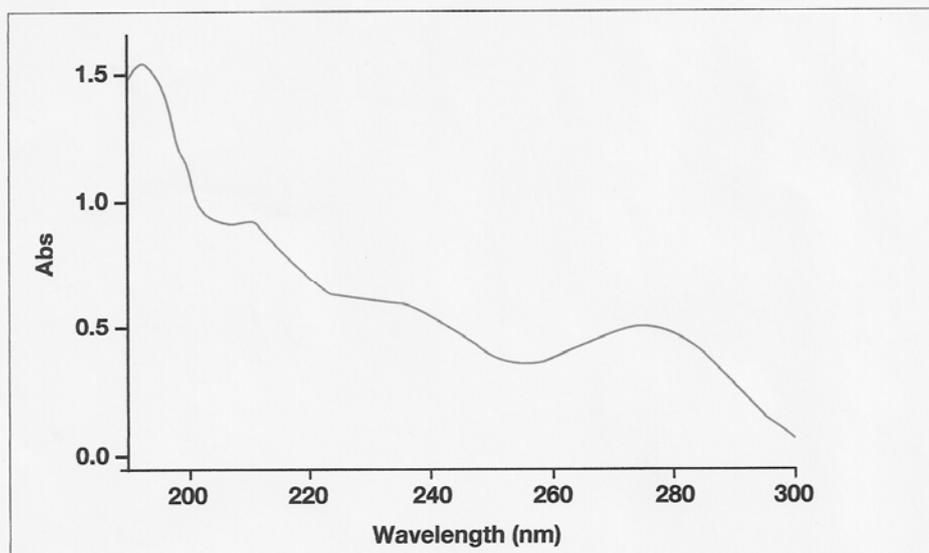


Figura 3. Espectro de absorção da flucitossina na faixa de 200 a 300 nm com absorção máxima em torno de 200 nm

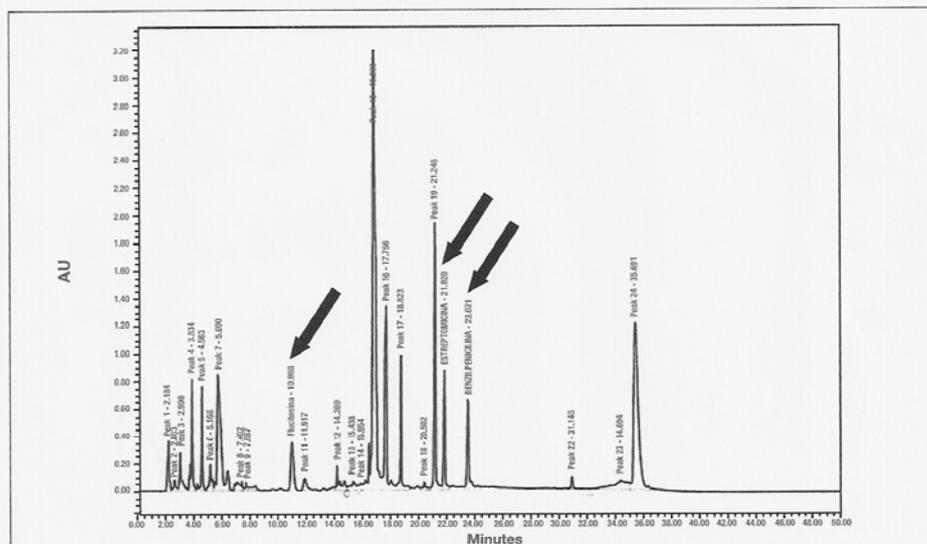


Figura 4. Cromatograma do meio de cultura Schneider contendo flucitossina, estreptomicina e benzilpenicilina, nas concentrações de 100 µg / mL, 200 µg / mL e 200 unidades / mL

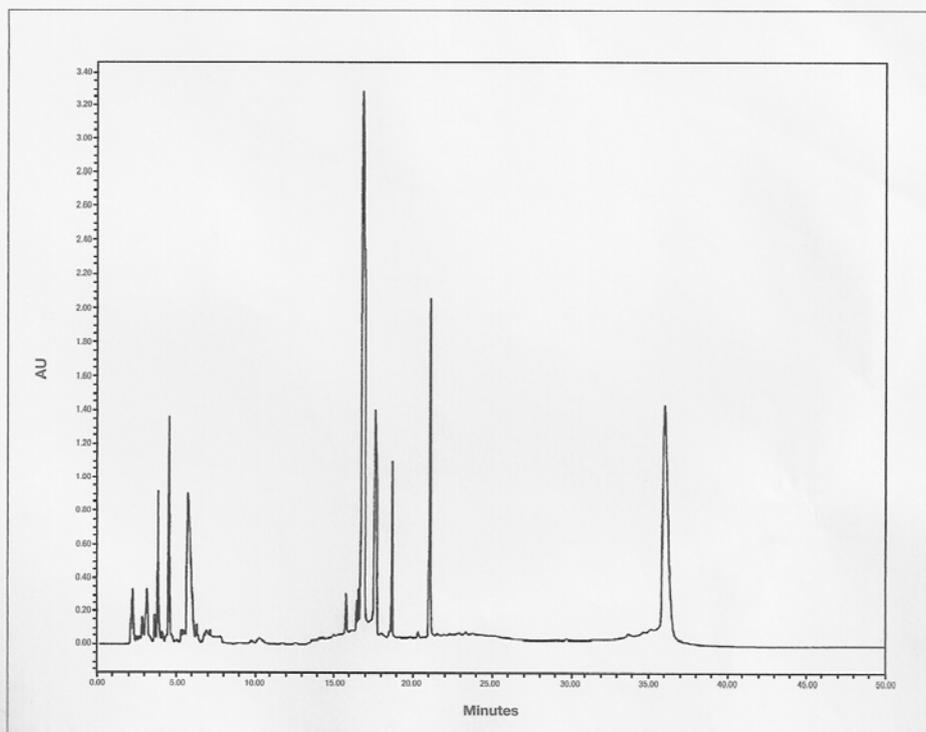


Figura 5. Cromatograma do meio de cultura Schneider sem adição de flucitosina, estreptomina e benzilpenicilina (Branco)

O fluxo da fase móvel foi 1 mL/min. A coluna foi mantida a 27°C e o volume de injeção foi 20 µL. O comprimento de onda escolhido foi 200 nm preferencial para detecção da estreptomina, conforme os espectros de absorção no ultravioleta das substâncias envolvidas. Conforme os espectros de varredura de 200 a 300 nm das substâncias: benzilpenicilina (Figura 1), estreptomina (Figura 2) e flucitosina (Figura 3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cromatograma (Figura 4) mostra a separação dos picos correspondentes a flucitosina, estreptomina e benzilpenicilina em meio de cultura Schneider nas concentrações de 100 µg / mL, 200 µg / mL e 200 unidades / mL, com tempos de retenção de 10,98; 21,92 e 23,62

minutos, respectivamente. O cromatograma (Figura 5) é referente ao meio de cultura sem adição de flucitosina, estreptomina e benzilpenicilina.

Observando-se as estruturas da benzilpenicilina (Figura 6), da estreptomina (Figura 7) e da flucitosina (Figura 8) e os seus respectivos valores de pKa optou-se por trabalhar fazendo pareamento iônico dos grupamentos amina com alquilsulfonato em meio ácido em pH de 2,2. Este valor de pH está dentro da faixa operacional da coluna, recomendada pelo fabricante, de 2,0 a 8,0. A estreptomina possui três grupos amina tituláveis, sendo que dois deles são grupos guanidina fortemente alcalinos ($pK_{a_2} = 11,5$ e $pK_{a_3} = 12,1$). O outro grupo trata-se do metilamino que pode ser considerado como fracamente básico ($pK_{a_1} = 8$) em comparação aos demais (13).

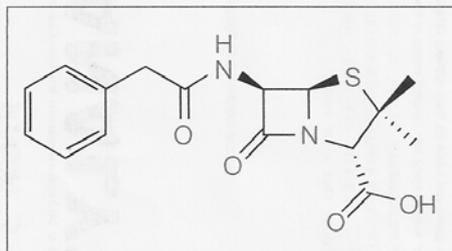


Figura 6. Estrutura da benzilpenicilina

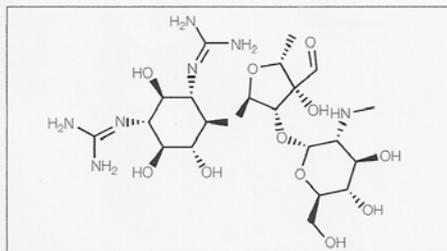


Figura 7. Estrutura da estreptomicina

Tabela 2. Normas internacionais para os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico

Parâmetro	Limites recomendados
K' (Fator de capacidade)	K' > 2, em relação ao Volume morto ou a outro pico
N (Pratos teóricos)	N > 2000
T (Fator de cauda ou assimetria)	Máximo 2
R (resolução)	R > 2, entre o pico de interesse e quaisquer interferentes

Tabela 3. Valores de K', N, T e R obtidos para cada substância

Parâmetro	Benzilpenicilina	Estreptomicina	flucitosina
K' (Fator de capacidade)	13,8	12,7	5,9
N (Pratos teóricos)	223045	269459	12861
T (Fator de cauda ou assimetria)	0,99	0,99	1,2
R (resolução)	8,9	4,3	2,3

Nestas condições de pH a estreptomicina estará na forma totalmente ionizada facilitando assim o pareamento iônico com o ácido 1-heptanosulfônico.

A flucitosina possui dois valores de pKa, um referente a lactama que é uma amina aromática de anel heterocíclico, considerada uma base forte, cujo valor é 10,7 (pKa₁) e o outro refere-se a amina primária, de caráter ácido devido a deslocamento do par de elétrons pelo anel aromático, cujo valor é 2,9 (pKa₂) (14). Nestas condições de pH o grupamento básico estará na forma totalmente ionizada facilitando assim o pareamento iônico com o ácido 1-heptanosulfônico.

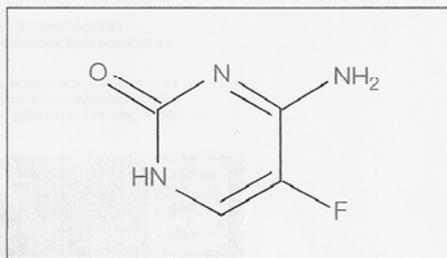


Figura 8. Estrutura da flucitosina

Em pH 2,2 a benzilpenicilina estará parcialmente ionizada visto seu pKa ser 2,8. Para se obter a total supressão da ionização da benzilpenicilina teríamos que trabalhar em valores inferiores a 2,0 porém, isso não é recomendado pois a faixa de pH operacional da coluna, segundo o fabricante é de 2 a 8. No entanto como o sinal cromatográfico referente a benzilpenicilina foi considerado satisfatório nenhuma alteração nas condições cromatográficas foi requerido.

A ordem de eluição tem a ver com a polaridade das moléculas em função das fases estacionária e móvel.

Em termos dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico (15) os ditames internacionais recomendam valores conforme apresentado na Tabela 2.

Os relatórios obtidos para cada substância demonstram que os resultados obtidos em termos de K', N, T e R foram muito satisfatórios em relação aos ditames internacionais conforme apresentado na Tabela 3.

CONCLUSÃO

O método proposto para separação das substâncias presentes no meio de cultura mostrou-se eficaz, podendo ser utilizado posteriormente para análise de estabilidade das mesmas a fim de determinar um prazo de validade para sua utilização. Visto a complexidade da matriz (Branco), o método proposto foi seletivo para a separação das substâncias estudadas (sem coeluição).

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007. 182 p.
2. MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, v.10 (supl. 2), p. 359, 1994.
3. GONTIJO, B; CARVALHO, M, L, R. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Uberaba, v.36(1), p. 71, jan/fev. 2003.
4. PALOMINO, J.C.; GUERRA, H.; LUMBREPERAS, H. A selective medium for primary isolation of South American Leishmanias. *Tropenmod. Parasit.* New York, v. 34, p.229, 1983.
5. VERMES, A.; SIJS, H.V.D.; GUCHELAAR, H. An accelerated stability of 5-flucytosine in intravenous-solution. *Pharm. World Sci.* Printed in Netherlands, v.21(1), p. 35, 1999.
6. OKERMAN, L.; JOHAN, V.H.; ZUTTER, L. Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing. *Analytica Chimica Acta.* 586, p. 284, 2007.
7. PEZZA, L. et al. Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol em Leite bovino por cromatografia eletrocínica micelar. *Quim. Nova.* V. 29(5), p.926-931, 2006.
8. UJIKAWA, K. Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* V. 39(2), p.149-158, 2003.
9. NICHOLAS, E.; HESS G.; COLTEM H.R. Degradation of Penicillin, ticarcillin and carbenicillin resulting from storage of unit doses. *The New England Journal of medicine.* V. 306(9), p.547, 1982.
10. VIERA, J.G.H.; NAKAMURA O.H.; NOGUTI, K.O. Aplicação da Cromatografia Líquida de Alta Performance Como Método Preparativo Para a Dosagem de Esteróides Hormonais Por RIE: Dosagens de 17OH-Progesterona e Diodrostosterona. *Arq Bras Endocrinol Metab.* V. 46(1), p.91-96, 2002.
11. GRANADOS, O.; MEZA, G. A direct method to estimate streptomycin and its putative ototoxic derivative, streptidine, in blood serum: Application to streptomycin-treated humans. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* V. 43, p. 625, 2007.
12. FARAG, S.A. Simultaneous liquid chromatographic analysis of the β -Lactam antibiotics cefazolin, cefadroxil, cephalixin, ampicillin, and cephadrine in solution. *Journal of AOAC International.* V.81 (2), p. 381, 1998.
13. NYS, E.M. et al. Determination of ionization constants of streptomycin by the indicator method. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* V.5 (9), p.576, 1971.
14. WAYSEK, E.H.; JOHNSON, J.H. *Analyt profiles.* 5:128, 1977.
15. Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods, November 1994. Food and drug administration - FDA.

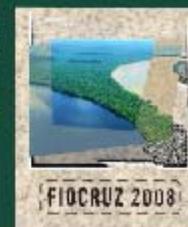
Anexo 3 –

Certificado de participação na VI
bienal de pesquisa da FIOCRUZ



VI
BIENAL
DE PESQUISA
XVI RAIC

AMAZÔNIA
EVOLUÇÃO E DIVERSIDADE
20 a 24 de outubro de 2008



CERTIFICADO

Certifico que CINTIA XAVIER DE MELLO participou da sessão de pôster na VI Bienal de Pesquisa, realizada pelas Vice-Presidências de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico - VPPDT e de Desenvolvimento Institucional e Gestão do Trabalho - VPDIGT, da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, no período de 20 a 24 de outubro de 2008, no Rio de Janeiro, apresentando o trabalho:

SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DOS ANTIBIÓTICOS PENICILINA G E ESTREPTOMICINA E DO ANTIFÚNGICO FLUCITOSINA EM MEIO DE CULTURA SCHNEIDER®

Com o(s) seguinte(s) co-autor(es): SHIRLEY ABRANTES, MARIA DE FÁTIMA MADEIRA, ARMI W. NÓBREGA, ALESSANDRA BOGIO, ANA PAULA DA SILVA OLIVEIRA, ANDRÉ MAZZEI

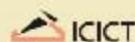
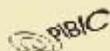
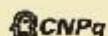
Rio de Janeiro, 24 de outubro de 2008

José da Rocha Carneiro
Vice-Presidente de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico
Fundação Oswaldo Cruz

Paulo Cardalho
Vice-Presidente de Desenvolvimento Institucional e Gestão do Trabalho
Fundação Oswaldo Cruz

Laura Grizélia Simões Vitor
Coordenadora de Recursos Humanos em Pesquisa/VPPDT
Fundação Oswaldo Cruz

Apoio:



Realização:

