

# Determinação colorimétrica de boro em amostras biológicas para controle da terapia por captura neutrônica e $^{10}\text{B}$ boro (BNCT).

## *A colorimetric determination of boron in biological sample for boron neutron capture therapy (BNCT)*

MARIA APARECIDA PIRES CAMILO\* e ULYSSES TOMAC JR.\*\*

\* Pesquisador, Mestre em Tecnologia Nuclear. \*\* Biólogo

**Unitermos:** Terapia por captura neutrônica e  $^{10}\text{B}$  boro\*

\* BNCT\* Determinação de boro\* Colorimetria

**Key Words:** Boron Neutron capture therapy\* BNCT\*

Boron Determination\* Colorimetry

**RESUMO** — A terapia por Captura Neutrônica e  $^{10}\text{B}$  Boro (BNCT) tem apresentado melhores prognósticos para o tratamento de gliomas e glioblastomas com grau III e IV, do que outras modalidades de terapia. Durante o tratamento é necessário conhecer os níveis de  $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  em vários compartimentos do organismo e para tanto, foi padronizado o método de determinação colorimétrica de boro utilizando curcumine. Este se mostrou simples, reprodutível e com sensibilidade adequada para este controle.

### Introdução

Na terapia contra o câncer é tão importante preservar as funções normais do organismo, quanto destruir o tumor. No caso particular de tumor cerebral, esta necessidade é muito acentuada, pois se as funções normais não forem preservadas, haverá uma deterioração da qualidade de vida do paciente; que em muitos casos pode não justificar o aumento na sobrevida.

A ocorrência de tumores cerebrais é 5 a 10% do total de neoplasmas. A incidência relativa de gliomas comparado com outros tumores diminui com o aumento da idade, por exemplo tumores do SNC, dos quais 50% são gliomas, são o segundo mais freqüente em crianças menores que 15 anos e o terceiro mais freqüente em homens entre 15 a 34 anos (7). Gliomas são localmente invasivos e podem ser espalhados via fluido cérebro-espinhal, mas normalmente não fazem metástase para outras partes do corpo. A cirurgia é o principal método de tratamento destes tumores, mas esta capacidade de invasão local e infiltração faz com que os resultados não sejam satisfatórios. O tempo médio de sobrevida pós-tratamento é menor que 6 meses com menos que 5% de sobrevida em 3 anos. Pacientes tratados apenas com te-

rapia de apoio vivem aproximadamente 3 meses, e para radioterapia ou radioterapia combinada com quimioterapia ou cirurgia, o tempo médio de sobrevida é entre 8 a 11 meses. No entanto, pacientes portadores de gliomas malignos, grau III e IV tratados pela terapia por captura neutrônica e  $^{10}\text{B}$ , têm tido melhores prognósticos. Para 77 indivíduos tratados no Japão entre 1968 a 1986, a sobrevida média foi de 25,6 meses e a sobrevida em 5 anos de 58,3% (4).

A terapia por captura neutrônica e  $^{10}\text{B}$  foi proposta em 1936 por Locher, G.L. (6), 4 anos após a descoberta do neutron, entretanto as primeiras práticas clínicas foram em 1952 e sem sucesso. Esta terapia baseia-se no princípio de uma destruição seletiva das células tumorais por meio da reação  $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ . Teoricamente, é depositada a maior parte da dose de radiação nas células tumorais porque  $^7\text{Li}$  e partícula alfa possuem baixa penetração no tecido, menos que 14  $\mu\text{m}$  a partir do local da reação de captura (a distância é comparável ao diâmetro de uma célula vermelha).

Para realizar esta terapia, três fatores são essenciais. Primeiro deve haver uma alta concentração de  $^{10}\text{B}$  nas partes viáveis do neoplasma (20-50 mg/kg de tecido). Para tanto, o composto de boro deve ser injetado via endovenosa e não diretamente na suposta área tumoral, pois as dimensões precisas de um tumor invasivo são desconhecidas. Um segundo requerimento é a fonte de neutrons, (um reator nuclear), que permite obter o alto fluxo de neutrons térmicos necessários para a terapia. E, finalmente, deve haver uma diferença signifi-

Trabalho realizado no Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas.

Travessa R, nº 400 - Cidade Universitária - Cx. Postal 11049 - Pinheiros - São Paulo - SP.

ficativa entre os níveis de  $^{10}\text{B}$  no tumor e nos vasos sanguíneos, assim como no tumor e no tecido adjacente, para permitir uma completa erradicação do tumor sem afetar o tecido normal. Esta diferença na concentração de boro entre o tumor (T) e o tecido normal (N) é avaliada pela razão T/N. No caso de tumores cerebrais esta razão é usualmente alta ( $T/N = 2$  a  $3$ ) devido à deposição de  $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  nas células tumorais e a não penetração deste composto nas células normais devido à barreira hematoencefálica (3).

Na rotina de uma terapia, os níveis de  $^{10}\text{B}$  devem ser controlados em amostras de sangue e urina, em diferentes intervalos de tempo e em biópsia do tumor para se precisar a dose local total. O objetivo deste trabalho é apresentar a padronização de um método colorimétrico para dosagem de boro em amostras de urina como um dos estudos preliminares para a implementação da terapia por captura neutrônica e  $^{10}\text{B}$  (BNCT) em tumores cerebrais.

### Material e Métodos

O método escolhido (5) utiliza para a curva de calibração uma solução estoque de ácido bórico 0,1 mg/ml em água destilada. São feitas diluições sucessivas de forma a se obter as concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80  $\mu\text{g}$  de boro por mililitro de solução. A cada diluição adiciona-se 2,0 ml de 2-etil-1,3-hexanodiol 10% (v/v) em clorofórmio; agita-se durante 3 minutos e, em seguida, centrifuga-se a 2000 rpm por 2 minutos. A fase aquosa é descartada por aspiração. Todas estas etapas são processadas em tubos de quartzo.

Para a reação colorimétrica adiciona-se a 0,5 ml do extrato clorofórmico, 1 ml da solução de curcumine 0,375% (p/v) em ácido acético glacial e 0,3 ml de ácido sulfúrico concentrado. Esta reação é processada em frascos de polipropileno para, assim como o uso de tubos de quartzo citados anteriormente, efetivamente evitar eventuais contaminações. A mistura é incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e, então, diluída para 30 ml com etanol 95%. A observância é lida em 555 nm, com 1 cm de percurso óptico. O conteúdo de boro das amostras é encontrado a partir da curva de calibração. O valor do branco (preparado apenas com água destilada) é descontado antes dos cálculos.

Utilizando este método, foram ensaiadas amostras de urina, contendo ácido bórico e mercaptoundecahidrododecaborato de sódio ( $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ ). No caso de amostras com este composto, antes da dosagem é necessário um tratamento com 1 ml de permanganato de potássio 2% durante 1 hora, a  $95^\circ\text{C}$  em banho-maria. Esta oxidação é processada em tubos de quartzo fechados com tampa de teflon. Plasma e urina com concentrações acima de 80  $\mu\text{g}$  devem ser diluídos em água destilada, antes da dosagem.

### Resultados

O método escolhido baseia-se na reação do boro com curcumine em meio ácido, formando um complexo de coloração vermelha ("rosocyanine") estável por no mínimo 1 hora. O comprimento de onda escolhido para as leituras da curva de calibração foi 555 nm (por permitir

melhor ajuste no espectrofotômetro), embora a absorção máxima ocorresse a 552 nm (Figura 1).

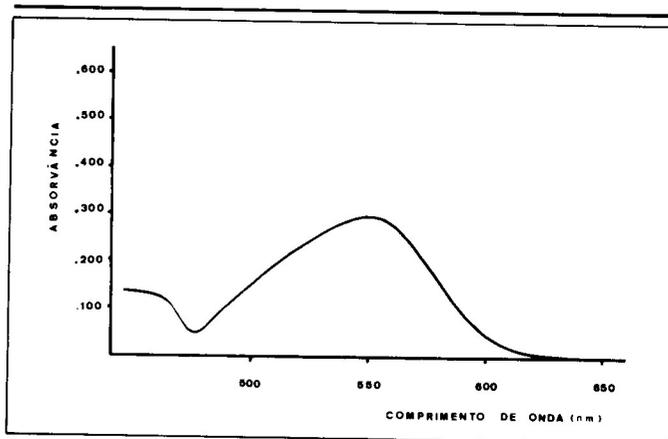


Fig. 1 — Espectro de absorção do complexo "rosocyanine" formado após a reação do boro com curcumine. Leitura realizada na região visível entre 450 e 650 nm. Ponto de absorção máxima 552 nm.

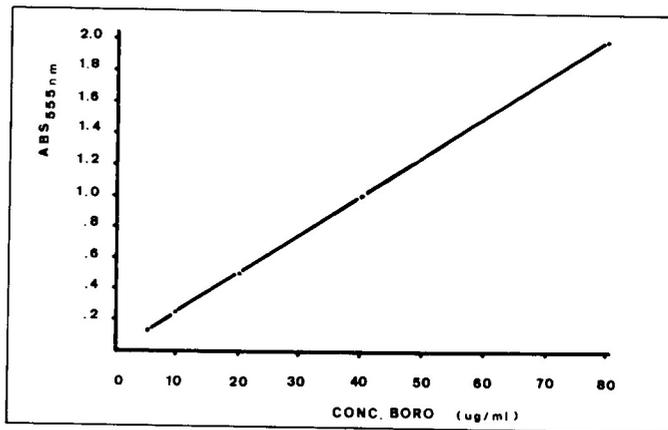


Fig. 2 - Curva de calibração para determinação de boro, ajustada por análise de variância para regressão linear:  $Y = 0,02468.X$ ,  $s = 0,015$ , C.V. = 2,0%.

Para a curva de calibração adotou-se o modelo de regressão linear: Absorvância = A. Dose + B, com  $r^2 = 0,9998$ ; mas como há intersecção com a origem, este pode ser expresso simplesmente como  $\text{Abs} = A. \text{Dose}$ . O intervalo de dose escolhido para as determinações foi de 5 a 80  $\mu\text{g}$  de boro (Figura 2). O método se mostrou reprodutível, apresentando um coeficiente de variação (C.V.) menor que 7% para os valores interensaios obtidos ao longo de 4 meses.

A recuperação média para as amostras de urina em que foram adicionadas quantias conhecidas de ácido bórico, foi 94,7% e os C.V. para as replicatas foram menores que 5% (Tabela 1). Considerando estes valores, o total de boro presente em uma amostra de urina pode ser calculado por:  $\text{B } (\mu\text{g/ml}) = \text{boro medido } (\mu\text{g}) \times \text{fator } 1000/947 / \text{amostra (g ou ml)}$ .

A relação entre os valores de boro adicionados às amostras de urina e os valores determinados no doseamento, permitiu aferir a exatidão das medidas (Figura 3). Por análise de variância da regressão determinou-se que a incerteza na exatidão do ensaio é menor que 6%.

Tabela 1

Conc. B Adic. (ug)	Conc. B Medido (ug)	Média (ug)	C.V. (%)	Recuperação (%)
5,0	4,9	4,8	3,0	96
5,0	4,7			
5,0	4,8			
5,0	4,7			
20,0	18,6	18,8	2,2	94
20,0	18,6			
20,0	19,4			
20,0	18,6			
40,0	35,6	37,6	5,1	94
40,0	39,7			
40,0	38,9			
40,0	36,5			

Valores de boro adicionados à amostras de urina e valores medidos utilizando-se o método colorimétrico com curcumine.

Nas determinações das concentrações do composto em diversas amostras de urina observou-se que a oxidação com permanganato de potássio é uma etapa crítica para a exatidão das medidas. Quanto a precisão, esta se manteve nos níveis do ensaio, ou seja, com C.V. menor que 5%.

### Conclusão

Inúmeros métodos têm sido descritos para a determinação de boro em amostras biológicas, mas alguns utilizam reativos perigosos como peróxido de hidrogênio

**Abstract** - The boron neutron capture therapy (BNCT) has shown better prognosis in the treatment of gliomas and glioblastomas grade III and IV than other therapies. During the treatment the levels of  $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  must be known in several compartments of the organism and with this purpose the method of colorimetric determination of boron using curcumine was established. This method is simple, reproducible and has adequate sensitivity for this control.

### Referências Bibliográficas

1. ABE, M.; AMANO, K.; KITAMURA, K.; TATEISHI, J.; HATANAKA, H. Boron distribution analysis by alpha-autoradiography. *J.N.Med.*, 72(5):677-684, 1986.
2. BASSET, J.; DENNEY, R.C.; JEFFERY, G.H.; MENDHAM, J.. Vogel-Análise Inorgânica Quantitativa. Rio de Janeiro, Guanabara Dois S.A., 1981, p. 117-118.
3. HATANAKA, H.; AMANO, K.; KANEMITSU, H.; IKEUCHI, I.; YOSHIZAKI, T. Boron uptake by human brain tumors and quality control of boron compounds. In: Hatanaka, H. ed. Boron Neutron Capture Therapy for Tumors. Tokyo, 1986. p. 77-85.
4. HATANAKA, H.; TAKAGAKI, M.; AMANO, K.; SANA, K.; YASUKOCHI, H.; EGAWA, S. Clinical results of boron neutron capture therapy for gliomas in the cerebral mantle. IN: Abstracts of the Third International Symposium on Neutron Capture Therapy, Bremen (FRG) 31May-31June 1988.
5. IKEUCHI, I. & AMANO, T.. A colorimetric determination of boron in biological materials. *Chem. Pharm. Bull.*, 26 (9): 2619-2623, 1978.
6. LOCHER, G.L. Biological effects and therapeutic possibilities of neutron. *Amer.J.; Roentgenol. Radium Therapy.*, 36:1-13, 1936.
7. PERKS, C.A.; MILL, A.J.; CONSTANTINE, G.; HARRISON, K.G.; GIBSON, J.A.B.. A review of boron neutron capture therapy (BNCT) and the design and dosimetry of a high-intensity, 24 keV, neutron beam for BNCT research. *Brit.J.Rad.*, 61:1115-1126, 1988.

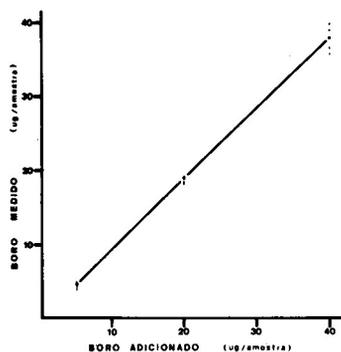


Fig. 3 - Análise de regressão para estudo comparativo da recuperação de boro em urina:  $Y = 0,9417.X$ ,  $s = 1,04$ , C.V. = 5,1%.

nio 90% (5), exigem equipamentos complexos como a alfa-autoradiografia (1), não são reprodutíveis para microanálise como o método da fenantroína (2) etc. O método escolhido é simples, seguro e sensível para os nossos propósitos, permitindo a dosagem de amostras de até 0,5  $\mu\text{g}$ .