

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia**

**Patricia Silveira Martins**

**Mecanismos envolvidos no aumento da  
concentração plasmática de Sb a partir  
das composições de antimoniato de meglumina  
com ciclodextrina, visando o tratamento oral das  
leishmanioses**

**BELO HORIZONTE - MG**

**FEVEREIRO – 2007**

**Patricia Silveira Martins**

**Mecanismos envolvidos no aumento da  
concentração plasmática de Sb a partir  
das composições de antimoniato de meglumina  
com ciclodextrina, visando o tratamento oral das  
leishmanioses**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard**

**Belo Horizonte - MG  
fevereiro - 2007**

Ao meu orientador, Professor Frédéric Jean Georges Frézard, pela dedicação e valiosa contribuição a este projeto

Aos professores, pela importante colaboração:

Dr. Adriano M. C. Pimenta, do Departamento de Bioquímica e Imunologia e Biofísica - Instituto de Ciências Biológicas, ICB/UFMG

Dr. Alan L. de Melo, do Departamento de Parasitologia - Instituto de Ciências Biológicas, ICB/UFMG

Dr. José B. B. da Silva, do Departamento de Química - Instituto de Ciências Exatas, ICEX/UFMG

Dra. Cynthia Demicheli, do Departamento de Química - Instituto de Ciências Exatas, ICEX/UFMG

Dra. Olguita G. F. Rocha, do Laboratório de Análise de Traces Metálicos - Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC

Meu agradecimento especial:

Maria Irene Yoshida, do Setor de Análise Térmica do Departamento de Química - Instituto de Ciências Exatas, ICEX/UFMG

Robson Cota, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico e Nuclear, CDTN/UFMG

Aos colegas de laboratório, em especial Ítalo, Fernanda, Dante, Mércia e Ana Paula

Aos amigos de todas as horas

À minha família

## LISTA DE ABREVIATURAS

AM – antimoniato de meglumina

BPR - vermelho de bromopirogalol

CD - ciclodextrina

DC - dicroísmo circular

DTNB - 5-5'-Ditiobis (2 - ácido nitrobenzóico)

DRVs – vesículas desidratadas-reidratadas

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ETAAS - espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

GSH - glutationa reduzida

ICP-AES - espectrometria de emissão atômica por Plasma Indutivamente Acoplado

I.V. - espectrometria de absorção na região do infravermelho

LC - leishmaniose cutânea

LMC - leishmaniose mucocutânea

LV - leishmaniose visceral

LUVs - vesículas unilamelares grandes

LVs - vesículas multilamelares

NMG - N-metil-D-glucamina

WHOP/OMS - Organização Mundial de Saúde

PC - fosfatidilcolina

PKDL - Post Kala azar dermal leishmaniasis

RMN - ressonância magnética nuclear

Sb(III) - antimônio trivalente

Sb(V) - antimônio pentavalente

SUVs - vesículas unilamelares pequeñas

$\beta$ -CD -  $\beta$ -ciclodextrina

## ÍNDICE

### I - REVISÃO DE LITERATURA

<b>As leishmanioses</b> .....	17
Conceito, manifestações clínicas e aspectos epidemiológicos.....	17
Ciclo evolutivo: limitações para o controle.....	20
A quimioterapia das leishmanioses: desafios e perspectivas.....	22
<b>Antimoniais pentavalentes: estrutura e mecanismo de transporte transmembrana</b> .....	27
<b>Absorção oral de medicamentos e influência das ciclodextrinas</b> .....	30
<b>Estudo de compostos de associação antimonial-ciclodextrina</b> .....	37

### II - OBJETIVOS.....40

### III - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aparelhagem utilizada na caracterização dos compostos.....	41
3.2. Preparação e caracterização físico-química do AM no estado polimerizado e despolimerizado.....	45
3.2.1. Síntese do AM.....	45
3.2.2. Preparação do AM no estado despolimerizado.....	45
3.2.3. Caracterização físico-química do AM.....	46
3.3. Preparação e caracterização físico-química das composições antimoniato de meglumina/ $\beta$ -ciclodextrina (AM/ $\beta$ -CD).....	46
3.3.1. Composição AM- $\beta$ CD em relação molar 1:1.....	46
3.3.1.1. Preparação da composição AM/ $\beta$ -CD.....	46
3.3.1.2. Caracterização físico-química da composição AM/ $\beta$ -CD.....	46

3.5. Estudo da permeação de antimônio em modelo lipídico de membrana.....	53
3.5.1. Preparação e caracterização da suspensão de lipossomas.....	53
3.5.1. Preparação e caracterização da suspensão de lipossomas.....	53
3.5.1.1. Preparação da suspensão de lipossomas.....	53
3.5.1.2. Caracterização.....	54
3.5.1.2.1. Dosagem de tiol (Glutathiona - GSH).....	54
3.5.1.2.2. Dosagem de fosfolípido.....	55
3.5.2. Determinação da cinética de redução de Sb(V) a Sb(III).....	55
3.5.3. Avaliação da estabilidade da membrana lipossomal na presença das preparações de antimonial.....	57
3.6. Protocolos experimentais.....	54
3.7. Análises estatísticas.....	54

#### **IV – RESULTADOS**

I - Estudo do mecanismo de ação da composição AM/ $\beta$ -CD.....	60
I.1. Influência da etapa de aquecimento nas características físico-químicas e farmacológicas da mistura AM/ $\beta$ -CD	
I.1.1. Caracterização do AM por ESI-MS nos modos positivo e negativo.....	60
I.1.2. Efeito do aquecimento do AM no seu estado de polimerização e nível de absorção oral.....	69
I.1.2.1. Caracterização por osmometria de pressão de vapor.....	69
I.1.2.2. Caracterização por RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C.....	72
I.1.2.3. Caracterização por TG.....	75
I.1.2.4. Caracterização por I.V.....	78
I.1.2.5. Efeito do aquecimento do AM no nível de absorção de Sb por via oral.....	80
I.1.3. Estudo da interação do AM com $\beta$ -CD em solução aquosa	

I.1.3.1. Estudo da interação por osmometria de pressão de vapor.....	82
I.1.3.2. Caracterização da mistura AM/ $\beta$ -CD por ESI-MS.....	82
I.1.3.3. Estudo da interação por dicróismo circular.....	89
I.1.4. Efeito da interação AM/ $\beta$ -CD sobre o nível de absorção oral de Sb.....	92
I.2. Influência da etapa de liofilização nas características físico-químicas da composição AM/ $\beta$ -CD	
I.2.1. Caracterização por dicróismo circular (DC).....	93
I.2.2. Caracterização por RMN <sup>1</sup> H.....	94
I.2.3. Caracterização da composição AM/ $\beta$ -CD por ESI-MS.....	95
I.3. Cinética de liberação do AM a partir da composição AM/ $\beta$ -CD.....	97
I.4. Influência da forma química da ciclodextrina na absorção oral de Sb.....	99

### III - Modelo lipídico de membrana para o estudo da permeação de Sb(V)

#### III.1. Concepções e validação do modelo lipídico de membrana

III.1.1. Conceitos básicos.....	112
III.1.2. Avaliação da velocidade da reação de redução do Sb(V) a Sb(III) pela GSH.....	114
III.1.3. Avaliação do local de redução do Sb(V).....	115
III.1.4. Interferência da $\beta$ -CD na integridade da membrana dos lipossomas.....	116
III.1.5. Determinação das concentrações de GSH nos compartimentos interno e externo dos lipossomas.....	117
III.1.6. Influência do pH interno e da concentração de GSH interna na velocidade de redução.....	117

III.4. Determinação do coeficiente de permeabilidade do Sb(V) através da bicamada lipídica.....	122
---	-----

<b>V - DISCUSSÃO.....</b>	<b>125</b>
<b>VI - CONCLUSÕES.....</b>	<b>135</b>
<b>VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>137</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> Espécies iônicas identificadas no AM por ESI(+)-MS.....	65
<b>TABELA 2</b> Espécies iônicas identificadas no AM por ESI(-)-MS.....	68
<b>TABELA 3.</b> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos prótons do AM, em D <sub>2</sub> O, submetido ou não à dissociação, determinados a partir do espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 mHz).....	73
<b>TABELA 4</b> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos do AM em D <sub>2</sub> O, submetido ou não à dissociação, determinados a partir do espectro de RMN <sup>13</sup> C (400 mHz).....	73
<b>TABELA 5</b> Valores de osmolaridade (mOsm) determinados para soluções de AM, de $\beta$ CD e da mistura AM + $\beta$ CD.....	82
<b>TABELA 6</b> Complexos Sb- $\beta$ -CD identificados no espectro ESI(-)-MS da mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD.....	88
<b>TABELA 7</b> Complexos Sb- $\beta$ -CD identificados em ESI(-)-MS para a composição AM/ $\beta$ -CD 1:1 liofilizada.....	97
<b>TABELA 12</b> % calceína liberada de lipossomas PC (50 mM), após 6 hs de incubação, a 37°C.....	116

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> Estrutura proposta para a espécie de $m/z$ 507 no AM.....	28
<b>FIGURA 2</b> Estrutura da $\beta$ -CD e modelos para a formação de compostos de inclusão e associação.....	33
<b>FIGURA 3</b> Processo de absorção de fármacos em complexos de inclusão, após dissolução e dissociação no trato gastrointestinal.....	35
<b>FIGURA 4</b> Espectros de massa ESI(+)-MS de soluções aquosas de AM, em diferentes condições de concentração e pH.....	62
<b>FIGURA 5</b> Estruturas propostas para as principais espécies encontradas por ESI(+)-MS.....	64
<b>FIGURA 6</b> Espectros de massa ESI(-)-MS de soluções de AM em água, em diferentes concentrações.....	66
<b>FIGURA 7</b> Estruturas propostas para as principais espécies encontradas no espectro de ESI(-)-MS do AM.....	67
<b>FIGURA 8</b> Espectros ESI-MS do Glucantime® (AM de uso comercial).....	69
<b>FIGURA 9</b> Cinéticas de evolução da osmolaridade de soluções de AM em diferentes temperaturas de incubação.....	70
<b>FIGURA 10</b> Osmolaridades de soluções de AM dissociado ou não dissociado.....	71
<b>FIGURA 11</b> Numeração dos átomos de hidrogênio e carbono na molécula N-metil-glucamina deuterada (NMG).....	72
<b>FIGURA 12</b> Espectros de RMN <sup>13</sup> C do AM, em D <sub>2</sub> O, submetido ( <b>B</b> ) ou não ( <b>A</b> ) ao processo de aquecimento.....	74
<b>FIGURA 13</b> Curvas TG/DTG do AM submetido ( <b>B</b> ) ou não ( <b>A</b> ) ao processo de aquecimento e liofilizado.....	77
<b>FIGURA 14</b> Espectros na região do infravermelho do AM, submetido ( <b>B</b> ) ou não ao processo de aquecimento ( <b>A</b> ).....	79
<b>FIGURA 15</b> Concentrações de Sb em soro de camundongos SWISS três horas após a administração por via oral de diferentes preparações do AM (100 mg/Kg).....	81
<b>FIGURA 16</b> Espectro de massa ESI(+)-MS da mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD em TFA 0,1% (p/v).....	83

<b>FIGURA 17</b> Espectro de massa ESI(+)-MS da $\beta$ CD em TFA 0,1% (p/v).....	84
<b>FIGURA 18</b> Espectro de massa resultante da fragmentação (CID) da espécie de $m/z$ 1446 (CID) na mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD.....	85
<b>FIGURA 19</b> Estrutura proposta para a espécie de $m/z$ 1446 identificada na mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD por ESI(+)-MS.....	85
<b>FIGURA 20</b> Espectro de massa ESI(-)-MS da mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD em água.....	86
<b>FIGURA 21</b> Espectro de massa ESI(-)-MS da $\beta$ CD, em água.....	87
<b>FIGURA 22</b> Espectro de massa ESI(-)-MS resultante da fragmentação (CID) da espécie de $m/z$ 1499 na mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD.....	88
<b>FIGURA 23</b> Estruturas propostas para as espécies de $m/z$ 1463 e 1322 identificadas na mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD por ESI(-)-MS.....	89
<b>FIGURA 24</b> Cinética de aparecimento de um sinal característico de dicroísmo circular, centrada em 215 nm, após incubação do antimoniato de potássio com NMG, a 60°C.....	90
<b>FIGURA 25</b> Titulação do AM com $\beta$ -CD, a 60°C, por dicroísmo circular.....	91
<b>FIGURA 26</b> Concentrações de Sb em soro de camundongos SWISS, 3 horas após a administração por via oral de diferentes preparações do AM (100 mg/Kg peso corporal).....	93
<b>FIGURA 27</b> Espectros de dicroísmo circular de diferentes preparações de AM, mistura equimolar de AM + $\beta$ -CD em água e composição AM/ $\beta$ -CD (aquecida e liofilizada), na concentração de Sb de 0,01 mol/L.....	94
<b>FIGURA 28</b> Região do espectro de RMN <sup>1</sup> H da composição AM/ $\beta$ -CD e do AM, em D <sub>2</sub> O, correspondente aos sinais de hidrogênio do grupo metil da meglumina.....	95
<b>FIGURA 29</b> Espectro de massa ESI(-)-MS da composição AM/ $\beta$ -CD (submetida aos processos de aquecimento e de liofilização), em água, na faixa de $m/z$ 200-1000.....	96
<b>FIGURA 30</b> Espectro de massa ESI(-)-MS da composição AM/ $\beta$ -CD (submetida aos processos de aquecimento e de liofilização), em água, na faixa de $m/z$ 1000-1500.....	96

<b>FIGURA 31</b> Cinéticas de variação do sinal de DC, em 220 nm, a 25°C, após preparações da mistura AM + $\beta$ -CDq pré-aquecida e da composição AM/ $\beta$ -CD em água, na concentração de Sb 0,01 mol/L.....	98
<b>FIGURA 32</b> Região do espectro de RMN <sup>1</sup> H da composição AM/ $\beta$ -CD em D <sub>2</sub> O, correspondente aos sinais de hidrogênio do grupo metil do AM, em diferentes tempos após preparação na 0,01 mol/L de Sb.....	99
<b>FIGURA 33</b> Concentrações de Sb em soro de camundongos SWISS, 3 horas após a administração por via oral de diferentes preparações do AM na dose de 100 mg/Kg peso corporal.....	100
<b>FIGURA 41</b> Permeação do Sb(V) em modelo lipídico de membrana, a partir de lipossomas contendo GSH em seu interior.....	113
<b>FIGURA 42</b> Cinéticas de aparecimento de Sb(III) no meio extravascular e na suspensão total, à 37°C e pH 7, para o antimoniato de potássio (20 mM), em presença de lipossomas PC (18 mM).....	115
<b>FIGURA 43</b> Influência do pH intravesicular (3, 4, 5) dos lipossomas de PC, na concentração de Sb(III) produzida no intervalo de 6 hs, a 37°C, a partir do antimoniato (A) e do AM (B), em pH ext = 7.....	118
<b>FIGURA 44</b> Influência da concentração de GSH (0,15 M ou 0,3 M), na concentração de Sb(III) produzida no intervalo de 6 hs, a 37°C, a partir de preparação de lipossomas PC em presença do antimoniato (A) e do AM (B) ([Sb] = 20 M, pH ext = 7, pH int=4).....	119
<b>FIGURA 47</b> Modelo proposto para o mecanismo de ação da $\beta$ -CD na composição AM/ $\beta$ -CD, incluindo a espécie presente na composição AM/ $\beta$ -CD responsável pelo aumento de absorção oral de Sb e o mecanismo de permeação de Sb(V) pela barreira intestinal.....	131



## RESUMO

O antimoniato de meglumina (AM), complexo de antimônio pentavalente (Sb(V)) com N-metil-D-glucamina (NMG), tem sido usado como medicamento de primeira escolha no tratamento das leishmanioses. De administração parenteral, recentemente foi relatado que a associação entre o AM e a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) é capaz de tornar esse antimonial ativo por via oral em modelo de leishmaniose cutânea. Contudo, como o AM é altamente solúvel em água e, muito provavelmente, não interage com a cavidade hidrofóbica da  $\beta$ -CD, os mecanismos responsáveis pelo aumento de absorção oral do antimonial na composição AM/ $\beta$ -CD diferem daqueles que atuam nos complexos de inclusão fármaco/ $\beta$ -CD convencionais. A presente tese propôs fornecer dados sobre o modo de ação da composição AM/ $\beta$ -CD. Para tal, o AM e a composição AM/ $\beta$ -CD foram caracterizados do ponto de vista físico-químico e sua absorção por via oral e permeação em modelo lipídico de membrana foram estudadas. Sabendo-se que o processo de preparo da composição AM/ $\beta$ -CD se dá em duas etapas, em que a mistura equimolar AM +  $\beta$ -CD é aquecida, a 55°C por 48 horas, e em seguida liofilizada, foram avaliados os efeitos do aquecimento e da liofilização nas características físico-químicas daquela composição. Medidas de osmolaridade e análise por ESI-MS de soluções aquosas do AM e da mistura equimolar AM +  $\beta$ -CD comprovaram que o aquecimento promove a dissociação do AM em espécies de baixo peso molecular (Sb-NMG 1:1) e a formação do complexo ternário NMG-Sb- $\beta$ -CD. Análises por dicroísmo circular e ESI-MS permitiram mostrar que a etapa de liofilização promove associações múltiplas entre o AM e a  $\beta$ -CD, incluindo a formação de complexos (NMG-Sb)<sub>2</sub>- $\beta$ -CD e (NMG-Sb- $\beta$ -CD)<sub>2</sub>. Estudos de absorção de Sb por via oral em camundongos a partir das misturas AM +  $\beta$ -CD não aquecida, AM +  $\beta$ -CD aquecida e AM +  $\beta$ -CD aquecida e liofilizada indicaram que a etapa de aquecimento aumenta menos que duas vezes o nível de Sb no soro de animais, enquanto a etapa de liofilização aumenta esse nível de duas a três vezes. Foi desenvolvido e avaliado um modelo lipídico de membrana, consistindo em lipossomas contendo glutathiona reduzida, para o estudo de permeação de Sb(V) através de bicamada lipídica. Este modelo permitiu determinar um coeficiente de permeabilidade para o antimoniato de potássio, cujo valor foi de  $0,82 \times 10^{-10} \text{ cm s}^{-1}$ , a 37°C, para membrana de fosfatidilcolina de soja, valor próximo do relatado na literatura para aquele do íon Cl<sup>-</sup>. A comparação da velocidade de permeação do AM com aquela da composição AM/ $\beta$ -CD não mostrou diferença significativa nas condições de concentração e de temperatura utilizados neste modelo. Esses resultados comprovam que o aquecimento, seguido de liofilização da mistura AM +  $\beta$ -CD são necessários para o aumento significativo na absorção oral de Sb para essa composição. Um estudo por DC revelou ainda que essa composição atua como um sistema de liberação prolongada do AM, podendo alterar seu sítio de absorção, uma vez que a  $\beta$ -CD se mantém intacta por todo o trato gastrointestinal até o cólon. Em adição às novas informações obtidas sobre os mecanismos envolvidos no aumento de concentração plasmática de Sb na composição AM/ $\beta$ -CD, o presente trabalho permitiu propor duas novas formulações para a administração oral do Sb: uma que consiste no AM pré-aquecido, potencialmente menos tóxico e de menor custo, em comparação às composições AM/ $\beta$ -CD; e a outra que consiste numa composição AM/ $\beta$ -CD mais solúvel em relação à composição 1:1, e potencialmente menos tóxica e de menor custo.

## ABSTRACT

Meglumine antimoniate (MA), complex of pentavalent antimony (Sb(V)) with N-methyl-D-glucamine (NMG), is currently an agent of choice for the treatment of leishmaniasis. This compound is considered inactive when given enterally and is subject to rapid renal clearance after parenteral administration, requiring a multiple dosing regimen. Recently, it was reported that the association of MA to  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) enhances the oral absorption of Sb and renders this drug active by the oral route in a model of cutaneous leishmaniasis. However, since MA is highly water-soluble and, most probably, does not interact with the internal hydrophobic cavity of  $\beta$ -CD, the mechanism responsible for the enhanced oral absorption of Sb in the MA/ $\beta$ -CD composition is expected to differ from that involved in conventional inclusion drug/ $\beta$ -CD complexes. The main objective of the present thesis was to investigate the mode of action of the MA/ $\beta$ -CD composition. For that, MA and the MA/ $\beta$ -CD composition were physicochemically characterized and their oral absorption in mice and their permeation across a lipid bilayer model were investigated. Since the preparation of MA/ $\beta$ -CD composition consists in a two-step process, involving the heating of an equimolar MA +  $\beta$ -CD mixture at 55°C for 48 h followed by the freeze-drying of the mixture, the effects of heating and of freeze-drying on the physicochemical characteristics of the resulting composition were evaluated. Osmolarity measurements and ESI mass spectrometry analyses of aqueous MA solutions and equimolar MA/ $\beta$ -CD mixture indicated that the heating step induces the dissociation of MA into species of low molecular weight (1:1 Sb-NMG complex) and the formation of ternary NMG-Sb- $\beta$ -CD complexes. Circular dichroism and ESI mass spectrometric analyses showed that the freeze-drying step promotes multiple associations between MA and  $\beta$ -CD, including the formation of (NMG-Sb)<sub>2</sub>- $\beta$ -CD and (NMG-Sb-CD)<sub>2</sub> complexes. Oral absorption of Sb in mice from MA+ $\beta$ -CD physical mixture, heated MA/ $\beta$ -CD and heated and freeze-dried MA/ $\beta$ -CD indicated that the heating process increases by less than 2-fold Sb concentration in the serum of mice, while the freeze-drying step enhances significantly by 2- to 3-fold the Sb level. A lipid bilayer model, consisting of glutathione (GSH)-containing liposomes made from phosphatidylcholine, was developed in order to evaluate the permeation of Sb(V) across the lipid bilayer. This model allowed the determination of the permeability coefficient of antimoniate. Its value was found to be equal to  $0.82 \times 10^{-10} \text{ cm s}^{-1}$ , which is close to the value reported for Cl<sup>-</sup> ion. The comparison between the permeation rates of MA and of MA/ $\beta$ -CD composition did not show significant difference under the conditions of concentration and temperature used in this model. A circular dichroism experiment indicated that the MA/ $\beta$ -CD composition acts as a sustained release system of the antimonial drug, MA. Since cyclodextrins are poorly digested in the small intestine, the association of MA with  $\beta$ -CD may change the drug absorption site. In addition to the new insights achieved into the mode of action of the MA/ $\beta$ -CD composition, the present work led us to propose also two new formulations for the oral administration of Sb: one which consists in pre-heated MA and is potentially less toxic and of lower cost, when compared to MA/ $\beta$ -CD compositions; the other which consists in a MA/ $\beta$ -CD composition, exhibits a higher solubility in comparison to 1:1 MA/ $\beta$ -CD composition and is potentially less toxic and of lower cost.

## I - REVISÃO DE LITERATURA

### As Leishmanioses

- Conceito, manifestações clínicas e aspectos epidemiológicos

As Leishmanioses são zoonoses causadas por cerca de 20 espécies de um protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, ordem *Kinetoplastida*, família *Tripanosomatidae*. Com uma prevalência de 12 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo e uma incidência de 2 milhões de novos casos por ano, sendo 60.000 só no Brasil (WHO, 2007), atualmente é considerada, após a malária e a dengue, a 3ª doença em importância mundial com transmissão por vetor (REITHINGER & DAVIES, 2002). Uma classificação recente da Organização Mundial de Saúde (OMS) elevou as leishmanioses à categoria I do Programa de Doenças Tropicais, referente a doenças emergentes e fora de controle (REMME et al., 2002).

No homem, caracteriza-se pelas formas cutânea (LC), cutânea difusa (LCD), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) (WHO, 2007).

A LC, forma clínica de maior incidência (1,5 milhões de novos casos/ano), é causada pelas espécies *L. major* e *L.(L.) tropica*, no velho mundo, e pela *L. (Viannia) brasiliensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) guyanensis*, no novo mundo. Clinicamente, caracteriza-se por ulcerações na pele, geralmente de evolução espontânea. Noventa por cento dos casos estão concentrados no **Brasil**, Peru, Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Síria. Contudo, na América Latina, (**Brasil**, Peru e Bolívia), a LC pode vir associada à forma LMC, doença inflamatória degenerativa da mucosa nasofaríngea.

Ainda que de baixa incidência, (1-2%), a gravidade de seu quadro clínico, de difícil tratamento e extensas mutilações faciais, com implicação social importante, acentuam a busca por medidas de controle e/ou tratamento mais eficazes (WHO, 1997).

A LV ou Calazar, como é conhecida na Índia, devido à cor escura da pele dos acometidos (HASHIM et al., 1995), é transmitida por 3 espécies do subgênero *L. donovani* (LAINSON & SHAW, 1987), com uma incidência de 500.000 novos casos/ano (WHO, 2007). Sua ocorrência nos continentes africano, asiático e europeu é associada à infecção pelas espécies *L. (L.) donovani* (LAVERAN & MESNIL, 1903) e *L. (L.) infantum/chagasi* (NICOLLE, 1908), também responsável pela forma cutânea nos países do mediterrâneo, dependendo do balanço entre a resposta imune do hospedeiro e a virulência do parasito (ALVAR et al., 1995). Nas Américas, a espécie *L. (L.) chagasi* é a única responsável pela doença (CUNHA & CHAGAS, 1937). 90% dos casos são relatados em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e **Brasil**, (WHO, 2007), onde foram relatados casos em 19 dos 27 estados brasileiros (MONTEIRO et al., 2002) e um aumento na incidência da doença para uma média de 1.980 novos casos/ano (Brasil/MS/FUNASA, 2002). Inicialmente, a LV caracteriza-se por um quadro de febre, fadiga, dor abdominal, diarreia e perda de peso, seguido de esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenopatia, fruto da hipertrofia e hiperplasia do sistema macrofágico das vísceras. Ocorrem ainda alterações na medula óssea, com consequente leucopenia e anemia, fruto da substituição do tecido hematopoiético pelos monócitos parasitados (HASHIM et al., 1995).

A imunossupressão resultante da infecção reduz a capacidade de resposta a outras doenças infecciosas, tornando o organismo mais susceptível a co-infecções, como o binômio *Leishmania*-HIV. Com a evolução da anemia, segue-se um quadro de hemorragias, gengivais ou digestivas, com possível edema de pele e hiperpigmentação,

perda de apetite e emagrecimento severo que, em alguns casos, evolui para a caquexia e morte e, em outros, para a cronificação da doença.

Em 56% dos acometidos, em África e Ásia, a LV pode evoluir para a forma PKDL (Post Kala azar dermal leishmaniasis), menos letal, mas de alto potencial de transmissibilidade. Nesta manifestação clínica, há um grande número de hospedeiros silenciosos ou com diagnósticos duvidosos. Geralmente confundida com um quadro de sífilis secundária, lepra ou sarcoidose, ou mesmo não apresentando sintomas, pacientes com PKDL, uma vez não tratados, contribuem para a manutenção de ciclos antroponóticos em áreas endêmicas (AKHTAR, s.d.; HASHIM et al., 1995).

Além de uma incidência expressiva, o não tratamento dos pacientes com LV representa 100% de risco de morte e 15% de letalidade dentre os tratados. No Sudão, entre 1991-1993, foi responsável pela morte de mais de 50.000 pessoas e, na Índia, onde tem caráter endêmico, estima-se uma mortalidade entre 50.000-200.000 pessoas/ano, em caso de epidemia (WHO, 2007).

Quanto à distribuição por faixa etária, para a LC em áreas hiperendêmicas, praticamente todos os indivíduos acometidos encontram-se infectados aos 12 anos. Para a LV, os dados são controversos, variando entre uma prevalência para a faixa dos 5 anos (86%) ou para os 15 anos (58%), estando, neste último, crianças abaixo dos 5 anos e adultos como grupo de baixo risco (AKHTAR. s.d.).

Quanto ao sexo, estudos realizados na Colômbia indicaram não haver diferença em sua distribuição entre homens e mulheres (WHO, 1997).

- Ciclo evolutivo: limitações para o controle

As leishmanioses são transmitidas por cerca de 500 espécies de vetores da Ordem *Diptera*, Família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Phlebotomu*, no velho mundo (KILLICK-KENDRICK, 1990), e por uma espécie do gênero *Lutzomia*, nas Américas. Esses insetos se reproduzem em áreas tropicais e sub-tropicais, habitat dos flebotomíneos, geralmente em locais de acúmulo de restos orgânicos em decomposição, ambiente favorável para a manutenção de seu ciclo biológico (ARIAS et al., 1996; WHO, 1997).

A transmissão das leishmanioses pode ser de caráter doméstico, paradoméstico ou silvestre. No vetor, o parasito encontra-se na forma flagelada promastigota, onde, migrando para o trato alimentar, vive extracelularmente, multiplicando-se por divisão binária (WHO, 1997). Uma vez na glândula salivar do inseto, é inoculado em hospedeiros vertebrados, como chacais, raposas, cães e, eventualmente, o homem, pela picada do flebótomo, de hábito crepuscular, realizando a hemofagia quando as temperaturas se encontram acima dos 18°C, na ausência de chuva ou vento (ALVAR et al., 1995).

Na leishmaniose visceral, em um ciclo evolutivo completo, o protozoário, agora na forma amastigota, intracelular e aflagelada, é fagocitado por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente células de Kupfer do fígado, células reticulares e macrófagos do baço, da medula óssea e dos gânglios linfáticos ou ainda, em menor grau, dos rins, supra-renais, intestino, pulmões e pele, multiplicando-se o protozoário no ambiente ácido dos lisossomas secundários (WHO, 1997).

Tendo em vista a maior importância epidemiológica da leishmaniose visceral canina que a humana, por sua maior prevalência e intenso parasitismo no tecido cutâneo dos

cães (ABRANCHES, et al., 1991; DEANE & DEANE, 1955), a OMS preconiza o sacrifício de cães infectados como a principal medida de controle (ALVAR et al., 1995), associada ao combate ao vetor, através do uso de inseticidas (Brasil/MS/FUNASA, 2002; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; TESH, 1995) e à adoção de medidas adicionais, como controle de lixo orgânico (ALVAR et al., 1995) e uso de coleiras caninas impregnadas com inseticidas (DAVID et al., 2001), a fim de diminuir a proliferação e infectividade dos vetores.

Contudo, face ao atual questionamento sobre o real papel do cão na manutenção do ciclo, bem como a possibilidade de que outros animais selvagens ou novos reservatórios já identificados o mantenha, tem sido cada vez mais frequente o uso de quimioterápicos no tratamento de cães (MORILLAS, et al., 1985). O uso de derivados de antimônio pentavalente e alopurinol, sem uma posologia padronizada e com insucesso frequente (GRAMICCIA, et al., 1990), e a não correspondência entre a cura clínica e parasitológica (ALVAR et al., 1995), com retorno da infecção e da capacidade infectante de vetores (GRADONI, et al., 1987), tornam, contudo, o tratamento uma medida controversa.

Sabe-se que os ciclos zoonóticos das leishmanioses são bastante reprodutíveis de acordo com a área geográfica, havendo uma estreita relação entre a espécie do flebotomíneo, do protozoário e do reservatório animal (ALVAR et al., 1995). Contudo, desde 1993, em função do desmatamento e urbanização, tem ocorrido a ocupação de pessoas não imunizadas nestas áreas, resultando em um aumento de áreas endêmicas (WHO, 2000), onde a doença ganha um caráter zoonótico (transmissão animal-homem) ou antroponótico (transmissão homem-homem).

Tal alteração ocorre em função de um comportamento típico das zoonoses, conhecido como sinantropismo, onde o parasito tem habilidade de se adaptar às novas condições

ambientais estabelecidas. Como resultado, multiplicam-se vetores e reservatórios, até então desconhecidos como tal, numa adaptação gradual da leishmaniose rumo à urbanização.

A principal consequência da introdução do homem neste ciclo originalmente zoonótico tem sido o entrelaçamento geográfico de zonas de infecção, como é o caso da co-infecção *Leishmania*/HIV, não restrita a áreas endêmicas. Pacientes portadores do vírus HIV apresentam uma imunossupressão favorável ao desenvolvimento das leishmanioses, por deficiência acumulada da resposta imune. Como resultado desse cruzamento, tem ocorrido uma mudança no perfil epidemiológico desta zoonose na Europa mediterrânea, África e Américas, onde o **Brasil** é o principal representante (WHO, 2000), aumentando o risco de pacientes HIV positivos, portadores de um número elevado de *Leishmania*, tornarem-se reservatórios da doença, em casos de transmissão antroponótica.

- A quimioterapia das leishmanioses: desafios e perspectivas

Diante das limitações descritas, a OMS preconiza como principal medida de controle para todas as formas da doença, especialmente para a forma mais letal, a LV, o uso de quimioterápicos, sendo os derivados de antimônio (Sb) os medicamentos de primeira escolha, há mais de cinco décadas (MARSDEN, 1985; BERMAN, 1988).

O antimônio é classificado como um semi-metal, encontrado na natureza como os isótopos  $^{121}\text{Sb}$  (57,25%) e  $^{123}\text{Sb}$  (42,75%). Seus estados de oxidação mais comuns são a forma trivalente (Sb(III)) e pentavalente (Sb(V)). Esta última, considerando-se o antimonato na forma hidratada, foi posteriormente modificada para  $\text{Sb}(\text{OH})_6^-$  (YAN et al., 2005).

Nos dois estados, há formação de complexos com ácidos orgânicos, como o ácido tartárico e glucônico carboidratos, resultando em compostos de ação terapêutica.

A química de coordenação do Sb tem sido extensivamente estudada (YAN et al., 2005).

O Sb(III) coordena com 15 elementos, bem como a vários ligantes contendo oxigênio, como no caso do agente anti-parasitário tartarato de Sb(III), ou com enxofre, no caso dos tióis.

O Sb(V) também forma vários complexos pentacoordenados como o pentacloreto de antimônio ( $\text{SbCl}_5$ ) ou hexacoordenados, de fórmula  $[\text{SbX}_6]^-$ .

O complexo de Sb(III) com o ácido tartárico, conhecido como Tartar emético, vem sendo usado no tratamento de doenças parasitárias, incluindo as leishmanioses, desde 1910 (MaCALLUM, 1999). O primeiro relato mundial do uso de antimoniais no tratamento das leishmanioses foi através do médico brasileiro Gaspar Vianna (VIANNA, 1913). Contudo, ao longo do tempo, face a sua toxidez, outros derivados de antimônio foram sendo testados. Atualmente, esses foram substituídos por complexos hidrossolúveis de Sb(V). Contendo carboidratos em sua composição, responsáveis pelo aumento da solubilidade do Sb e por sua entrega ao interior dos macrófagos, onde a *Leishmania* se multiplica, os antimoniais pentavalentes apresentam-se menos tóxicos e mais eficazes. Em países de língua inglesa, é utilizado o estibogluconato de sódio (Pentostan®, Glaxo Wellcome, Reino Unido) e, em países de língua latina, como o Brasil, o antimoniato de meglumina (Glucantime®, Aventis, França).

Entretanto, ambos apresentam limitações quanto ao uso, com destaque para: 1) os casos de resistência crescente na Índia, o que obrigou a um aumento na dosagem aplicada, antes de 20 mg/Kg/dia, para 40 mg/Kg/dia, no tratamento do Kala azar e da forma PKDL em áreas endêmicas. Tal conduta elevou o risco de efeitos colaterais, tais como náuseas, vômitos, diarreia, atralgias, mialgias, anorexia, anomalias eletrocardiográficas

e convulsões (MARSDEN, 1985; RODRIGUES et al., 1999); 2) o alto custo do tratamento, tendo em vista também serem os antimoniais medicamentos importados; 3) a necessidade de um longo tratamento (pelo menos 20 dias), com doses diárias, devido a sua alta *clearance* renal; 4) os antimoniais, inativos por via oral, devem ser administrados parenteralmente, o que muitas vezes requer a internação do paciente. Tal fator, acompanhado do frequente relato de dor local e desconforto associados às aplicações geralmente dificultam a adesão do paciente, com conseqüente abandono do tratamento, principalmente nas áreas rurais.

Além de sua atividade leishmanicida e anti-HIV (ROZENBAUM et al., 1985), recentemente foi relatada a atividade anti-tumoral dos antimoniais (DUFFIN & CAMPLING, 2002), bem como anti-viral, para hepatite C (YAN et al., 2005).

Apesar de uso de antimoniais pentavalentes há mais de 50 anos, no tratamento das leishmanioses (BERMAN, 1988), seus mecanismos de toxicidade e de ação ainda são pouco conhecidos (BERMAN, 1988; FREZARD et al., 2001; DEMICHELI et al., 2003).

Um estudo pioneiro demonstrou que a baixa toxicidade da forma pentavalente do Sb em relação a sua forma trivalente seria, em parte, atribuída às altas taxas de excreção renal do Sb(V) quando comparado ao Sb(III) (GOODWIN & PAGE, 1943). Neste mesmo estudo, foi sugerido, à semelhança do que já havia sido demonstrado para o Arsênio, elemento com a mesma propriedade química que o Sb, um mecanismo de ação em que ocorreria uma redução do Sb(V) a Sb(III), sendo essa a forma ativa (e mais tóxica) do antimônio, o qual, no estado pentavalente, atuaria como pró-droga. Anos mais tarde, foi confirmada tal redução em humanos, a partir da fração significativa de Sb(III) encontrada em amostras de sangue e urina de pacientes tratados com antimoniais pentavalentes (PETIT DE PENA et al., 1990; BURGUERA et al., 1993).

Estudos recentes sugerem que a redução do Sb(V) a Sb(III) poderia ser promovida pela glutathiona (GSH), tiol mais abundante presente no citosol das células de mamíferos (DELNOMDEDIEU et al., 1994; FRÉZARD et al., 2001) ou ainda pelos tióis Cysteina (Cys), principal tiol encontrado no compartimento ácido de lisossomas secundários, onde se encontra o parasito, e Tripanotiona (T(SH)<sub>2</sub>), tiol presente na *Leishmania* (FERREIRA et al., 2003). A participação do parasito no metabolismo dos antimoniais foi sugerida a partir dos maiores níveis de Sb(III) encontrados em hamsters experimentalmente infectados, quando comparados àqueles tratados sem infecção (LUGO et al., 1994). Paralelamente ao mecanismo de ação proposto, outro estudo sugeriu uma possível ação do antimônio pentavalente na forma de um complexo com nucleosídeos, resultando em posterior inibição da ação da topoisomerase do tipo II (LUCUMI et al., 1998; DEMICHELI et al., 2002).

Uma segunda linha de medicamento para tratamento desta zoonose é a anfotericina B, de ação, à princípio, antifúngica, e cujo mecanismo de ação consiste em sua ligação de maneira irreversível ao ergosterol da membrana do fungo/ou parasito, com conseqüente alteração da permeabilidade da membrana e lise, com morte do parasito (STECK, 1974). Apesar de uma potência 400 vezes maior em relação aos antimoniais e uma porcentagem de cura de 100% (WHO, 2000), esse fármaco apresenta toxicidade elevada, com efeitos colaterais importantes como flebite, convulsões, trombocitopenia, nefrotoxicidade e reação anafilática em um terço dos pacientes tratados (SCOTT et al., 1992; BERMAN, 1997) além de um alto custo, em parte, fruto de sua administração por infusão endovenosa, requerendo internação e monitoramento.

Também as diaminas aromáticas isotionato de pentamidina e dimetano-sulfonato de pentamidina, cujo principal representante é a pentamidina®, figuram como medicamento de segunda escolha, não só por sua toxicidade de até 60%, o que inclui

hepatotoxicidade irreversível e pancreatite aguda, mas pelo aumento do número de casos de resistência para a LV no Kênia, Índia e China (DIETZE et al., 1995; TAKUR et al., 1995), o que tem resultado em um aumento na dosagem aplicada, resultando em aumento da toxicidade.

Face a essas limitações, a OMS recomenda a pesquisa de novas drogas e/ou formulações, bem como o desenvolvimento de vacinas (WHO, 1993). Nesse sentido, ensaios clínicos foram desenvolvidos, nos últimos anos, envolvendo a anfotericina B incorporada em lipossomas (AmBisome®), vesículas carreadoras de fármacos, capazes de incorporar princípios ativos hidrossolúveis em seu compartimento aquoso interno ou princípios ativos lipofílicos ou anfílicos em sua membrana lipídica. Essas vesículas, rapidamente fagocitadas por células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), parasitados pela *Leishmania*, permitem que uma quantidade maior da droga aplicada alcance o parasito (ALVIN et al., 1986; HASHIM, 1995), potencializando seus efeitos, com redução no número e quantidade da dose aplicada, e conseqüente redução no custo do tratamento (FRÉZARD et al., 2000). O resultado dessas pesquisas foi uma eficácia de 100% de cura nos pacientes acometidos com LV, resultando na aprovação da AmBisome® pela FDA como primeira apresentação a base de lipossomas reconhecida para o tratamento da leishmaniose visceral (MEYERHOFF, 1999). Já estudos pré-clínicos com o antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas revelaram uma eficácia 200 vezes maior para essa formulação, em relação ao mesmo medicamento na forma livre (ALVIN, 1986).

Por via tópica, a aminosidina (Paromomicin®) tem sido outro fármaco recente, cuja a taxa de cura de 75-83% para a LC de ciclo zoonótico coloca-o, de acordo com a OMS, como fármaco de primeira escolha no tratamento da LC, em substituição aos

antimoniais, com redução de custo e de riscos de efeitos colaterais comuns àquele fármaco.

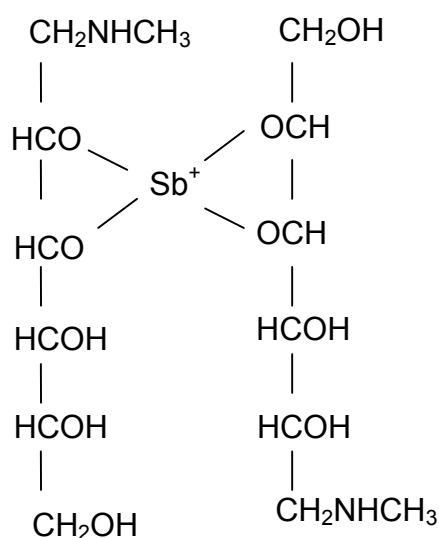
Todavia, nos últimos anos, o interesse crescente pela administração por via oral de drogas citotóxicas vem aumentando, em função dos benefícios ao paciente e vantagens econômicas que esta via representa. Considerada a mais conveniente via de administração, uma vez que elimina a necessidade de internação do paciente, com diminuição do risco de infecção, frequente na administração parenteral, a indústria farmacêutica vêm intensificando suas pesquisas pela obtenção de fármacos leishmanicidas administrados oralmente. Com resultados promissores, a miltefosina, droga de caráter lipofílico desenvolvida inicialmente para o tratamento do câncer, atualmente, por sua ação comprovada contra *Leishmania donovani*, já se encontra em fase IV de testes clínicos na Índia como a primeira terapia oral desenvolvida contra a LV (WHO, 2007). Seus efeitos colaterais importantes, entretanto, o que inclui náuseas, vômitos e diarreias em até 60% dos pacientes tratados (JHA et al., 1999), ou ainda relatos de efeitos teratogênicos, revelam a importância de novas pesquisas envolvendo drogas leishmanicidas para administração oral.

### **Antimoniais pentavalentes: estrutura e mecanismo de transporte transmembrana**

Apesar do seu uso clínico por mais de meio século, as estruturas moleculares do antimoniato de meglumina (AM) e do estibogluconato de sódio não foram completamente elucidadas.

O AM, um composto obtido a partir da reação entre o hidróxido de antimônio pentavalente e o ligante N-metil-glucamina (NMG), é um sólido amorfo que, quando aquecido, sofre degradação térmica, o que limitou, até hoje, a sua caracterização

estrutural. Estudos recentes com espectrometria de massa (MS) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) têm contribuído na caracterização molecular desse composto. Resultados obtidos por espectrometria de massa (bombardeamento atômico rápido) (FAB) e ionização por eletrodispersão (ESI), no modo positivo, indicaram a existência de uma mistura de estruturas poliméricas no composto, de fórmulas gerais  $(\text{NMG-Sb})_n\text{-NMG}$  e  $(\text{NMG-Sb})_n$ , revelando a existência de complexos Sb-NMG de diferentes estequiometrias (1:1, 1:2, 2:2, 2:3 e 3:4), correspondentes aos íons de  $m/z$  314, 507, 627, 820 e 1132, respectivamente (ROBERTS et al., 1998). O pico principal foi aquele da espécie de peso molecular 507. A estrutura proposta para esta espécie é mostrada na **FIGURA 1**.



**FIGURA 1** Estrutura proposta para a espécie de  $m/z$  507 no AM (ROBERTS et al., 1998)

Esta estrutura, entretanto, não está de acordo com os resultados da titulação potenciométrica do AM que indicaram a existência de dois prótons dissociáveis atribuídos ao grupo amino do ligante NMG ( $pK_a$  10,3), e ao antimoniato ( $pK_a$  2,1), e sugerem a existência de espécies zwitterônicas no composto (DEMICHELI et al., 1999). Medidas de condutividade do AM em água mostraram que o AM se comporta como um

eletrólito fraco, o que está de acordo com a existência de espécies zwitteriônicas (DEMICHELI et al., 1999). Além disso, a hipótese atualmente aceita de que o complexo Sb:NMG 1:2 seria a espécie predominante não está de acordo com a razão molar NMG/Sb na faixa 1-1,4 encontrada no AM (ROBERTS et al., 1998; DEMICHELI et al., 2003). Um estudo do AM por RMN de próton revelou a existência de dois ambientes distintos para o NMG, indicativo de que moléculas de NMG coordenam com o Sb de duas maneiras distintas (DEMICHELI et al., 2003). Tais dados sugerem ainda a co-existência seja de dois complexos diferentes ou mesmo de um complexo de geometria assimétrica predominante, envolvendo duas moléculas de NMG (DEMICHELI et al., 2003).

Outro aspecto ainda pouco conhecido sobre os antimoniais pentavalentes é o seu mecanismo de permeação pelas membranas biológicas. Para o Sb(III), estudos revelaram a participação das aquagliceroporinas em seu transporte passivo através da membrana, estando seu transporte ativo a cargo das proteínas associadas à multirresistência às drogas (MDR) (BORST & OUELLETTE, 1995; VERNHET et al., 1999; LIU et al., 2004). Tais mecanismos, contudo, não puderam ser relacionados ao Sb(V) (BROCHU et al., 2003; YAN et al., 2005; DZAMITIKA et al., 2006), cujo transporte transmembrana poderia estar associado a um processo de endocitose ou de difusão simples deste antimonial pela bicamada lipídica.

Como o principal objetivo da presente tese é a elucidação do modo de ação de uma formulação oral do AM; para atingir esse objetivo, faz-se necessário esclarecer tanto a estrutura do AM, quanto o seu mecanismo de permeação.

## **Absorção oral de medicamentos e influência das ciclodextrinas**

Apesar da administração por via oral ser a forma mais desejada de administração, alguns inconvenientes devem ser observados, quando da escolha por essa via e do fármaco/ou formulação a ser desenvolvida. Primeiramente, deve-se ter em mente toda a fisiologia do trato gastrointestinal, estruturada para servir como barreira à absorção de substâncias potencialmente tóxicas, como fármacos, determinante para a sua biodisponibilidade na circulação sistêmica. Inicialmente, ao atingir o estômago, o fármaco está sujeito às ações do suco gástrico e de enzimas locais e, por esta razão, devem ser estáveis sob tais condições. Ainda que a absorção no estômago seja insignificante, o tempo de permanência na cavidade gástrica influencia na absorção intestinal. Se, por um lado, a presença de alimentos no estômago pode favorecer sua dissolução e conseqüente absorção pelo intestino, por outro, pode favorecer a interação com o fármaco, alterando suas propriedades, com conseqüente redução de sua biodisponibilidade.

Assim, um fármaco, para ser ativo por via oral, capaz de atravessar membranas biológicas, deve ter suas propriedades físico-químicas controladas, como  $pK_a$ , solubilidade e dissolução nos fluidos gastro-intestinais.

Após sua passagem pelo estômago, inicia-se a fase de absorção propriamente dita, com a chegada do fármaco ao intestino delgado, maior local de absorção para a circulação sistêmica, em virtude da grande superfície conferida pelas microvilosidades de sua mucosa. Estas são constituídas por uma monocamada de epitélio contínuo, formado por células (enterócitos) e uma subjacente lâmina própria, ricamente vascularizada, por onde o fármaco atinge a circulação. A passagem pelos enterócitos se dá por rota *para* ou *transcelular*, sendo nesta a difusão passiva, a endocitose e o transporte mediado por

carreadores (proteínas específicas) as principais vias de transporte. Destas, a difusão passiva pela bicamada lipídica é a mais comum e depende da lipofilicidade do fármaco, do seu peso molecular e de sua fração não ionizada (HELLEEN et al., 2000). Quanto ao transporte mediado por carreadores, têm-se os transportadores de cátions e de ânions orgânicos e os transportadores de peptídeos, cujo o mais bem caracterizado é o PEPT1, responsável pela absorção oral de drogas em geral pouco absorvidas (KATSURA & INUI, 2003).

Além de uma barreira passiva à entrada de substâncias potencialmente tóxicas, o epitélio intestinal ainda conta com mecanismos adicionais que limitam a absorção. Isso inclui a extrusão de compostos capturados pelo epitélio por transportadores da família ABC (ATP-binding cassette proteins), dos quais fazem parte as P-glicoproteínas (também presentes em órgãos excretórios, como fígado e rins e em tecidos em que atua como barreira, como células endoteliais do cérebro e placenta), e as proteínas associadas à resistência múltipla a drogas (MRP) e um mecanismo de quebra metabólica para inativação do soluto pelas enzimas citocromo P450 (CYP). Destas, a CYP 3A, predominante tanto no intestino como no fígado (órgão também importante no metabolismo de primeira passagem, logo, na biodisponibilidade por via oral de fármacos) tem sido responsabilizada pelas diferenças entre pacientes na concentração plasmática de fármacos após administração oral, uma vez que há grande variabilidade interindividual na expressão dessa enzima em ambos os órgãos.

Assim, a barreira intestinal, principalmente através das P-glicoproteínas e enzimas citocromo P450, assim como as propriedades físico-químicas dos medicamentos, constituem-se como fatores mais importantes na regulação da absorção e da biodisponibilidade oral de fármacos.

Uma vez na circulação sistêmica, tem-se a fase de distribuição, onde a ligação a proteínas e eliminação de primeira passagem completam a série de fatores que influenciam a biodisponibilidade de um fármaco administrado pela via oral.

Além dos aspectos fisiológicos, sabe-se que drogas citotóxicas apresentam uma estreita janela terapêutica, o que torna necessário o uso da maior dose tolerada do fármaco, um inconveniente em se tratando de administração oral. Além disso, o risco de inadequada absorção e/ou de um rápido metabolismo de primeira passagem, implica maior variabilidade nos níveis plasmáticos dos fármacos administrados oralmente, resultando em dosagens tóxicas ou subterapêuticas. Para além dessas limitações, está o risco de irritação local do trato gastrointestinal, envolvendo efeitos adversos como náuseas, vômitos ou lesões ulcerativas, ou mesmo a impossibilidade do uso desta via por complicações já instaladas nesse sistema, como as desordens entero-obstrutivas. Assim, a escolha pela via oral para fármacos já consagrados deve vir acompanhada de estratégias que favoreçam seu uso, aumentando a absorção intestinal e reduzindo a inativação metabólica desses fármacos (HELLEEN et al, 2000).

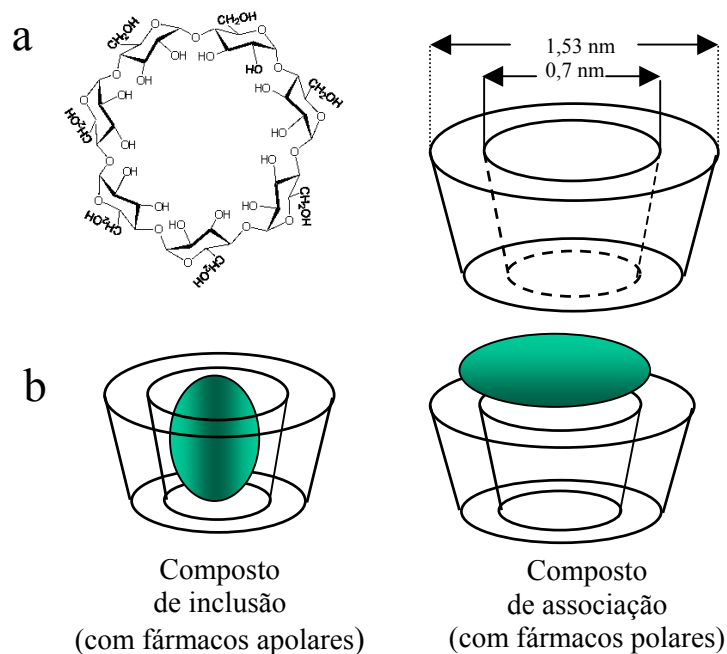
Neste sentido, as ciclodextrinas (CDs), utilizadas como sistemas carreadores de fármacos, podem modular a solubilidade, estabilidade e/ou biodisponibilidade de fármacos, melhorando, em última análise, sua eficácia e reduzindo a toxicidade. Por tais propriedades, as CDs compõem um dos mais bem sucedidos sistemas carreador de fármacos, principalmente para administração por via oral.

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, obtidos da degradação do amido, tendo as ciclodextrinas gluconotransferases (CGTases) como as enzimas responsáveis por sua síntese. São constituídas de seis, sete ou oito unidades de glicose (D-glicopirranose), denominadas de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas, respectivamente (SZEJTLI, 1997; SZEJTLI, 1998; LOFTSSON & MASSON, 2001). Dessas, a  $\beta$ -CD tem sido a mais usada, devido

ao seu menor custo em relação às demais, uma vez que as CGTases são produtoras preferenciais dessa CD.

Tendo como estrutura o formato de um cone truncado, em que substâncias polares podem se associar a sua superfície externa hidrofílica ou, no caso de substâncias apolares, serem incluídas em sua cavidade interna apolar, as CDs têm a capacidade de inclusão e/ou associação a vários tipos de fármacos. Isso se dá em função de sua flexibilidade considerável, apesar das ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas presentes em sua face externa. Essas hidroxilas, ligadas ao C2, C3 e C6 de cada glicose da  $\beta$ -CD, permitem a solvatação por moléculas de água, bem como a introdução de substituintes, sem alteração da sua cavidade interna.

A **FIGURA 2** mostra a estrutura e as dimensões da  $\beta$ -CD e ilustra os modos de associação de fármacos polares e apolares.



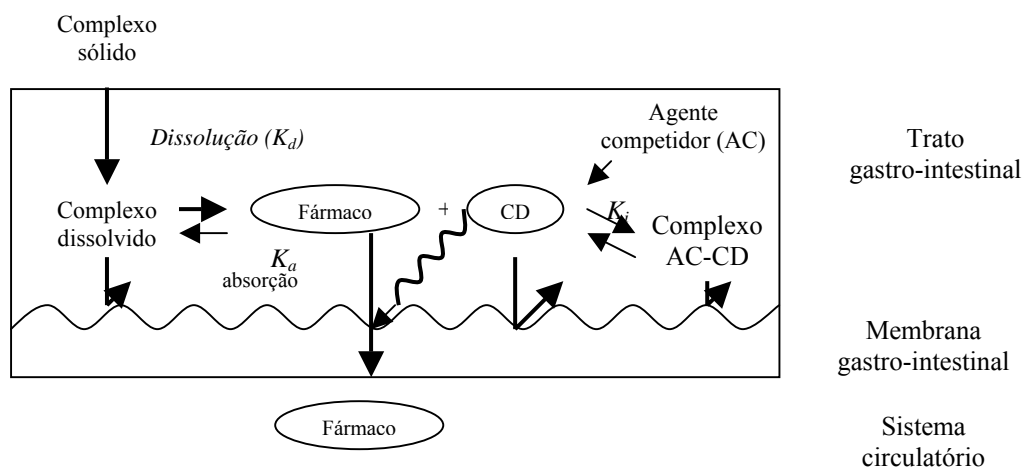
**FIGURA 2** Estrutura da  $\beta$ -CD (a) e modelos para a formação de compostos de inclusão e associação (b)

Por tais propriedades, as CDs permitem modular a solubilidade de substâncias convidadas, em fase aquosa, aumentando-a para moléculas apolares e diminuindo-a para moléculas polares. Relatos na literatura têm mostrado um aumento da biodisponibilidade de fármacos por via nasal, rectal e oral, pela inclusão desses na cavidade apolar das CDs (SZEJTLI, 1998; LOFTSSON & MASSON, 2001).

Mais especificamente, no caso de administração oral, em que os níveis plasmáticos de uma droga são dados em função da *velocidade* e do *tempo* de liberação do fármaco, as CDs têm sido usadas de forma cada vez mais promissora. Através de seu uso, é possível controlar a velocidade (liberação imediata ou prolongada), ou o tempo (liberação pH dependente ou sítio-específica) em que a droga é liberada.

CDs hidrofílicas, como a  $\alpha$ -,  $\beta$ - ou  $\gamma$ -CDs, são utilizadas nos casos em que se deseja a liberação imediata de drogas pouco hidrossolúveis, através da formação de complexos de inclusão, onde a etapa limitante é a dissolução e não a absorção do fármaco (HIRAI et al., 1988). Destas, a  $\beta$ -CD é a mais utilizada por razões envolvendo custo, disponibilidade, aprovação junto às autoridades sanitárias e dimensão de sua cavidade. Entretanto, essa CD apresenta uma baixa solubilidade em água, em virtude da formação de ligação de hidrogênio intramolecular entre as hidroxilas do C-2 e do C-3, o que pode ser contornado com o preparo de derivados, como as CDs hidroxialquiladas, incluindo a 2'-hidroxipropil- $\beta$ -CD. Como ilustrado na **FIGURA 3**, uma vez que somente a fração livre do fármaco, em equilíbrio com a forma complexada em solução, é capaz de ser absorvida pelas barreiras lipofílicas, o nível máximo de absorção será atingido quando a concentração de CDs for suficiente para solubilizar todo o fármaco em solução. Se a concentração de CD aumentar, contudo, a fração da droga livre diminuirá, com conseqüente redução de sua biodisponibilidade. Seguindo o mesmo princípio, a presença de substâncias endógenas ou exógenas nos sítios de absorção, ou mesmo a

remoção de componentes da membrana pelas CDs, é responsável pelo aumento da fração de droga livre e, por conseguinte, da aceleração de sua absorção. O esquema abaixo (**FIGURA 3**) representa o processo de absorção oral.



**FIGURA 3** Processo de absorção de fármacos em complexos de inclusão, após dissolução e dissociação no trato gastrointestinal.  $K_d$ , constante de dissolução do complexo fármaco-CD;  $K_c$ , constante de estabilidade do complexo fármaco-CD;  $K_i$ , constante de estabilidade do complexo agente competidor-CD;  $K_a$ , constante de absorção do fármaco

Observa-se que os complexos com CDs estão em equilíbrio com as formas livres em solução aquosa, estando o grau de dissociação dependente da magnitude da constante de estabilidade do complexo.

CDs hidrofóbicas, como as CDs alquiladas (HIRAYAMA & UEKANA, 1999), por sua vez, são úteis à liberação prolongada, sendo empregadas para drogas hidrossolúveis, em que se deseja um nível sanguíneo constante por longo período de tempo, reduzindo a frequência das doses, prolongando a sua eficácia e evitando a toxicidade associada a administração em múltiplas doses.

No que tange à liberação tempo-controlada, têm-se as chamadas preparações entéricas, onde o fármaco, contendo excipientes com grupos ácidos, menos solúveis em pH ácido, mas solúveis em meio neutro ou alcalino, são liberados preferencialmente no trato intestinal. Em outro caso, a formação de conjugados CD-fármaco por ligação covalente, diferentemente dos habituais complexos de inclusão, rapidamente dissociados no fluido gastrointestinal, dependendo de sua constante de estabilidade e de competidores pela cavidade das CDs, resulta em uma liberação sítio-específica. Agora, capazes de sobreviverem à prolongada passagem pelo estômago e intestino delgado, sofrem dissociação apenas ao atingirem o cólon, onde só então são degradados por enzimas entéricas (FRIEND, 1992; HOUGARD et al., 1996).

Na avaliação das CDs para uso como carreadores em formulações farmacêuticas, a segurança é o primeiro quesito a ser considerado, avaliação feita a partir da determinação da *estabilidade* em vários fluidos biológicos e tecidos e *perfil farmacocinético e toxicológico*.

Na administração oral, as CDs, atuando como carreadores de fármacos, provavelmente os disponibilizam para o meio aquoso de onde serão absorvidos, permanecendo intactas no trato gastrointestinal (IRIE & UEKAMA, 1997). Para as  $\beta$ -CDs, estudos em ratos revelaram que apenas uma fração insignificante desta CD intacta foi absorvida (GERLÓCZY et al., 1985; OLIVIER et al., 1991). Entretanto, para um complexo CD/fármaco, usando-se uma técnica de perfusão, os dados revelaram a presença tanto do fármaco como da  $\beta$ -CD na circulação sanguínea (KOIZUMI et al., 1985; NAKANASHI et al., 1989). Como for, a baixa absorção gastrointestinal das CDs na forma intacta tem sido atribuída a seu volume e hidroflicidade.

Quanto ao efeito da bile na absorção intestinal, em estudos por técnica de perfusão, foi observado que apenas uma pequena quantidade de  $\beta$  e  $\gamma$ -CD foi absorvida pelo trato

gastrointestinal, o mesmo, contudo, não sendo observado para a  $\alpha$ -CD, que apresentou uma taxa na circulação sistêmica bastante expressiva (IRIE et al., 1988). Assim, a possibilidade das CDs serem absorvidas pelo intestino é uma hipótese que não deve ser descartada.

O destino das CDs no trato gastrointestinal depende de sua resistência à hidrólise ou à degradação enzimática. As  $\alpha$  e  $\beta$ -CDs são resistentes às amilases da saliva e pâncreas e extensivamente hidrolisadas no cólon, onde o trânsito de cerca de 40 hs favorece a atuação de enzimas bacterianas no processo de hidrólise. Já a  $\gamma$ -CD é lentamente digerida no intestino delgado. Os primeiros metabólitos obtidos são maltodextrinas acíclicas, em seguida metabolizadas, absorvidas e finalmente excretadas como  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (SZEJTLI, 1998).

No caso da administração oral, todos os estudos toxicológicos revelaram serem as CDs não tóxicas, fruto da baixa absorção destas pelo trato gastrointestinal. A dose letal (DL50) para a  $\beta$ -CD é de >12,5, 18,8 e 5 g/Kg para camundongos, ratos e cães, respectivamente (SZEJTLI, 1988). Em um estudo de 52 semanas, a  $\beta$ -CD foi considerada não tóxica para doses diárias de até 0,6 g/Kg em ratos e 1,8 g/Kg em cães (BELLRINGER et al., 1995).

### **Estudo de compostos de associação antimoniais-ciclodextrina**

Uma das principais limitações no uso de antimoniais pentavalentes no tratamento das leishmanioses é a necessidade de administração parenteral. Em virtude do alto *clearance* renal desses fármacos, faz-se necessário um regime de múltiplas injeções, com maior toxicidade local e sistêmica, bem como custo e risco de infecção, como já previamente descrito.

Como consequência, esforços vêm sendo feitos para a implementação de uma terapia por via oral no tratamento das leishmanioses (DIETZE et al., 1985; KAYSER et al., 2003; ROSSI-BERGMANN, 1999; DEMICHELI et al., 2004). Uma estratégia promissora tem sido o uso de sistemas envolvendo carreadores de fármacos, onde as CDs figuram como potencial candidata à melhora na absorção oral do Sb. Recentemente, um processo foi proposto para a preparação de uma composição do AM com a  $\beta$ -CD, em que o AM foi adicionado a uma solução de  $\beta$ -CD em água, sob aquecimento, seguido de liofilização da solução resultante. Medidas dos tempos de relaxação dos prótons por RMN revelaram a existência de interações entre o AM e a  $\beta$ -CD (DEMICHELI et al., 2004). No mesmo estudo, a composição AM/ $\beta$ -CD administrada oralmente em camundongos SWISS, quando comparada à mesma dose administrada de AM (100 mg Sb/Kg), apresentou níveis plasmáticos 3 vezes maiores na absorção oral do Sb em relação ao AM livre. Vale ressaltar que as fases de eliminação plasmática de Sb após administração por via oral das preparações de AM e de AM/ $\beta$ -CD mostraram as mesmas constantes de velocidade de eliminação, indicando que a  $\beta$ -CD altera apenas o nível de absorção de Sb. Também foi avaliada a eficácia da composição AM/ $\beta$ -CD em modelo de leishmaniose cutânea, pela administração, por via oral, dessa composição em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *Leishmania amazonensis*. O grupo tratado com AM/ $\beta$ -CD (32 mg Sb/Kg/dia, por 12 dias) apresentou redução significativa das lesões em relação aos grupos tratados com o AM (120 mg Sb/Kg/dia, por 12 dias) e o grupo controle, tratado com solução salina. A eficácia da composição AM/ $\beta$ -CD foi equivalente à observada para o AM administrado por via intraperitoneal em doses duas vezes maior, sendo a atividade leishmanicida da composição confirmada pela redução significativa do número de parasitos nos animais tratados, em comparação aos demais grupos, com nenhum sinal de toxicidade aguda

observado. Esses resultados mostraram, pela primeira vez, ser o AM, mediante à modulação de sua forma de apresentação, um fármaco ativo por via oral (Demicheli et al., 2004). Uma vez que o AM é uma droga hidrossolúvel (solubilidade > 300 g/L), espera-se que esse composto de associação com a  $\beta$ -CD difira, do ponto de vista físico-químico, dos compostos de inclusão convencionais, geralmente envolvendo fármacos pouco hidrossolúveis, inclusos por ligações não covalentes na cavidade hidrofóbica da CD (SZEJTLI, 1998). Contudo, o tipo de interação entre o AM e a  $\beta$ -CD nesse composto, não convencional, bem como os mecanismos envolvidos no aumento da concentração plasmática de Sb ainda não foram elucidados.

São, portanto, objetivos da presente tese a caracterização molecular da composição AM/ $\beta$ -CD e a elucidação do seu modo de atuação. Com esses conhecimentos, espera-se avanços significativos na área de Nanobiotecnologia, no que diz respeito à identificação de novos modos de atuação e de novas aplicações da CD. Novas estratégias serão ainda propostas, a partir das informações obtidas, para o planejamento de novas formulações orais do AM.

## II - OBJETIVOS

A presente tese teve como objetivo geral a elucidação dos mecanismos responsáveis pelo aumento da concentração plasmática de Sb nas composições de antimoniato de meglumina com a  $\beta$ -ciclodextrina.

A tese teve os seguintes objetivos específicos identificar:

- alterações estruturais no AM induzidas pela formação da composição AM/  $\beta$  - CD 1:1 (impacto das etapas de **aquecimento** e de **liofilização**)
  
- a espécie liberada pela composição AM/  $\beta$  -CD
  
- espécies moleculares preferencialmente absorvidas

2 - Preparar e caracterizar uma composição AM/ $\beta$ -CD de relação molar superior a 1:1

3 - Desenvolver um modelo lipídico de membrana para o estudo de permeação dos antimoniais pentavalentes através de bicamada lipídica e aplicar o modelo ao estudo de permeação de Sb a partir da composição AM/ $\beta$ -CD.

### III - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. *Aparelhagem utilizada na caracterização dos compostos*

##### *Análise Elementar*

As porcentagens de C, H e N foram determinadas em um analisador Perkin Elmer, modelo PE 2400, no Departamento de Química da UFMG.

##### *Análise Térmica*

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas em um equipamento Shimadzu TGA-50, no Departamento de Química da UFMG. A quantidade de massa empregada foi de 2,0-5,0 mg, sendo utilizadas células de alumina para análise. Efetuou-se atmosfera dinâmica de nitrogênio e foi empregada uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

##### *Espectrometria de absorção na região do infravermelho (I.V.)*

Os espectros de infravermelho (I.V.) foram obtidos em equipamento Mattson FTIR 3000, do Departamento de Química da UFMG, na região de 4000-400cm<sup>-1</sup>, usando pastilhas de KBr.

##### *Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

Os espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C foram obtidos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear, Bruker DRX-400 Avance (400MHz), no LAREMAR da UFMG.

### *Liofilização*

As liofilizações foram realizadas em um liofilizador Labconco, Freezone 4.5 L (Kansas City - MO, USA).

### *Centrifugação*

As centrifugações foram realizadas em centrífuga Jouan, modelo B4i (França).

### *Osmometria*

As medidas de osmolaridade foram realizadas em microOsmômetro  $\mu$ Osmomette™, modelo 5004 Automatic Osmometer, Precision System INC™ (NatiK, MA) ou em Osmômetro de Pressão de Vapor, modelo Vapro5520 - Wescor®, Logan (Utah, USA).

### *Ultrasonicação*

A ultrasonicação foi realizada em um ultrassonicador 3mm - Probe sonicator, ultrasonic liquid processor, Misonix Inc (Farmingdale, NY, USA).

### *Evaporação do solvente orgânico*

A remoção do solvente orgânico utilizado no preparo da suspensão de lipossomas foi realizada em um evaporador rotatório Labconco Corporation (Kansas City, Missouri, USA).

### *Extrusão da suspensão de lipossomas*

A extrusão da suspensão de lipossomas foi realizada em um extrusor Lipex Biomembranes (Canadá).

### *Espectrometria de Massa de ionização por eletrodispersão (ESI-EM)*

As espectrometrias de massa foram realizadas em um aparelho Q-ToF Micro™ (Micromass, UK), equipado com uma fonte de ionização por eletrodispersão, realizada no modo positivo ou negativo, no Departamento de Bioquímica -Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. A voltagem capilar foi de 3-3.5 kV e a voltagem na amostra de 30-60 V. A calibração do aparelho foi feita usando iodeto de sódio e iodeto de cério na faixa de 100 a 2000 m/z. Para as análises por ESI(+)-MS, as amostras foram preparadas em água desionizada contendo TFA 0,1%. Para as análises por ESI(-)-MS, as amostras foram preparadas em água desionizada. As amostras foram injetadas usando-se uma seringa com taxa de injeção de 5-10µL/min. Experimentos de dissociação induzida por colisão (CID) foram realizados para a confirmação da estrutura de certos compostos, utilizando-se argônio e energias de colisão na faixa de 20 a 50 eV. As análises dos dados foram feitas pelo programa MassLynx®3.5. O valor de m/z de cada espécie indicado foi aquele correspondente ao primeiro pico do grupo isotópico.

### *Espectrometria de emissão atômica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP/AES)*

Para as dosagens de Sb por espectrometria de emissão por plasma (ICP-AES), as amostras foram submetidas à digestão com ácido nítrico concentrado e as concentrações de Sb determinadas por um espectrômetro de emissão por plasma Perkin Elmer, mod. Optima 3000, no Centro de Desenvolvimento Tecnológico e Nuclear (CDTN) da UFMG.

### *Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (ETAAS)*

As dosagens de Sb no soro foram realizadas por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (ETAAS), seja com amostras previamente digeridas com ácido nítrico ou com amostras não digeridas.

As dosagens de Sb em amostras de soro não digeridas foram obtidas em um espectrômetro de absorção atômica Hitachi (Mitorika, Ibaraki, Japan) Z-8200.

As dosagens de Sb em amostras de soro digeridas com ácido nítrico foram realizadas em espectrômetro de absorção atômica (Perkin Elmer mod. Zeeman 5100), equipado com forno de grafite (HGA 600) e amostrador automático (AS-60).

### *Dicroísmo Circular (DC)*

Espectros de DC e absorção no ultravioleta (UV) foram obtidos em um dicrógrafo Jobin Yvon-Spex Mark CD6, no Laboratoire de Chimie Structurale et Spectroscopie Biomoléculaire (UMR CNRS 7031), de l'Université Paris Nord (Bobigny, França). As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo de 0,1 cm contendo 0,3 ml de amostra.

### *Espectrofluorimetria*

A espectroscopia de fluorescência foi realizada em um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse (UK). As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo 1cm, contendo 2,5 mL de amostra.

### 3.2. *Preparação e caracterização físico-química do AM no estado polimerizado e despolimerizado*

#### 3.2.1. Síntese do AM

O N-metil-D-glucamina (NMG) e o pentacloreto de antimônio ( $\text{SbCl}_5$  99%) foram obtidos da Aldrich Chemical Co. O AM foi sintetizado como previamente descrito (DEMICHELI et al., 1999, 2003), a partir de uma mistura equimolar em água destilada de NMG e pentóxido de Sb, obtido da hidrólise do  $\text{SbCl}_5$  em água. Após reação por duas horas, a  $60^\circ\text{C}$ , em pH mantido em 7 com adição de KOH, o AM foi obtido por precipitação com acetona. O produto obtido continha 29% de Sb por peso, determinado por ICP/AES.

#### 3.2.2. Preparação do AM no estado despolimerizado

Para obtenção do AM no estado despolimerizado, foi preparada uma solução do AM em água, na concentração de Sb variando entre 0,05 mol/L e 0,15 mol/L (solução de AM polimerizado). Para induzir o estado despolimerizado, essa solução foi submetida a um aquecimento, a  $55^\circ\text{C}$ , durante 48 horas, e depois liofilizada.

### 3.2.3. Caracterização físico-química do AM

O AM, nos dois estados, foi caracterizado por termogravimetria, análise elementar, dosagem de Sb por ICP/AES, espectroscopia IV, RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C, ESI-MS e medida de osmolaridade.

#### *Caracterização por medida de osmolaridade*

Para a caracterização do AM no estado polimerizado e despolimerizado, uma solução aquosa concentrada de AM (0,7 mol/L de Sb) foi preparada e, em seguida, diluída em água, para uma concentração final de 0,1 mol/L de Sb. Amostras dessa solução (triplicatas) foram incubadas, em diferentes temperaturas (25°C, 37°C e 55°C) e medidas de osmolaridade foram realizadas em diferentes intervalos de tempo. As medidas foram feitas em osmômetro de pressão de vapor.

### 3.3. Preparação e caracterização físico-química das composições antimoniato de meglumina/ $\beta$ -ciclodextrina (AM/ $\beta$ -CD)

#### 3.3.1. Composição AM/ $\beta$ -CD em relação molar 1:1

##### 3.3.1.1. Preparação da composição AM/ $\beta$ -CD

A  $\beta$ -CD (C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>35</sub>•11H<sub>2</sub>O) foi obtida da Sigma Chemical Co.

A composição AM/ $\beta$ CD foi preparada segundo protocolo previamente descrito (DEMICHELI et al., 2004), a partir da mistura de  $\beta$ -CD e AM em água desionizada numa relação molar  $\beta$ -CD/Sb 1:1, sob agitação, a 55°C, por 48 horas, seguido da liofilização da solução resultante.

### 3.3.1.2. Caracterização físico-química da composição AM/ $\beta$ -CD

Na caracterização físico-química da composição AM/ $\beta$ -CD, os seguintes controles foram utilizados: o AM e a  $\beta$ -CD separadamente; previamente submetidos à incubação em água, a 55°C, por 48 horas, e liofilizados; e uma mistura mecânica (MM) de AM +  $\beta$ -CD, obtidos da trituração dos reagentes, numa relação molar Sb/ $\beta$ -CD 1:1, até a formação de uma mistura homogênea.

A composição AM/ $\beta$ -CD foi caracterizada por termogravimetria, análise elementar, dosagem de Sb por ICP/AES, espectroscopia I.V., RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C, ESI-MS, medida de osmolaridade e por dicroísmo circular.

#### *Estudo da interação entre AM e $\beta$ -CD por medida de osmolaridade*

Uma mistura de AM e de  $\beta$ -CD foi preparada em água desionizada, numa relação molar Sb/ $\beta$ -CD 1:1 (concentração de  $\beta$ -CD de 36 mmol/L) e incubada a 55°C, por 48 horas, com subsequente medidas de osmolaridade da solução. Para controle, foram incubados, nas

mesmas condições, o AM, a 36 mM, e a  $\beta$ -CD, a 36 mM. As medidas foram feitas em um osmômetro de pressão de vapor.

*Estudo da interação entre AM e  $\beta$ -CD por dicroísmo circular (DC)*

A existência de um sinal de DC característico do complexo AM foi demonstrada através de incubação de uma mistura equimolar de NMG e  $\text{KSb(OH)}_6$ , em água, a 60°C. O estudo da interação do AM com  $\beta$ -CD em água foi realizado por incubação do AM (10 mmol/L de Sb) com a  $\beta$ -CD, por 90 min, a 60°C, em diferentes concentrações (0, 10, 20, 30, 40 e 50 mmol/L). Após a incubação, as soluções foram imediatamente transferidas a uma cubeta de quartzo de 0,1 cm e o espectro de DC registrado entre 200 e 300 nm. O sinal de DC, dado pelo coeficiente diferencial de absorção molar dicróica ( $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$  em  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) foi relacionado à concentração molar de NMG.

Assumindo que o AM contém essencialmente complexos Sb-NMG de estequiometria 1:1 e que o principal composto de associação presente na mistura  $\beta$ -CD e AM é um composto AM/ $\beta$ -CD, de estequiometria 1:1, a concentração molar deste composto é dada por:

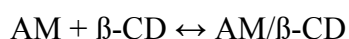
$$(I) [\text{AM}/\beta\text{-CD}] = [\text{AM}]_{\text{total}}(\Delta\varepsilon - \Delta\varepsilon^{\text{AM}})/(\Delta\varepsilon^{\text{AM}/\beta\text{-CD}} - \Delta\varepsilon^{\text{AM}})$$

onde,

$$[\text{AM}]_{\text{total}} = [\text{AM}] + [\text{AM}/\beta\text{-CD}]$$

com  $[AM]$  correspondendo à concentração molar de AM livre e  $\Delta\epsilon^{AM}$  e  $\Delta\epsilon^{AM/\beta-CD}$  aos coeficientes diferenciais de absorção molar dicróica do AM e do composto AM/ $\beta$ -CD, respectivamente.

A constante de estabilidade para a formação do composto AM/ $\beta$ -CD ( $K$ ) foi determinada assumindo-se o equilíbrio:



e usando-se a equação

$$(2) \ 1/[AM] = K\{([\beta-CD]_{total}/[AM/\beta-CD]) - 1\}$$

*Estudo da influência da liofilização no estado físico-químico da composição AM/ $\beta$ -CD por dicroísmo circular (DC) e da cinética de dissociação da composição AM/ $\beta$ -CD*

Para avaliação da influência da liofilização no estado físico-químico da composição AM/ $\beta$ -CD, foram preparadas três soluções: AM, na concentração de 0,05 mol/L de Sb, previamente aquecida por 48 hs, a 55°C; mistura equimolar de AM e  $\beta$ -CD na concentração 0,05 mol/L de Sb, previamente aquecida a 55°C, por 48 hs; composição AM/ $\beta$ -CD liofilizada reconstituída em água, a 25°C, na concentração 0,05 mol/L de Sb. Para a obtenção do espectro de DC, as soluções foram diluídas em água na concentração de 0,01 mol/L de Sb e espectros de DC foram registrados nos  $\lambda$  entre 200 e 300 nm, com o sinal de DC dado pelo

coeficiente diferencial de absorção molar dicróica ( $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$  em  $\text{Lcm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) relacionado à concentração molar de NMG. A cinética de dissociação do complexo AM/ $\beta$ -CD foi determinada a  $25^\circ\text{C}$ , através do registro de espectros em diferentes intervalos de tempo após a diluição.





### 3.5. Estudo da permeação de antimônio em modelo lipídico de membrana

#### 3.5.1. Preparação e caracterização da suspensão de lipossomas

##### 3.5.1.1. Preparação da suspensão de lipossomas

Lipossomas contendo glutathiona reduzida (GSH, Sigma Chemical Co.) foram preparadas a partir de fosfatidilcolina de soja (PC, Avanti Polar Lipids, INC, 95% grau de pureza), (100%), na presença de argônio, para evitar a oxidação do tiol pelo oxigênio do ar. Os lipossomas foram preparados em três 3 etapas. Na primeira etapa, lipossomas multilamelares, chamados MLVs (multilamellar vesicles) foram obtidos pelo método de “hidratação do filme” (ALVING E SWARTZ, 1984). Neste método, o lipídeo foi dissolvido em clorofórmio e, uma vez transferido a um balão, em rotaevaporador, o solvente foi completamente removido, a 60°C, por 50 min, com consequente formação de um filme lipídico. A hidratação do filme foi obtida pela adição de uma solução aquosa GSH, a 0,3 M, em pH 3. Na segunda etapa, a suspensão de lipossomas foi submetida a 10 ciclos de congelamento-descongelamento (MAYER et al., 1985). Na última etapa, os lipossomas foram submetidos a processo de extrusão, que consiste em repetidas filtrações, através de membrana de policarbonato com poro de diâmetro 0,2  $\mu\text{m}$  e 0,1  $\mu\text{m}$ , sucessivamente, utilizando-se um extrusor à pressão de 200-500 psi, resultando na obtenção de lipossomas unilamelares, com 100 nm de diâmetro (MAYER et al., 1986).

Com o intuito de remover a GSH do meio externo aos lipossomas, foram realizadas duas filtrações em gel Sephadex G 50 (Sigma Chemical Co.), pré-equilibrado com solução de KCl 0,15 mmol/L e fosfato 0,02 mmol/L, em pH 7.

### 3.5.1.2. Caracterização da suspensão de lipossomas

#### 3.5.1.2.1. Dosagem de tiol (Glutathiona - GSH)

Para a determinação das quantidades de GSH presentes nos compartimentos interno e externo dos lipossomas, foi usada a sonda ácido 5,5'-Ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB, Sigma Chemical Co.), explorando sua capacidade de formar um complexo com os tiois, medindo-se sua absorvância específica no  $\lambda$  412 nm (ELLMAN, 1959).

Para a determinação da quantidade de GSH no compartimento externo aos lipossomas, alíquotas de 5  $\mu$ L da suspensão de lipossomas foram adicionadas a 3,0 mL de tampão fosfato 0,096 M, contendo EDTA 0,96 mM e DTNB 0,064 mM.

Para a determinação da quantidade total de GSH, (interno mais externo), 10  $\mu$ L de TritonX-100 (Sigma Chemical Co.) 20% (p/v) foram adicionados à 25  $\mu$ L da suspensão de lipossomas e, em seguida, repetido o mesmo protocolo realizado na ausência do detergente.

A absorvância foi medida no  $\lambda$  412 nm, após ter sido zerada com uma solução “branco”, preparada na ausência de DTNB.

Curvas de calibração foram feitas na ausência e na presença de TritonX-100, com a adição de alíquotas de uma solução de GSH de concentração conhecida, em 3 mL de tampão fosfato contendo EDTA 0,96 mM e DTNB 0,064 mM.

#### 3.5.1.2.2. Dosagem de fosfolipídeo

A dosagem dos fosfolipídeos foi feita como descrito previamente (STEWART, 1980) a partir de um método baseado na formação de um complexo entre o ferrotiocianato de amônio e fosfolipídeos e na medida de sua absorvância no  $\lambda$  488 nm, em solução de clorofórmio.

#### 3.5.2. Determinação da cinética de redução de Sb(V) a Sb(III)

A suspensão de lipossomas foi incubada à 37°C, na presença de antimoniais na concentração de Sb de 20 mM. A concentração de Sb(III) foi determinada em diferentes intervalos de tempo, usando um método colorimétrico que se baseia na interação específica entre o Sb(III) e o cromógeno vermelho de bromopirrogolol (BPR, Aldrich Chemical Co) (FRÉZARD et al., 2001). Esse método explora o fato da absorvância, no  $\lambda$  560 nm, do BPR decrescer

proporcionalmente a concentração de Sb(III) na solução analisada, em consequência da formação de um complexo BPR-Sb(III) de estequiometria 1:1.

Uma solução de BPR (“solução de sonda”) foi inicialmente preparada a partir de 0,1 mL de fosfato 0,1 mol/L, 0,01 mL de ácido tartárico (Aldrich Chemical Co) 5% (m/v), 0,05 mL de solução BPR 350  $\mu$ mol/L 1:1 (v/v) água-etanol e 0,34 mL de água, com o ajuste do pH final para 6,8.

A 2 mL da “solução de sonda” foram adicionados 25  $\mu$ L da suspensão de lipossomas, misturada previamente ou não com 10  $\mu$ L de TritonX-100 20% (m/v). Na ausência de TritonX-100, determina-se a concentração de Sb(III) no meio extravesicular, enquanto que na presença de TritonX-100, determina-se a concentração de Sb(III) total (extravesicular + intravesicular). Para obtenção da curva de calibração, 25  $\mu$ L de lipossomas-controle (lipossomas incubados sem Sb(V) acrescentados ou não de TritonX-100 20% (m/v)) foram adicionados à 2 mL da “solução de sonda”, seguido da adição de alíquotas de 5  $\mu$ L de uma solução padrão Sb(III) (tártaro emético, Aldrich Chemical Co) na concentração de Sb(III) de 0,002 mol/L).

Para a confirmação de que a redução ocorreu no compartimento interno dos lipossomas e não no meio externo, esses foram incubados nas mesmas condições do experimento, ou seja, 37°C em presença de antimoniato de potássio (Fluka Chemie GmbH) 20 mM, mas com o acréscimo de TritonX-100, na concentração final de 0,8% (m/v), para romper os lipossomas.

Visando comprovar que a etapa limitante do processo de redução é a permeação do antimônio através da membrana e não a reação de oxirredução, 20 mM de antimoniato de potássio foram incubados na presença de

GSH, 0,3M, pH 3, sendo medida a concentração de Sb(III) em função do tempo.

### 3.5.3. Avaliação da estabilidade da membrana lipossomal na presença das preparações de antimoniais

Para confirmação de que nenhuma das preparações do antimoniais, especialmente aquelas incluindo  $\beta$ -CD, não altera a permeabilidade da bicamada lipídica, foi realizado um ensaio fluorimétrico, usando a calceína (Sigma Chemical Co.) como sonda de permeabilidade. A calceína é uma substância hidrossolúvel de baixo coeficiente de permeabilidade que, quando diluída, apresenta sinal de fluorescência detectável por espectrofluorimetria. Entretanto, sua fluorescência é apagada quando é preparada em solução concentrada ( $> 30$  mmol/L).

Lipossomas LUVs encapsulando uma solução concentrada de calceína em seu compartimento aquoso interno foram preparados a partir de PC, na concentração de 0,1 mol/L. O aparecimento de sinal de fluorescência é indicativo de rompimento das vesículas, com conseqüente liberação e diluição da calceína no meio externo.

Os Lipossomas LUVs usados no experimento foram preparados segundo o protocolo: inicialmente, lipossomas do tipo MLVs foram obtidos a partir da dissolução do lipídeo PC em clorofórmio, seguida da formação de um filme lipídico na parede de um balão em rotaevaporador e hidratação em água destilada, sob agitação mecânica, na concentração de PC 0,08 mol/L. Em seguida, a suspensão de MLVs foi submetida à ultrassonicação, para a

obtenção de lipossomas do tipo SUVs. A 2,5 mL dessa suspensão, foram adicionados 2,5 mL de uma solução da sonda calceína (15 mol/L), seguido de liofilização e reidratação com 0,5 mL de água e tampão PBS (NaCl 0,15 mol/L, fosfato 0,01 mol/L, pH 7,2), até o volume final de 2 mL, para a obtenção de lipossomas do tipo DRV. Por último, a suspensão de DRV foi submetida sucessivamente ao processo de extrusão e filtração, através de membranas de policarbonato com poros de 0,2  $\mu\text{m}$  e 0,1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, por cinco vezes, resultando na obtenção de lipossomas do tipo LUVs.

Antes do estudo de estabilidade, a calceína não encapsulada foi retirada da suspensão de lipossomas por filtração em gel Sephadex G50 equilibrado com PBS.

Para avaliar a estabilidade dos lipossomas frente aos compostos a base de Sb, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de lipossomas foram misturadas com 50  $\mu\text{L}$  das seguintes soluções: tampão fosfato isotônico (controle); soluções isotônicas de AM, de  $\beta$ -CD ou de AM/ $\beta$ -CD (relações molares 1:1 ou 7:1) em concentração final de Sb de 20 mol/L. As amostras foram mantidas em incubação a 37°C.

Para determinar a taxa de calceína liberada, entre  $t=0$  e  $t=6$  hs, alíquotas (10  $\mu\text{L}$ ) foram retiradas das amostras incubadas e adicionadas a 2,5 mL de solução salina tamponada. O sinal de fluorescência foi medido (excitação =  $\lambda$  490 nm; emissão =  $\lambda$  520 nm), antes ( $F_i$ ) e após a adição de Triton X-100 ( $F_t$ ). A fração de calceína liberada no meio extracelular foi dada pela relação: ( $F_i/F_t$ ).

3.6. Protocolos experimentais foram realizados de acordo com o guia para uso humano de animais em laboratório e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA, protocolo nº 004 / 03).

### 3.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de student ou pelo one-way ANOVA, com Tukey'sPost-test, usando o programa PRISM 3.0 (Graph Pad Software Inc). O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## IV – RESULTADOS

A apresentação dos resultados foi dividida em três partes: 1) estudo dos mecanismos envolvidos no aumento da concentração plasmática de Sb de ação da composição AM/ $\beta$ -CD de relação molar 1:1; 2) preparação e caracterização de uma composição AM/ $\beta$ -CD de relação molar 7:1; 3) desenvolvimento de um modelo lipídico de membrana para o estudo da permeação do Sb(V) a partir das diferentes composições estudadas.

**I – Estudo dos mecanismos envolvidos no aumento da concentração plasmática de Sb da composição AM/ $\beta$ -CD 1:1**

Como o processo de preparo da composição AM/ $\beta$ -CD consiste de duas etapas sucessivas - a primeira de aquecimento da mistura AM +  $\beta$ -CD, a 55°C, por 48 hs, e a segunda de liofilização – foi avaliado o efeito de cada uma dessas etapas nas características físico-químicas da mistura AM/ $\beta$ -CD e o seu impacto no nível de absorção oral do Sb.

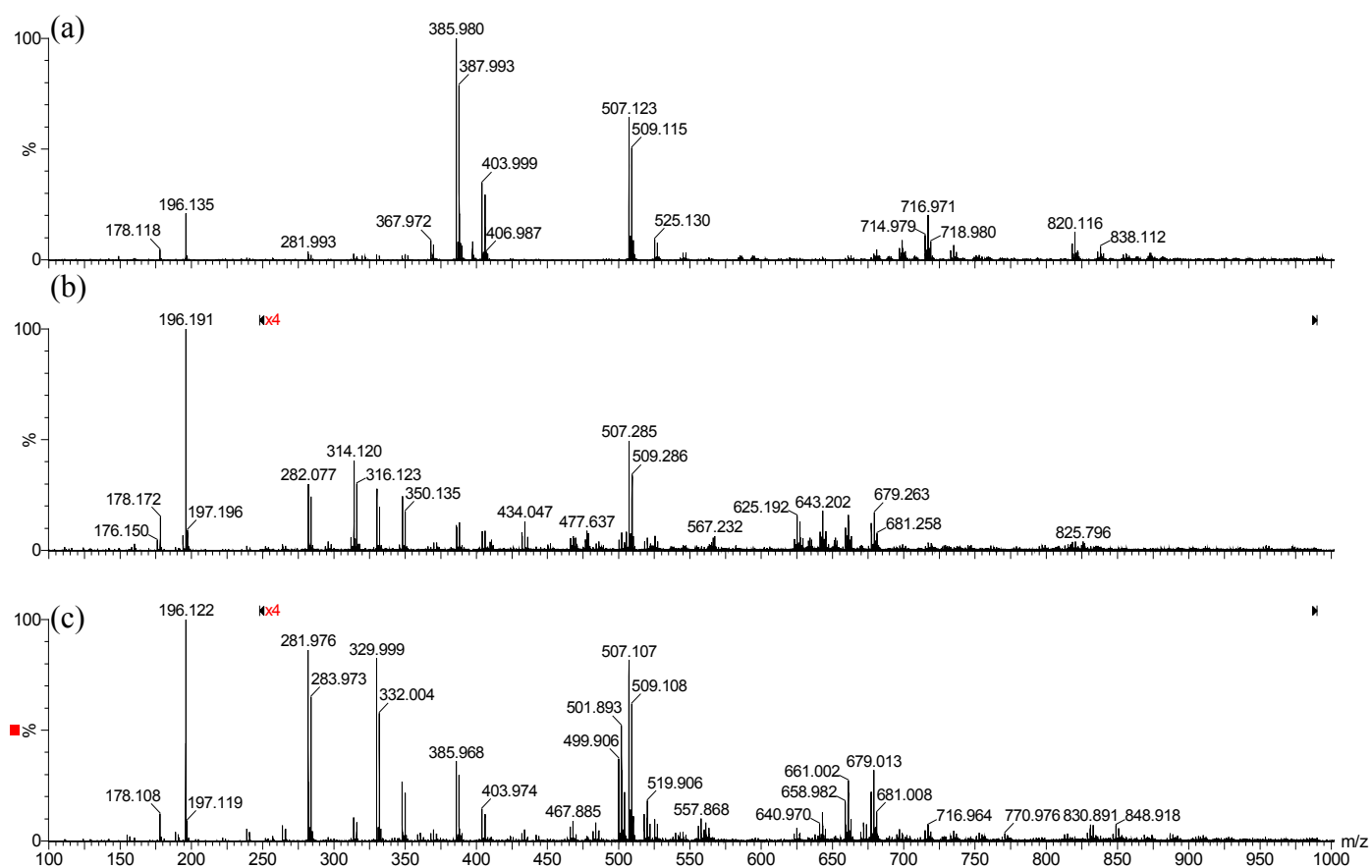
**I.1. Influência da etapa de aquecimento nas características físico-químicas e farmacológicas da mistura AM/ $\beta$ -CD**

**I.1.1. Caracterização do AM por ESI-MS nos modos positivo e negativo**

A composição química do AM foi investigada por espectrometria de massa de Ionização por eletrodispersão (ESI-MS), nos modos positivo e negativo. As espécies contendo Sb podem ser facilmente identificadas pelo aparecimento de duplete ( $m/z$  e  $m/z + 2$ , indicando um complexo

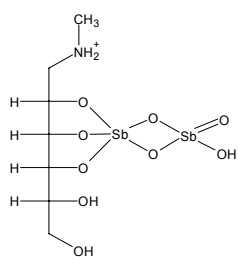
monovalente com 1 Sb), tripleto ( $m/z$ ,  $m/z + 2$  e  $m/z + 4$ , indicando um complexo monovalente com 2 Sb) e quadruplo ( $m/z$ ,  $m/z + 2$ ,  $m/z + 4$  e  $m/z + 6$ , indicando um complexo monovalente com 3 Sb), devido a distribuição isotópica natural do Sb ( $^{121}\text{Sb}:^{123}\text{Sb} = 57:43$ ).

A **FIGURA 4** apresenta os espectros ESI(+)-MS obtidos com soluções aquosas de AM preparadas em diferentes condições de pH e de concentração. Pode-se identificar os picos referentes aos íons de  $m/z$  314, 507 e 818, correspondentes aos complexos Sb-NMG de estequiometria 1:1, 1:2 e 2:3, respectivamente, conforme previamente relatado (ROBERTS et al., 1998; DEMICHELI et al., 2003). Novas espécies foram identificadas, de  $m/z$  330 e 677, correspondentes aos complexos Sb-NMG de estequiometria 1:1 e 2:2. Para o AM em solução concentrada, a adição de um íon potássio a cada um dos complexos acima resulta no aparecimento dos picos de  $m/z$  386 e 715, respectivamente. Para o AM em solução ácida, complexos de  $m/z$  500 e 829, correspondentes aos complexos Sb-NMG de estequiometria 2:1 e 3:2, respectivamente, foram identificados.

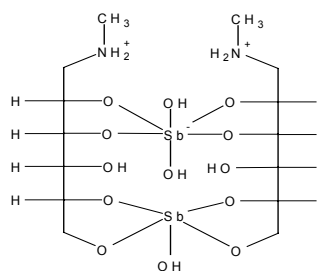


**Figura 4** Espectros de massa ESI(+)-MS de soluções aquosas de AM, em diferentes condições de concentração e pH. (a): solução de AM, 0.7 M de Sb, em pH 7-8; (b): solução de AM, 0.005 M de Sb, em água ou pH 8 (tampão bicarbonato); (c): solução de AM, 0.005 M de Sb, em pH 3 (TFA 0,1%).

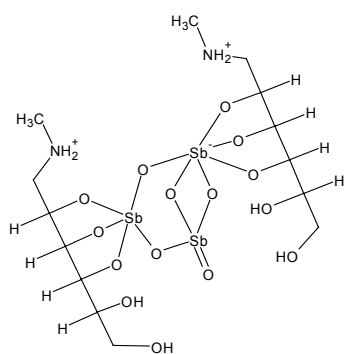
A **FIGURA 5** mostra as estruturas propostas para algumas espécies encontradas no espectro de ESI(+)-MS da **FIGURA 4**.



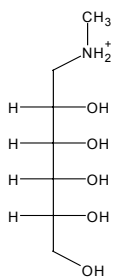
$m/z$  500



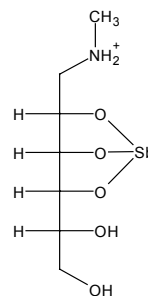
$m/z$  677



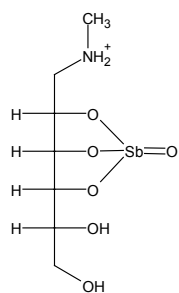
$m/z$  829



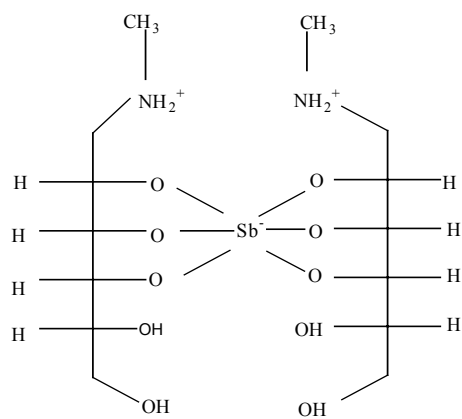
$m/z$  196



$m/z$  314



$m/z$  330



$m/z$  507

**FIGURA 5** Estruturas propostas para as principais espécies encontradas por ESI(+)-MS.

A **tabela 1** mostra as espécies identificadas com seus respectivos valores de  $m/z$ .

**TABELA 1 Espécies iônicas identificadas no AM por ESI(+)-MS.** O valor de  $m/z$  de cada espécie indicado foi aquele correspondente ao primeiro pico do grupo isotópico

Espécies Iônicas	$m/z$
$[\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_4]^+$	189 <sup>c</sup>
$(\text{NMG})^+$	196 <sup>a,b,c</sup>
$[(\text{NMG})\text{Sb}^{\text{III}}-3\text{H}]^+$	314 <sup>a,b,c</sup>
$[(\text{NMG})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})-3\text{H}]^+$	330 <sup>b,c</sup>
$[(\text{NMG})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})(\text{OH})-2\text{H}]^+$	348 <sup>b,c</sup>
$[(\text{NMG})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})\text{K}-4\text{H}]^+$	368 <sup>a,c</sup>
$[(\text{NMG})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})(\text{OH})\text{K}-3\text{H}]^+$	386 <sup>a,b,c</sup>
$[(\text{NMG})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})(\text{OH})_2\text{K}-2\text{H}]^+$	404 <sup>a,b,c</sup>
$[(\text{NMG})(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})_3-4\text{H}]^+$	482 <sup>c</sup>
$[(\text{NMG})(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})_3(\text{OH})-3\text{H}]^+$	500 <sup>c</sup>
$[(\text{NMG})_2\text{Sb}^{\text{V}}-6\text{H}]^+$	507 <sup>a,b,c</sup>
$[(\text{NMG})(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})_3(\text{OH})_2-2\text{H}]^+$	518 <sup>c</sup>
$[(\text{NMG})_2\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})-3\text{H}]^+$	525 <sup>a</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})-9\text{H}]^+$	641 <sup>b,c</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})(\text{OH})-8\text{H}]^+$	659 <sup>b,c</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{OH})_3-8\text{H}]^+$	677 <sup>b,c</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})\text{K}-10\text{H}]^+$	679 <sup>a</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})(\text{OH})\text{K}-9\text{H}]^+$	697 <sup>a</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})(\text{OH})_2\text{K}-8\text{H}]^+$	715 <sup>a,c</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})(\text{OH})_3\text{K}-7\text{H}]^+$	733 <sup>a,c</sup>
$[(\text{NMG})_3(\text{Sb}^{\text{V}})_2-12\text{H}]^+$	818 <sup>a</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_3(\text{O})_5-6\text{H}]^+$	829 <sup>c</sup>
$[(\text{NMG})_3(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})-10\text{H}]^+$	836 <sup>a</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_3(\text{O})_5(\text{OH})-7\text{H}]^+$	847 <sup>c</sup>
$[(\text{NMG})_3(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})_2-8\text{H}]^+$	856 <sup>a</sup>

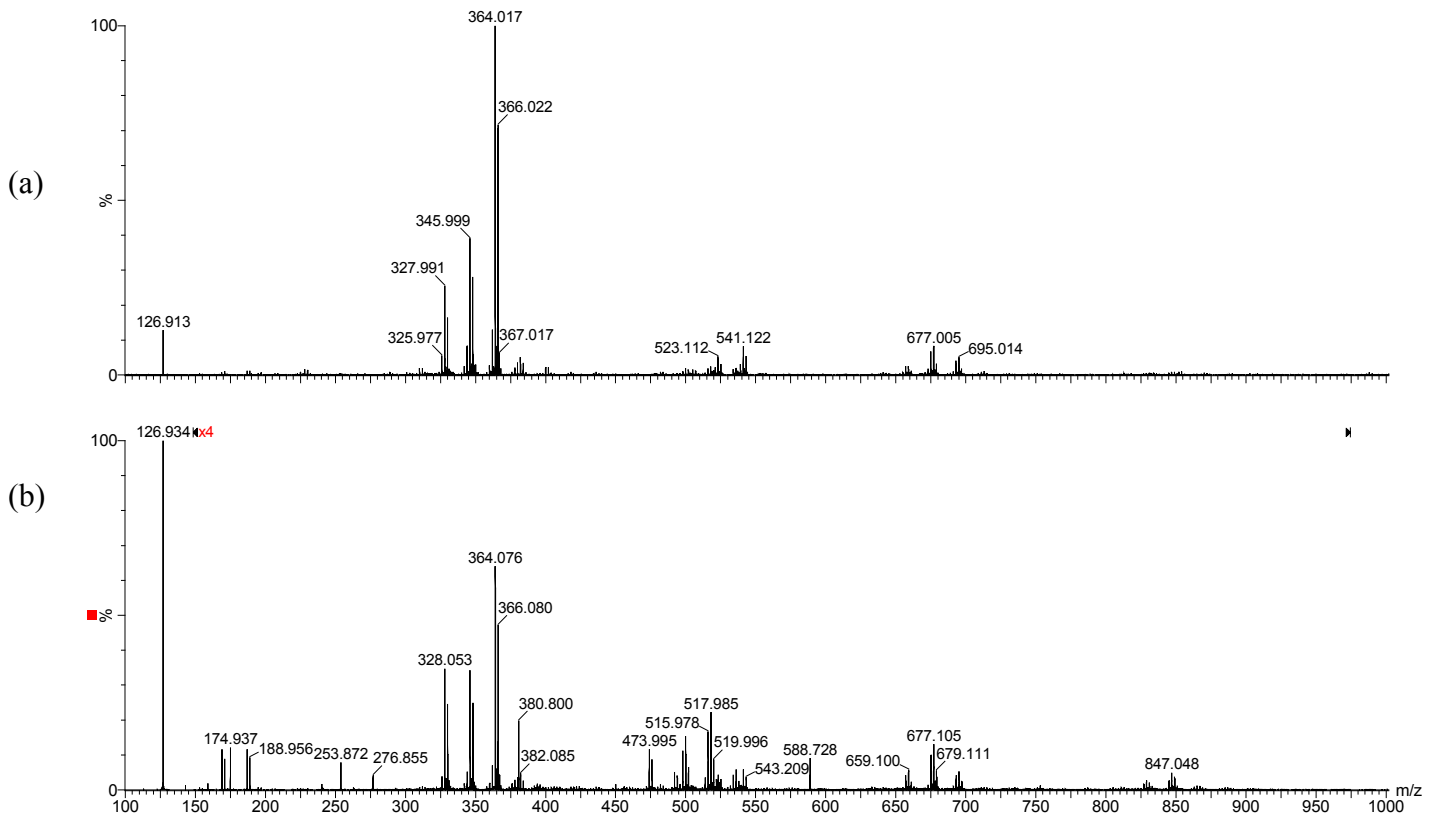
<sup>a</sup> solução de AM, 0.7 M de Sb, em pH 7-8

<sup>b</sup> solução de AM, 0.005 M de Sb, em água ou pH 8 (tampão bicarbonato)

<sup>c</sup> solução de AM, 0.005 M de Sb, em pH 3 (TFA 0,1%)

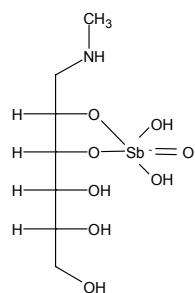
A **FIGURA 6** mostra os espectros de massa ESI(-)-MS obtidos com solução de AM em água, preparados em diferentes concentrações. Foram identificados os picos referentes aos íons de  $m/z$  364, 516, 541, 675 e 845, atribuídos aos complexos Sb-NMG de estequiometria 1:1, 2:1, 1:2, 2:2 e 3:2, respectivamente. Esses dados confirmam análises prévias por ESI(+)-MS (DEMICHELI et al., 2003; ROBERTS et al., 1998) de que o AM consiste

em uma mistura de complexos com fórmula geral  $(\text{NMG-Sb})_n$ ,  $(\text{NMG-Sb})_n$ -  
NMG e  $(\text{Sb-NMG})_n$ -Sb.

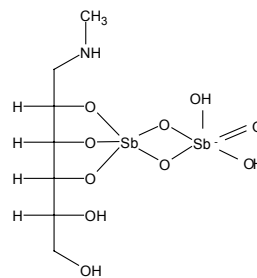


**FIGURA 6** Espectros de massa ESI(-)-MS de soluções de AM em água, em diferentes concentrações. (a): solução de AM, 0.7 M de Sb, em pH 7-8; (b): solução de AM, 0.005 M de Sb, em água.

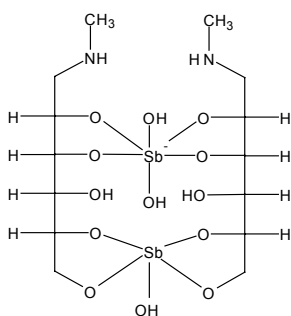
A FIGURA 7 mostra as estruturas propostas para as principais espécies encontradas no espectro de ESI(-)-MS do AM.



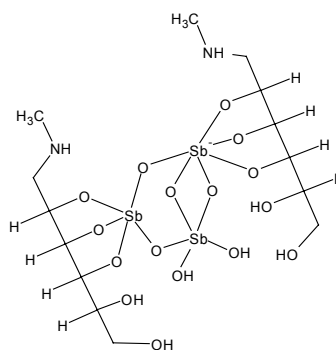
$m/z$  364



$m/z$  498



$m/z$  675



$m/z$  845

**FIGURA 7** Estruturas propostas para as principais espécies encontradas no espectro de ESI(-)-MS do AM.

A **tabela 2** apresenta as fórmulas propostas para as espécies identificadas com seus respectivos valores da relação  $m/z$ .

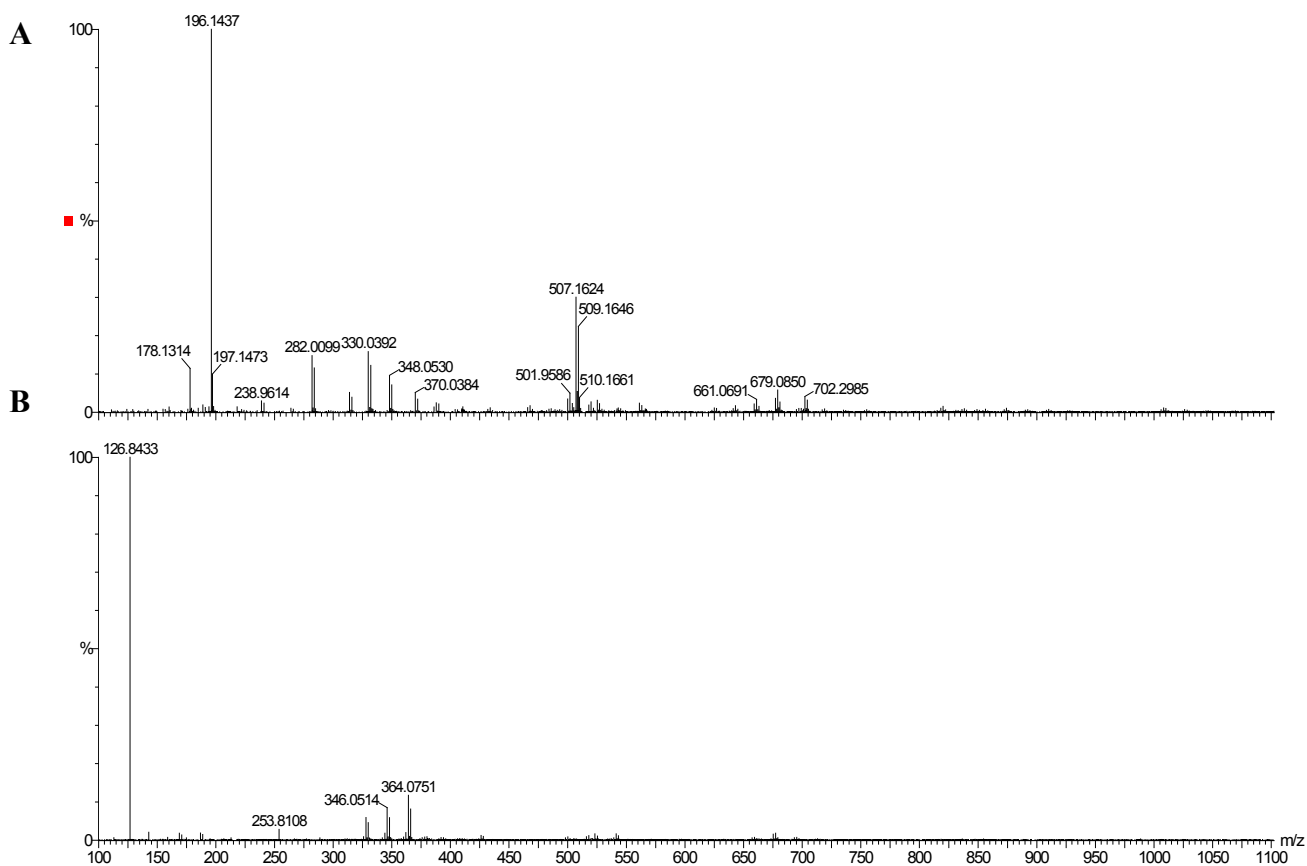
**TABELA 2 Espécies iônicas identificadas no AM por ESI(-)-MS.** O valor de  $m/z$  de cada espécie indicado foi aquele correspondente ao primeiro pico do grupo isotópico (**FIGURA 6**).

Espécies Iônicas	$m/z$
$[\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})_3]^-$	169 <sup>a,b</sup>
$[\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})_2(\text{OH})_2]^-$	187 <sup>a,b</sup>
$[(\text{NMG})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})-5\text{H}]^-$	328 <sup>a,b</sup>
$[(\text{NMG})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})(\text{OH})-4\text{H}]^-$	346 <sup>a,b</sup>
$[(\text{NMG})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})(\text{OH})_2-4\text{H}]^-$	364 <sup>a,b</sup>
$[(\text{NMG})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})(\text{OH})_2-3\text{H}]^-$	474 <sup>b</sup>
$[(\text{NMG})(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})_2(\text{OH})_2-6\text{H}]^-$	498 <sup>b</sup>
$[(\text{NMG})_2\text{Sb}^{\text{V}}-4\text{H}]^-$	505 <sup>b</sup>
$[(\text{NMG})(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})_2(\text{OH})_3-5\text{H}]^-$	516 <sup>b</sup>
$[(\text{NMG})_2\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})-6\text{H}]^-$	523 <sup>a,b</sup>
$[(\text{NMG})_2\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_2 - 6\text{H}]^-$	541 <sup>a,b</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{O})(\text{OH})-10\text{H}]^-$	657 <sup>a,b</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{OH})_3-10\text{H}]^-$	675 <sup>a,b</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_3(\text{O})_5-8\text{H}]^-$	827 <sup>b</sup>
$[(\text{NMG})_2(\text{Sb}^{\text{V}})_3(\text{O})_4(\text{OH})_2-8\text{H}]^-$	845 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> solução de AM, 0.7 M de Sb, em pH 7-8

<sup>b</sup> solução de AM, 0.005 M de Sb, em água ou pH 8

Quando os espectros ESI(+)-MS e ESI(-)-MS do AM (**FIGURAS 4 e 6**, respectivamente) foram comparados aos do AM comercial (Glucantime®) (**FIGURA 8A e B**), os mesmos picos foram observados em ambos os compostos e apenas diferenças na proporção relativa das espécies foram observadas.



**FIGURA 8** Espectros ESI-MS do Glucantime® (AM de uso comercial). Modos positivo (0,005 M de Sb em TFA 1%) (A) e negativo (0,005 M de Sb em água) (B).

### I.1.2. Efeito do aquecimento do AM no seu estado de polimerização e nível de absorção oral

#### I.1.2.1. Caracterização por osmometria de pressão de vapor

O grau de polimerização do AM, em água, foi avaliado através de medidas de osmolaridade por pressão de vapor. A dissociação do AM foi induzida pela diluição do AM, da concentração de Sb de 0,8 M para 0,1 M sendo avaliada a influência da temperatura nessa dissociação.

A FIGURA 9 mostra as cinéticas de variação de osmolaridade de soluções de AM em água, após diluição, em diferentes temperaturas.

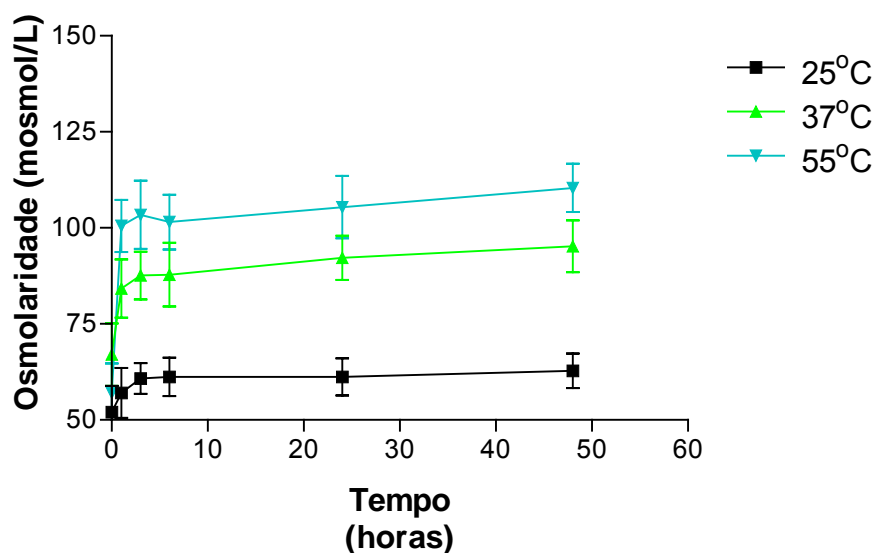


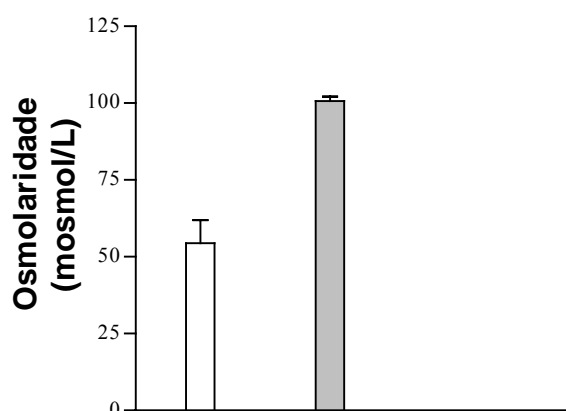
FIGURA 9 Cinéticas de evolução da osmolaridade de soluções de AM em diferentes temperaturas de incubação. Cinéticas obtidas após diluição de uma solução de AM da concentração de Sb de 0,8 M para 0,1 M. Os dados mostram as médias  $\pm$  desvio padrão (n=4).

A solução de AM, na concentração de Sb de 0,1 M, apresenta uma osmolaridade inicial de 55 mosmol/L indicando uma média de 2 átomos de Sb por partícula na solução. Nas temperaturas de 25°C, 37°C e 55°C, após três horas de incubação, foi observado um aumento da osmolaridade de 21%, 42% e 94%, respectivamente, podendo ser atribuído à dissociação de complexos de elevado peso molecular a complexos de menor peso molecular. O valor de osmolaridade de  $100 \pm 7$  mosmol/L, alcançado em 55°C, corresponde a uma média de 1 átomo de Sb por partícula em

solução, sugerindo a predominância de complexo Sb-NMG 1:1 nessa condição.

Após 48 horas de incubação, a solução de AM mantida a 55°C foi liofilizada, a fim de que fosse avaliada a capacidade da liofilização de preservar o estado de dissociação do AM.

A **FIGURA 10** compara a osmolaridade de uma solução do AM liofilizado e reconstituído em água, na concentração 0,1 M de Sb, imediatamente após sua preparação, com aquela de uma solução de AM de mesma concentração, não submetida ao processo de aquecimento/liofilização.

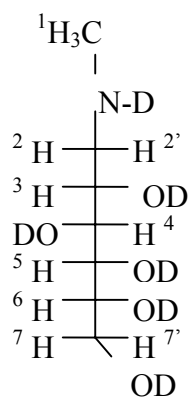


**FIGURA 10 Osmolaridades de soluções de AM dissociado ou não dissociado.** As soluções de AM, em água, na concentração de Sb de 0,1 M, obtidas a partir de AM dissociado (■) ou a partir do AM não dissociado (□). Os dados mostram as médias  $\pm$  desvio padrão (n=3).

Observa-se uma osmolaridade aproximadamente duas vezes maior para a solução preparada do AM liofilizado ( $100 \pm 10$  mosmol/L), indicando que o processo de liofilização preservou, no estado sólido, o estado dissociado do AM.

### I.1.2.2. Caracterização por RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C

Visando atribuir os sinais dos espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C do AM em D<sub>2</sub>O, a numeração dos átomos de hidrogênio e carbono na molécula do ligante NMG está representada na **FIGURA 12**.



**FIGURA 11** Numeração dos átomos de hidrogênio e carbono na molécula N-metil glucamina deuterada (NMG).

Considerando-se que cada hidrogênio no AM reside em dois ambientes químicos diferentes (DEMICHELI et al., 2003), esses átomos são representados como H<sub>1a</sub>, H<sub>2a</sub>, H<sub>2'a</sub>, H<sub>3a</sub>, H<sub>4a</sub>, H<sub>5a</sub>, H<sub>6a</sub>, H<sub>7a</sub> e H<sub>7'a</sub> (primeiro ambiente) e como H<sub>1b</sub>, H<sub>2b</sub>, H<sub>2' b</sub>, H<sub>3b</sub>, H<sub>4b</sub>, H<sub>5b</sub>, H<sub>6b</sub>, H<sub>7b</sub> e H<sub>7' b</sub> (segundo ambiente).

As **TABELAS 3** e **4** apresentam os valores correspondentes aos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C para AM, em D<sub>2</sub>O, quando a solução foi submetida ou não ao processo de aquecimento, respectivamente. Os deslocamentos químicos do AM não aquecido estão em concordância com os valores apresentados em DEMICHELI et al. (2003).

Comparando-o com os valores encontrados para o AM aquecido, não foram encontradas diferenças entre ambas as formas do composto.

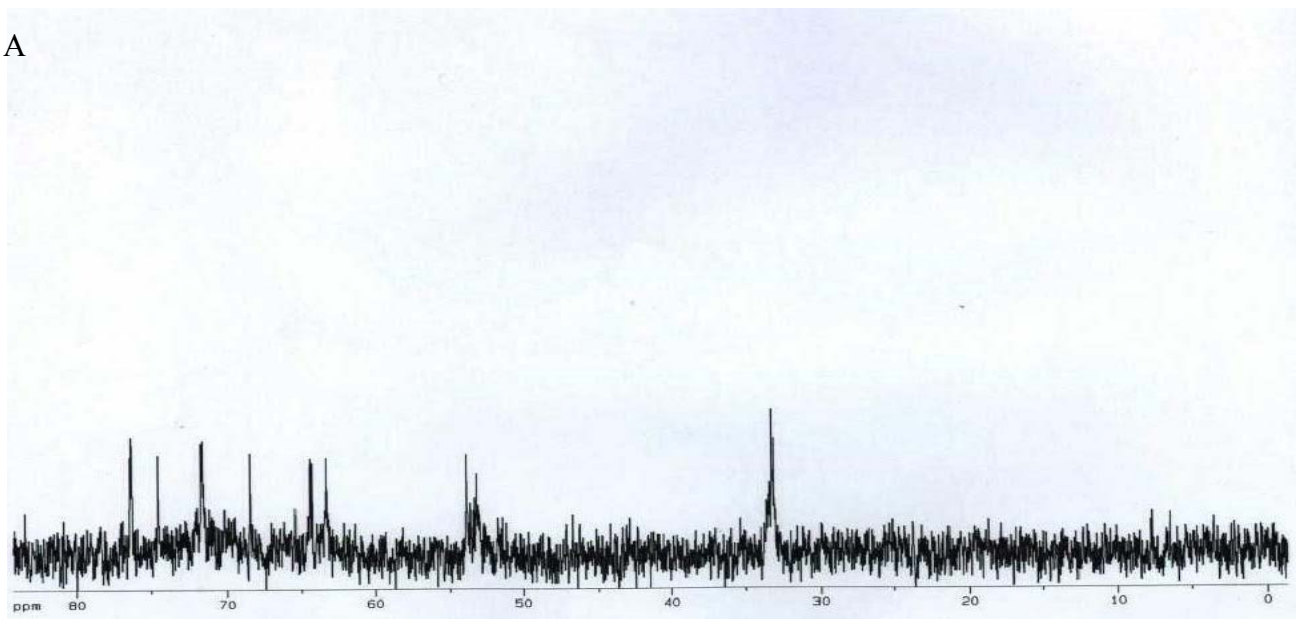
**TABELA 3.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios do AM, em D<sub>2</sub>O, submetido ou não ao aquecimento, determinados a partir do espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz) (espectro não mostrado).

AM				AM aquecido			
H	$\delta$ (ppm)	H	$\delta$ (ppm)	H	$\delta$ (ppm)	H	$\delta$ (ppm)
1 <sup>a</sup>	2,62	1 <sup>b</sup>	2,65	1 <sup>a</sup>	2,62	1 <sup>b</sup>	2,66
2 <sup>a</sup>	3,04	2 <sup>b</sup>	2,97	2 <sup>a</sup>	3,04	2 <sup>b</sup>	2,98
2 <sup>'a</sup>	3,00	2 <sup>'b</sup>	2,95	2 <sup>'a</sup>	3,00	2 <sup>'b</sup>	2,95
3 <sup>a</sup>	4,36	3 <sup>b</sup>	4,13	3 <sup>a</sup>	4,34	3 <sup>b</sup>	-
4 <sup>a</sup>	3,84	4 <sup>b</sup>	4,20	4 <sup>a</sup>	-	4 <sup>b</sup>	4,2
5 <sup>a</sup>	3,59	5 <sup>b</sup>	3,63	5 <sup>a</sup>	3,57	5 <sup>b</sup>	3,63
6 <sup>a</sup>	3,91	6 <sup>b</sup>	3,41	6 <sup>a</sup>	-	6 <sup>b</sup>	3,40
7 <sup>a</sup>	3,65	7 <sup>b</sup>	3,70	7 <sup>a</sup>	3,65	7 <sup>b</sup>	3,69
7 <sup>'a</sup>	3,54	7 <sup>'b</sup>	3,45	7 <sup>'a</sup>	3,53	7 <sup>'b</sup>	3,45

**TABELA 4** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos do AM em D<sub>2</sub>O, submetido ou não ao aquecimento, determinados a partir do espectro de RMN<sup>13</sup>C (400 MHz) (FIGURA 14).

CARBONO	$\delta$ (ppm)	
	AM	AM aquecido
C1	53,9	53,9
C2	72,2	72,2
C3	-	-
C4	65,4	65,4
C5	74,35	74,35
C6	63,3	63,3
C7	33,25	33,25

A



B

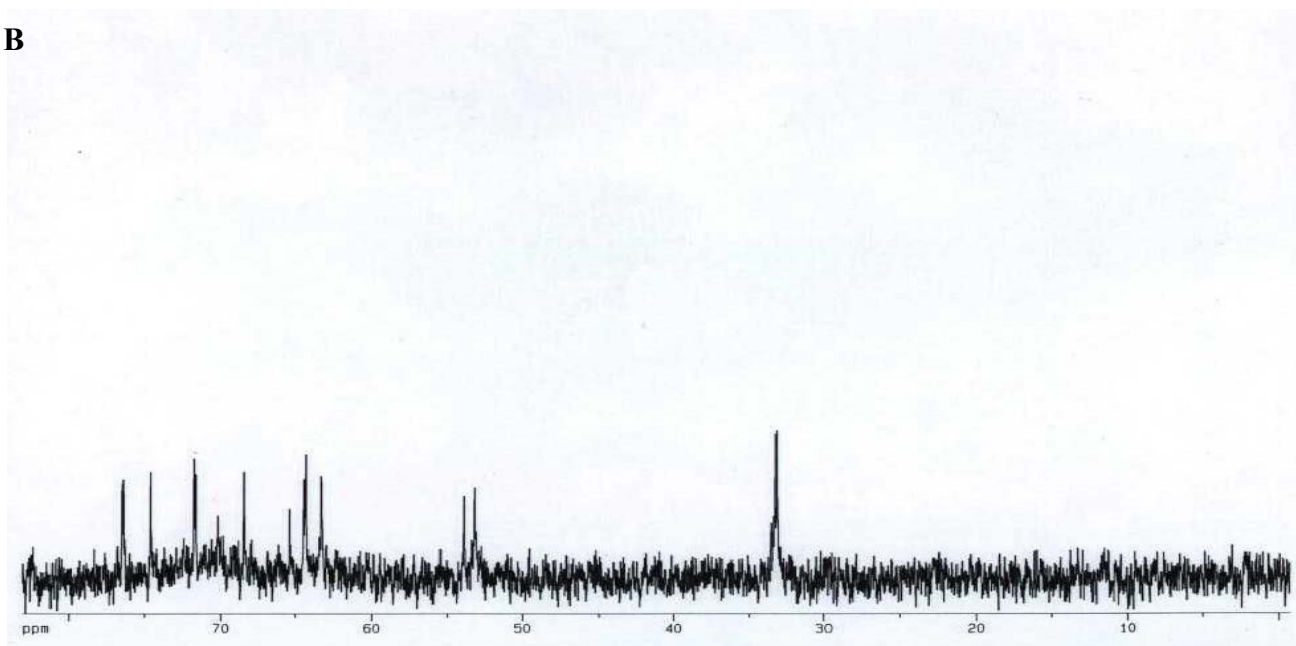
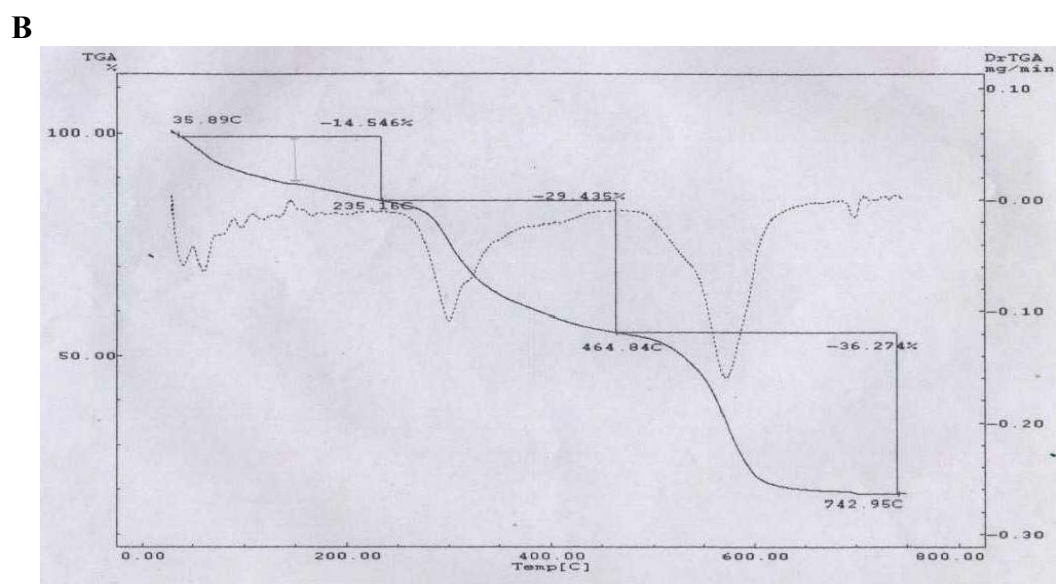
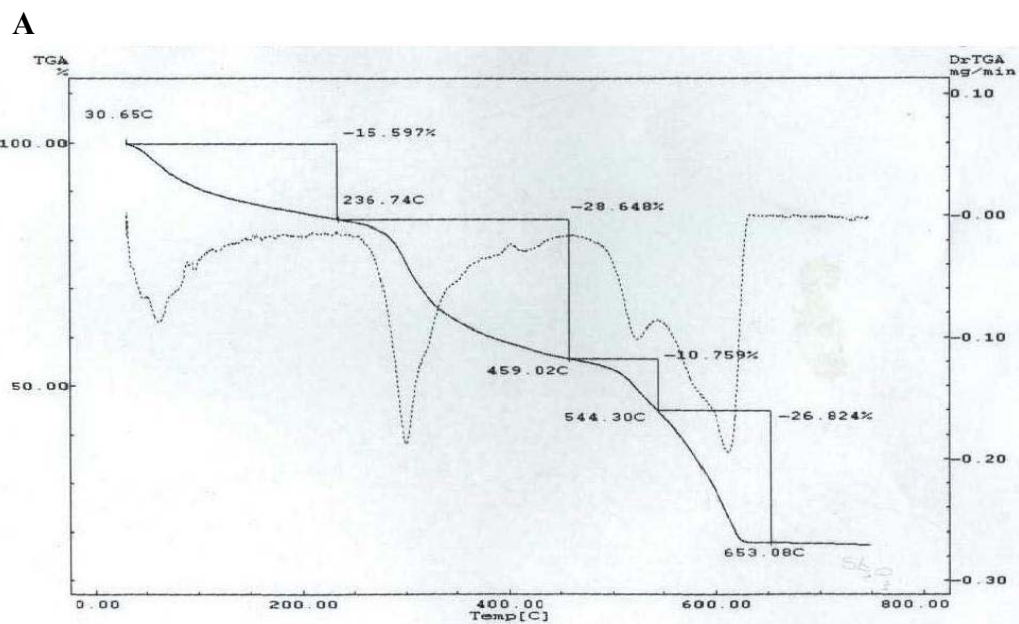


FIGURA 12 Espectros de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  do AM, em  $\text{D}_2\text{O}$ , submetido (B) ou não (A) ao processo de aquecimento .

### I.1.2.3. Caracterização por termogravimetria (TG)

A **FIGURA 14 (A e B)** apresenta as curvas TG/DTG obtidas para o AM, obtido inicialmente no estado sólido por precipitação com acetona, dissolvido em água, submetido ou não ao processo de aquecimento e liofilizado.



**FIGURA 13** Curvas TG/DTG do AM submetido (B) ou não (A) ao processo de aquecimento e liofilizado. As curvas representam: a perda de massa em função da temperatura ( \_\_\_ ); as derivadas das curvas de perda de massa ( ----).

Na curva TG/DTG do AM (**FIGURA 14 A**), são observadas quatro fases de decomposição: a primeira fase, entre 31°C e 237°C, com perda de cerca de 16% de massa, atribuída à eliminação da água de solvatação; a segunda fase, entre 237°C e 459°C, com perda de cerca de 29% de massa, atribuída à decomposição do ligante; a terceira fase, entre 459°C e 544°C, com perda de cerca de 11% de massa, e uma quarta fase, entre 544°C e 653°C, com perda de 27% de massa, atribuídas a transformações envolvendo o Sb, observando-se a existência de um resíduo indicativo da presença desse metal no composto.

Na curva TG/DTG do AM aquecido (**FIGURA 14 B**), são observadas três fases de decomposição: a primeira fase, entre 36°C e 235°C, com perda de cerca de 15% de massa, atribuída à eliminação da água de solvatação; a segunda fase, entre 235°C e 465°C, com perda de cerca de 29% de massa, atribuída à decomposição do ligante; a terceira fase, entre 465°C e 743°C, com perda de cerca de 36% de massa, atribuída a transformações envolvendo o Sb, com a existência de um resíduo, indicativo também da presença desse metal no composto.

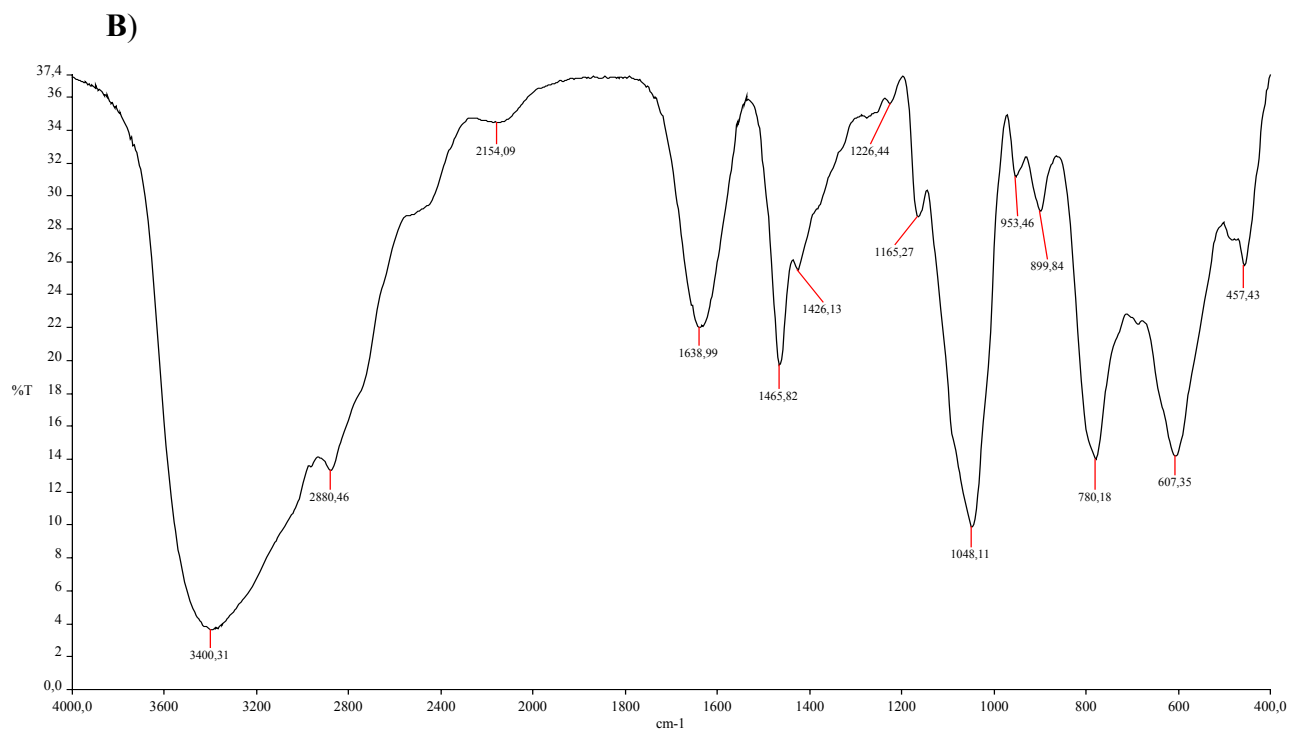
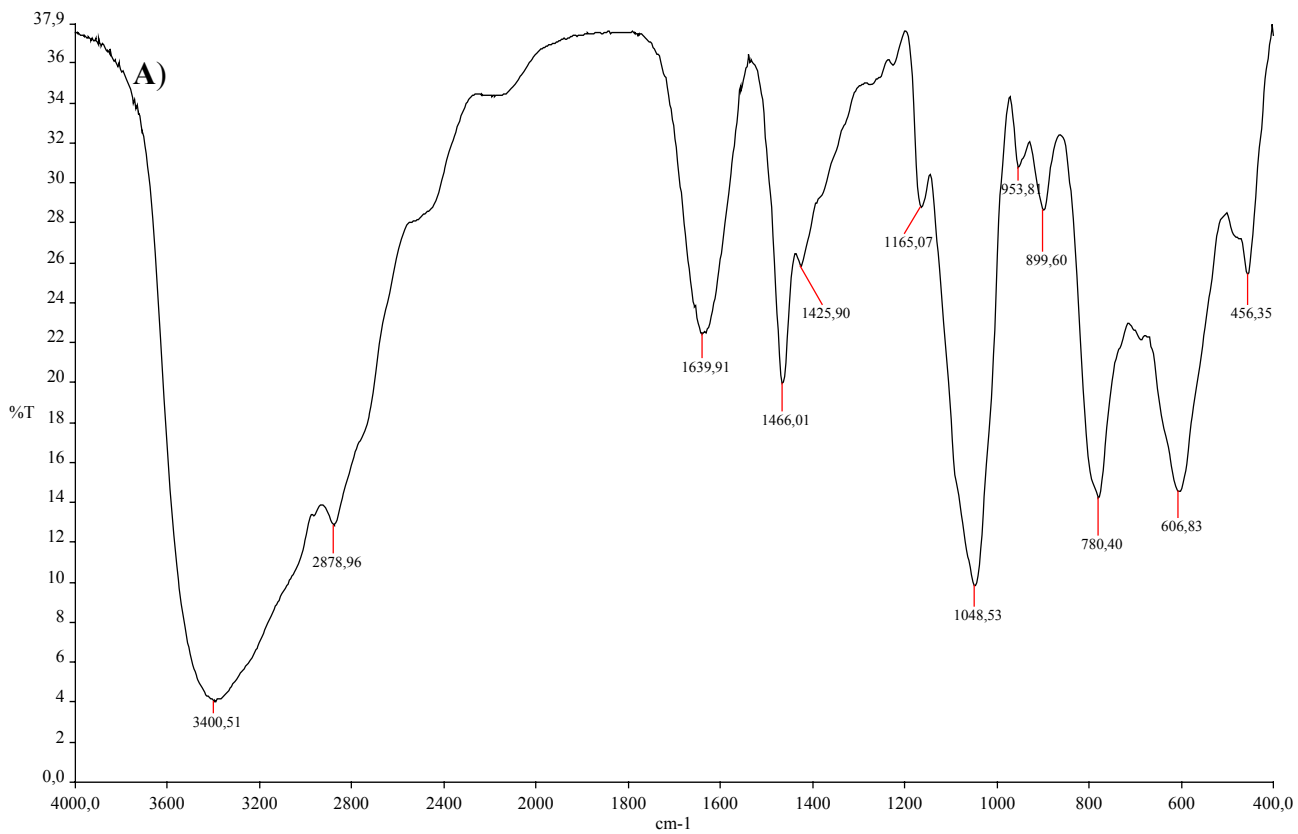
Observa-se, para ambos os compostos, que não há nenhum patamar de estabilidade térmica, indicativo da instabilidade térmica do AM, seja antes ou após a dissociação.

Nas curvas TG, foi identificada uma fase de decomposição, entre 459°C e 544°C, no AM, não identificada no composto no estado despolimerizado. Neste, o deslocamento para a esquerda do ponto de

decomposição da curva, entre 540°C e 600°C, indica uma decomposição facilitada do composto, compatível com um estado mais dissociado.

#### I.1.2.4. Caracterização por espectroscopia infravermelha (I.V.).

A **FIGURA 14 (A e B)** apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho do AM, submetido ou não ao processo de aquecimento, respectivamente.



**FIGURA 14** Espectros na região do infravermelho do AM, submetido (B) ou não ao processo de aquecimento (A).

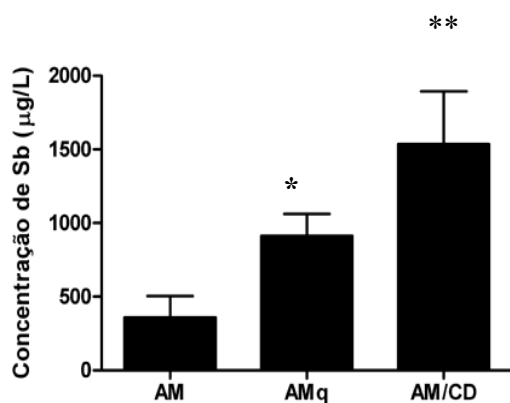
Pode-se observar a semelhança entre ambos, podendo-se identificar as seguintes bandas em comum: 3550-3000  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes às vibrações de estiramento dos grupos OH, indicativo de complexação do Sb ao ligante; 2880-2860  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à vibração de estiramento dos C-H dos alcanos; 1650-1550  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à vibração de estiramento NH da amina secundária; 1500-1200  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas à deformação angular no plano dos grupos C-O; banda em torno de 600  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída às vibrações de estiramento Sb-O (DEMICHELI et al., 1999), confirmando a presença do metal nos dois compostos.

#### I.1.2.5. Efeito do aquecimento do AM no nível de absorção de Sb por via oral

A **FIGURA 15** mostra a concentração de Sb em soro de camundongos SWISS três horas após a administração por via oral do AM submetido ou não ao processo de aquecimento. Observa-se que para o AM submetido ao processo de aquecimento houve um aumento significativo na concentração de Sb, em relação ao AM não aquecido. Esses dados indicam que a dissociação do AM promovida pelo aquecimento resultou no aumento do nível de absorção oral do Sb.

A comparação da preparação do AM aquecido com a composição AM/ $\beta$ -CD mostra diferença significativa nos níveis séricos de Sb, indicando que, na composição AM/ $\beta$ -CD outros fatores, além da dissociação do AM induzida pelo aquecimento, estão contribuindo para

o aumento de absorção oral de Sb. Entre os possíveis fatores, pode-se citar a formação de um complexo entre o AM e a  $\beta$ -CD (favorecido pelo aquecimento) e alterações físico-químicas da composição AM/ $\beta$ -CD induzidas pela liofilização.



**FIGURA 15** Concentrações de Sb em soro de camundongos SWISS três horas após a administração por via oral de diferentes preparações do AM (100 mg/Kg). Preparações: AM dissolvido em água a 25°C (0,05 M de Sb) (**AM**); AM previamente aquecido por 48 horas, a 55°C, liofilizado e dissolvido em água a 25°C (0,05 M de Sb) (**AMq**); composição AM/ $\beta$ -CD em água, a 25°C (0,05 M de Sb) (**AM/CD**). Os dados são mostrados como médias  $\pm$  desvios-padrão (n=4). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,05$  (one way ANOVA com Tukey's Post test).

### I.1.3. Estudo da interação do AM com $\beta$ -CD em solução aquosa

#### I.1.3.1. Estudo da interação por osmometria de pressão de vapor

Estudos prévios mostraram ser possível o estudo da interação de CDs com substâncias convidadas por osmometria de pressão de vapor

(ZANNOU, et al., 2001). A **TABELA 5** mostra os valores de osmolaridade determinados para soluções em água do AM (35 mM de Sb), da  $\beta$ -CD (35 mM) e da mistura AM (35 mM de Sb) +  $\beta$ -CD (35 mM), após aquecimento por 48 horas, a 55°C.

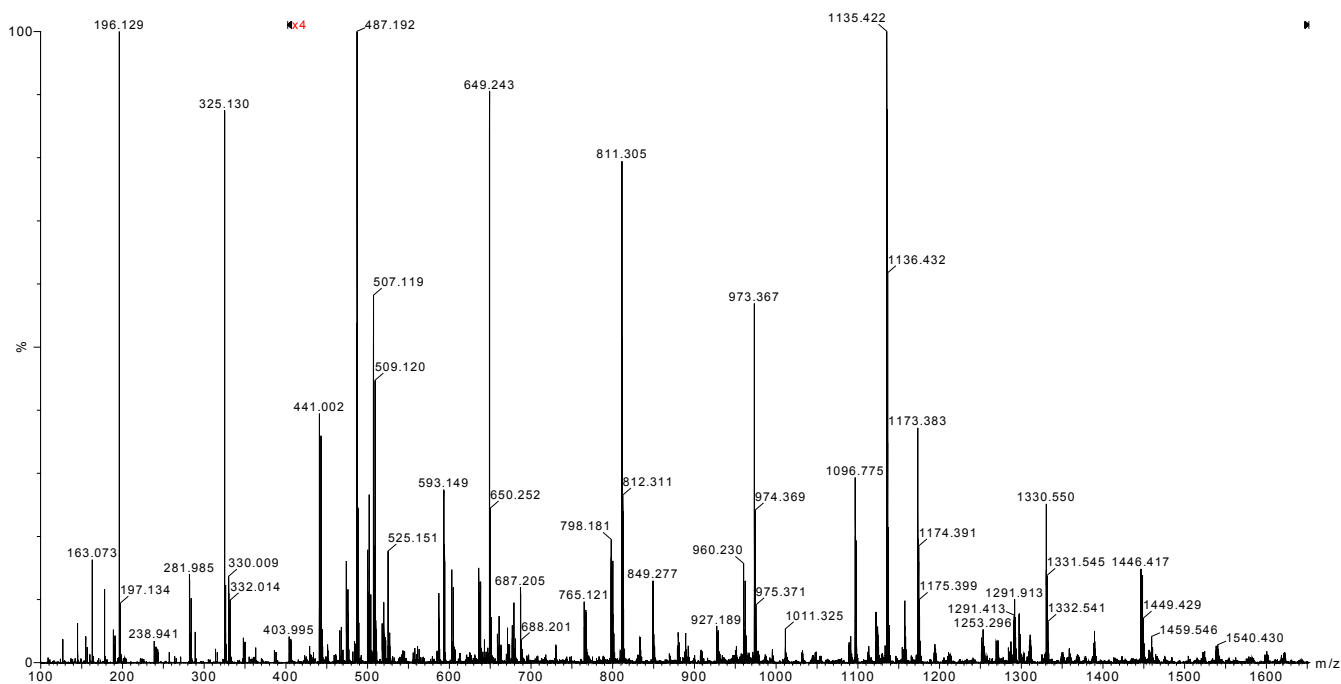
**TABELA 5** Valores de osmolaridade (mOsm) determinados para soluções de AM, de  $\beta$ -CD e da mistura AM +  $\beta$ -CD. Valores de osmolaridade obtidos de soluções de AM (35 mM de Sb), de CD (35 mM) e da mistura AM (35 mM de Sb) +  $\beta$ -CD (35 mM), após incubação por 48 hs, à 55°C (média  $\pm$  DP, n=3).

Composto	Osmolaridade (mOsm)
AM	58,3 mOsm ( $\pm$ 0,6)
$\beta$ -CD	50 mOsm ( $\pm$ 3)
AM/ $\beta$ -CD	69 mOsm ( $\pm$ 1)

Observa-se que a soma das osmolaridades das soluções de AM e de  $\beta$ -CD é superior à osmolaridade da solução AM +  $\beta$ -CD, indicativo da existência de uma associação entre o AM e a  $\beta$ -CD.

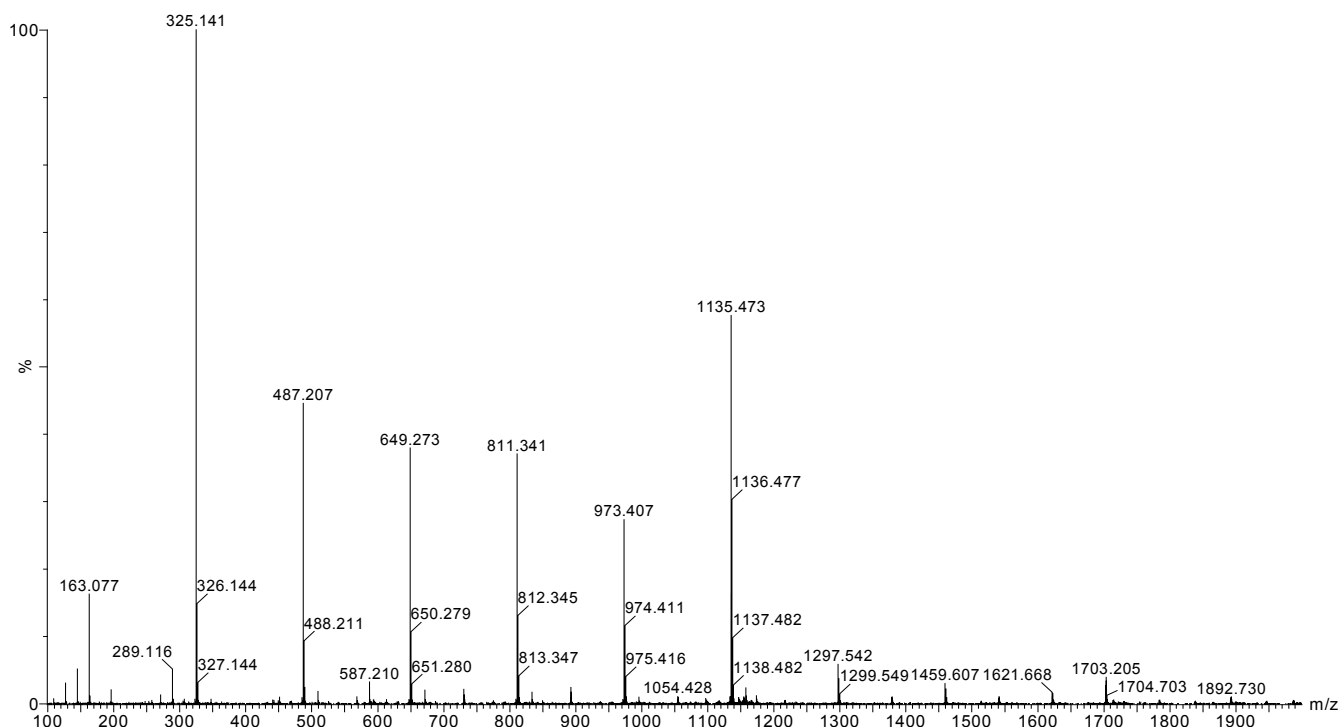
#### I.1.3.2. Caracterização da mistura AM/ $\beta$ -CD por ESI-MS

A **FIGURA 16** mostra o espectro ESI(+)-MS obtido com a mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD preparada em água e previamente aquecido por 48 horas.



**FIGURA 16** Espectro de massa ESI(+)-MS da mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD em TFA 0,1% (p/v).

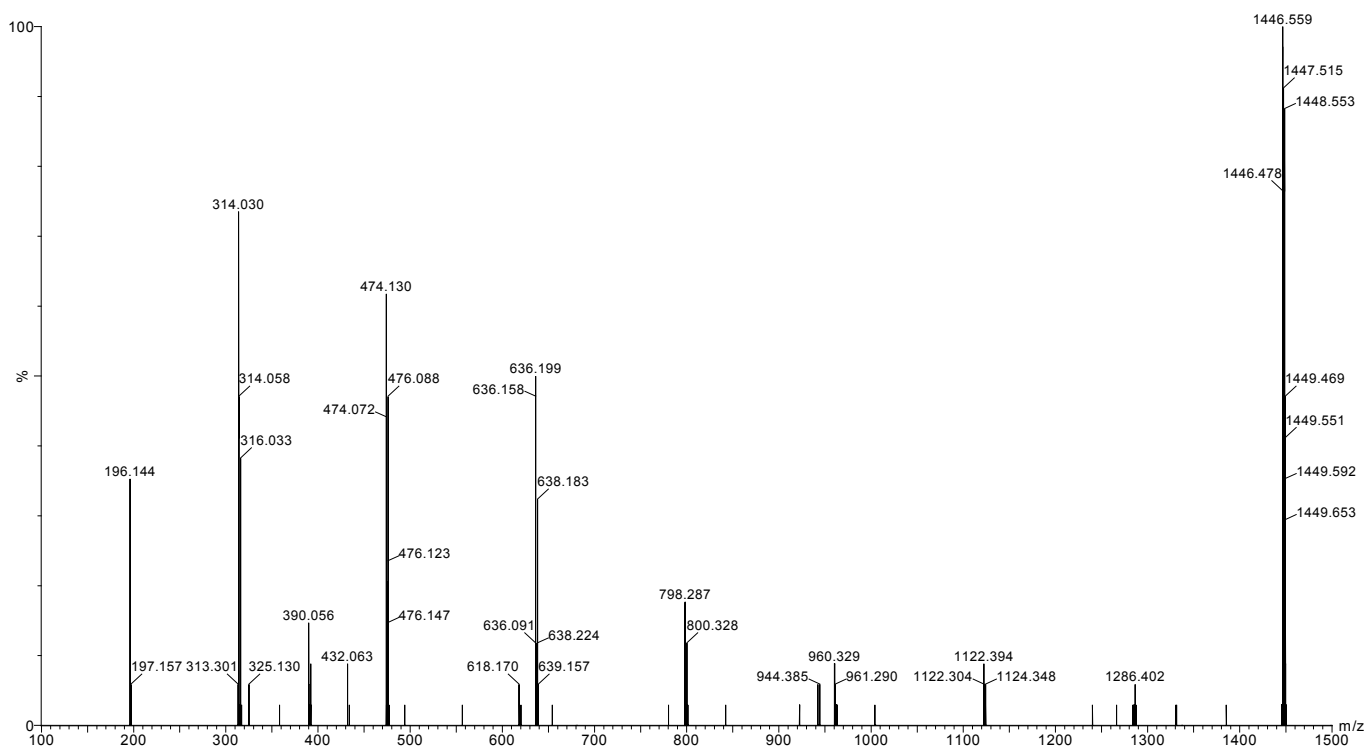
Podem ser identificados os picos referentes aos íons de  $m/z$  507, 500, 330 e 196, característicos do AM na forma livre (**TABELA 1**), e os picos referentes aos íons de  $m/z$  1135, 973, 811, 649, 487, 325 e 163, característicos da  $\beta$ -CD livre (**FIGURA 17**).



**FIGURA 17** Espectro de massa ESI(+)-MS da  $\beta$ -CD em TFA 0,1% (p/v).

Novas espécies monovalentes, contendo um átomo de Sb, foram identificadas em  $m/z$  1446, 1122, 960, 798, 636 e 474.

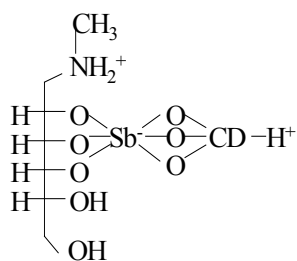
A fragmentação da espécie 1446 por dissociação induzida por colisão (CID), cujo espectro é mostrado na **FIGURA 19**, resultou no aparecimento dos complexos de Sb 474, 636, 798, 960 e 1122, indicando que estas espécies derivam do íon  $m/z$  1446, a partir da perda gradativa de unidades de glicose ( $m/z$  162). O aparecimento dos maiores picos em 314 e 196 comprova que a espécie de  $m/z$  1446 é um complexo ternário de Sb, composto por dois ligantes diferentes: uma molécula de NMG e uma molécula de  $\beta$ -CD.



**FIGURA 18** Espectro de massa ESI(+)-MS resultante da fragmentação da espécie de  $m/z$  1446 (CID) na mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD.

A fórmula estrutural proposta para a espécie 1446 é mostrada na

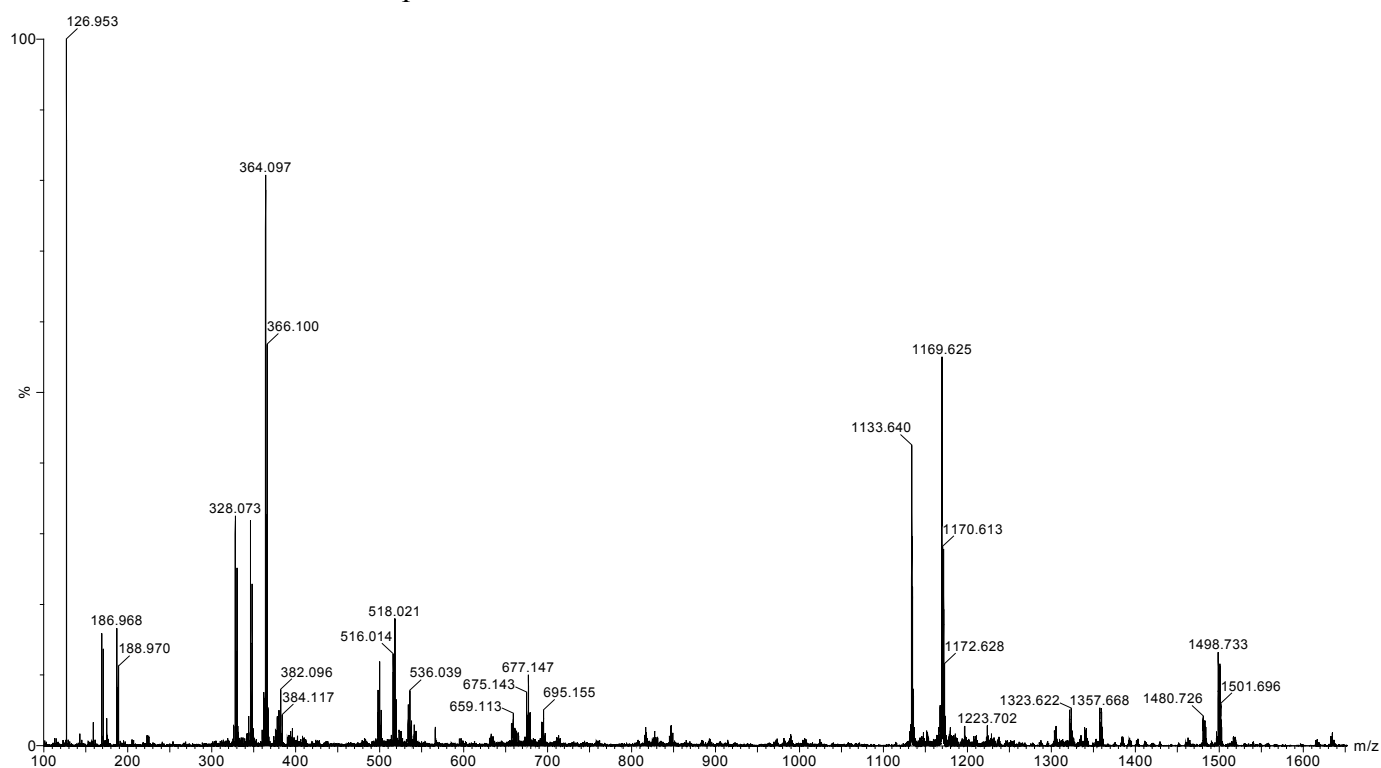
**FIGURA 19.**



$m/z$  1446

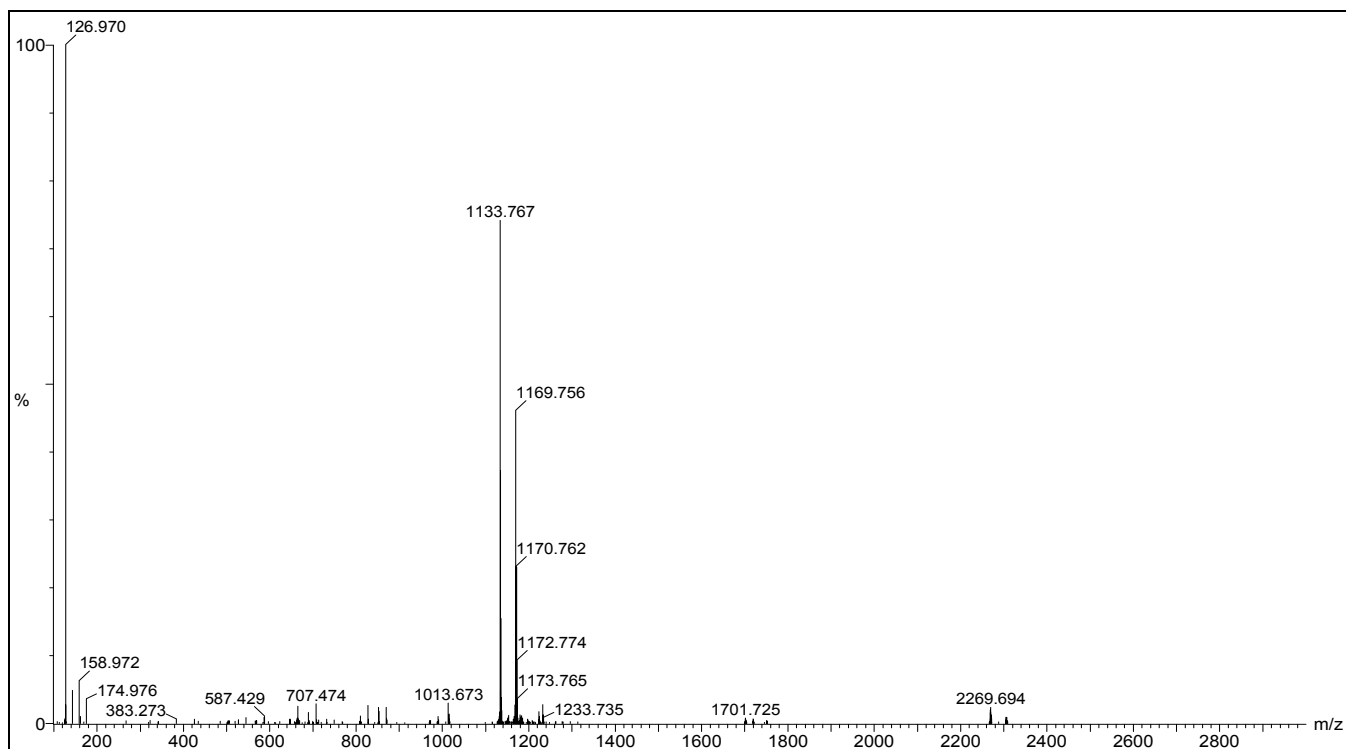
**FIGURA 19** Estrutura proposta para a espécie de  $m/z$  1446 identificada na mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD por ESI(+)-MS.

As **FIGURAS 20 e 21** mostram os espectros ESI(-)-MS obtidos com a mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD e a  $\beta$ -CD, preparadas água, respectivamente.



**FIGURA 20** Espectro de massa ESI(-)-MS da mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD em água.

Podem ser identificados os picos referentes à presença do AM livre ( $m/z$  328, 346, 364, 498, 516, 657, 675, 693, 827 e 845) (**TABELA 2**) e da  $\beta$ -CD livre ( $m/z$  1134 e 1170) (**FIGURA 23**).



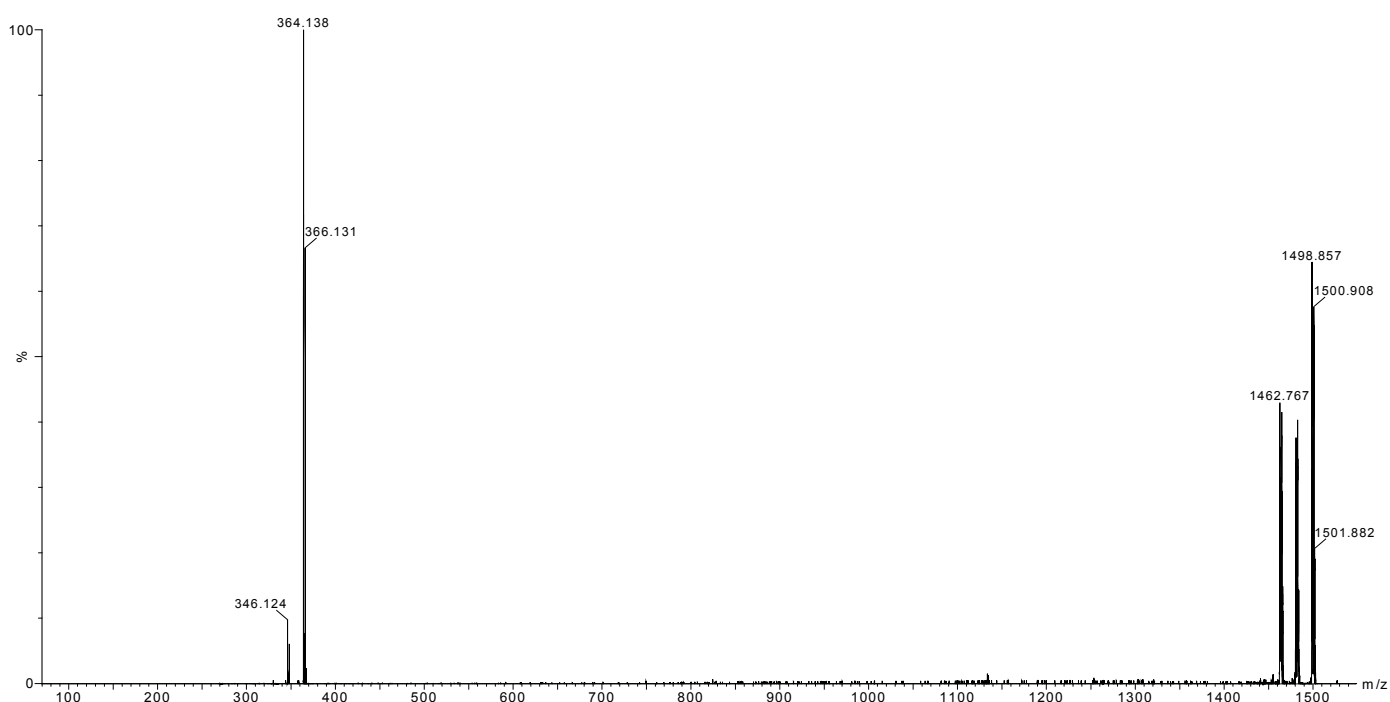
**FIGURA 21** Espectro de massa ESI(-)-MS da  $\beta$ CD, em água.

Novas espécies contendo um átomo de Sb foram identificadas em  $m/z$  1499, 1481, 1463, 1358, 1340, 1322 e 1304. Essas novas espécies identificadas são apresentadas na **TABELA 6**.

**TABELA 6 Complexos Sb- $\beta$ -CD identificados no espectro ESI(-)-MS da mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD. O valor de  $m/z$  de cada espécie indicado foi aquele correspondente ao primeiro pico do grupo isotópico**

Espécies Iônicas	$m/z$
$[(\text{NMG})(\text{CD})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_2-5\text{H}]^- + \text{H}_2\text{O}$	1499
$[(\text{NMG})(\text{CD})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_2-5\text{H}]^-$	1481
$[(\text{NMG})(\text{CD})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})-5\text{H}]^-$	1463
$[(\text{CD})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_4-2\text{H}]^- + 2 \text{H}_2\text{O}$	1358
$[(\text{CD})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_4-2\text{H}]^- + \text{H}_2\text{O}$	1340
$[(\text{CD})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_4-2\text{H}]^-$	1322
$[(\text{CD})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})(\text{OH})_2-2\text{H}]^-$	1304

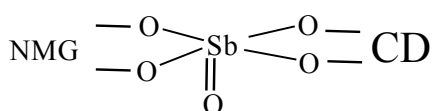
A fragmentação da espécie em  $m/z$  1499 por CID, cujo espectro é mostrado na **FIGURA 22**, resultou no aparecimento do íon em  $m/z$  364, confirmando que a espécie em  $m/z$  1499 é um complexo ternário NMG-Sb-CD.



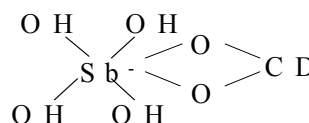
**FIGURA 22 Espectro de massa ESI(-)-MS resultante da fragmentação (CID) da espécie de  $m/z$  1499 na mistura equimolar AM+ $\beta$ -CD.**

Deve-se ressaltar que complexos Sb-β-CD foram também identificados, sugerindo que uma parte do AM se dissocia, liberando Sb e NMG.

A **FIGURA 23** mostra as fórmulas estruturais propostas para as espécies em 1463 e 1322.



*m/z* 1463



*m/z* 1322

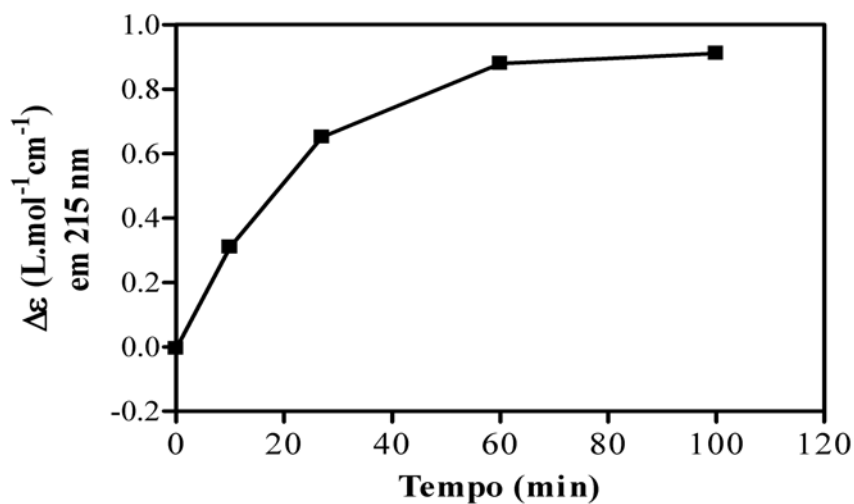
**FIGURA 23** Estruturas propostas para as espécies de *m/z* 1463 e 1322 identificadas na mistura equimolar AM+β-CD por ESI(-)-MS.

#### I.1.3.3. Estudo da interação por dicroísmo circular (DC)

Já foi previamente demonstrado que o antimoniato de potássio reage com o NMG, em solução aquosa, a 60°C, resultando na formação do AM (DEMICHELI et al., 2003)

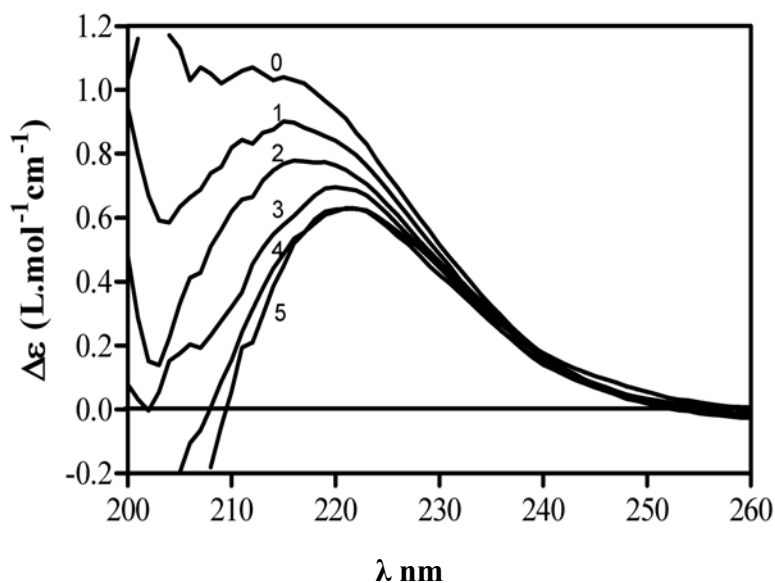
Foi observado que o antimoniato absorve luz no ultra-violeta (UV) em comprimento de onda inferior a 250 nm. Por outro lado, o antimoniato de potássio não mostra sinal de DC na região de λ 200-250 nm.

Como mostrado na **FIGURA 25**, a incubação do antimoniato de potássio com NMG, a 60°C, leva ao aparecimento de uma banda característica de DC, centrada em  $\lambda 215$  nm.



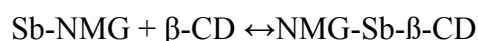
**FIGURA 24** Cinética de aparecimento de um sinal característico de dicroísmo circular, centrada em 215 nm, após incubação do antimoniato de potássio com NMG, a 60°C.

A existência deste sinal de DC foi em seguida explorada para o estudo da interação do AM com a  $\beta$ -CD. Como mostrado na **FIGURA 25**, a adição de  $\beta$ -CD à solução de AM, e a incubação dessa mistura por 90 min, a 60°C, resulta em decréscimo na intensidade do sinal de DC do AM, cuja magnitude aumenta com o aumento da relação  $\beta$ -CD/AM.



**FIGURA 25** Titulação do AM com  $\beta$ -CD, a  $60^\circ\text{C}$ , por dicroísmo circular. AM (Sb 10 mM) foi incubado por 90 min, a  $60^\circ\text{C}$ , na presença de  $\beta$ -CD, em concentração crescente (0:0 mM; 1:10 mM; 2:20 mM; 3:30 mM; 4:40 mM; 5:50 mM).

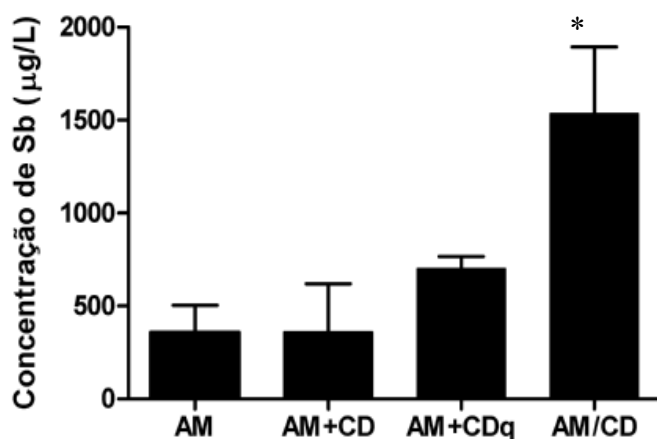
Assumindo-se que o AM consiste essencialmente de um complexo Sb-NMG de estequiometria 1:1, nessa temperatura, e que forma-se essencialmente um complexo ternário NMG-Sb- $\beta$ -CD, de acordo com a equação:



Utilizando os valores do  $I_0$  a 220 nm da **FIGURA 24** assim como a equação (1) (página 48), foram determinadas as concentrações  $[\text{AM}/\beta\text{-CD}]$  e  $[\text{AM}]$  para as diferentes concentrações de  $\beta$ -CD. Utilizando a equação (2) (página 60) e os valores das concentrações  $[\text{AM}/\beta\text{-CD}]$  e  $[\text{AM}]$ , foi realizada uma regressão linear passando pelo zero. A inclinação da reta forneceu a constante de estabilidade para o complexo ternário, cujo valor foi:  $K = 104 \pm 24 \text{ L mol}^{-1}$ .

#### I.1.4. Influência da interação do AM com a $\beta$ -CD sobre o nível de absorção oral de Sb

A **FIGURA 26** mostra as concentrações de Sb em soro de camundongos SWISS, 3 horas após a administração por via oral de diferentes preparações do AM: solução de AM em água, a 25°C (0,05 mol/L de Sb) (AM); mistura equimolar de AM +  $\beta$ -CD em água, a 25°C (0,05 mol/L de Sb) (AM+CD); mistura equimolar de AM +  $\beta$ -CD em água, a 25°C (0,05 mol/L de Sb) previamente aquecida por 48 horas, a 55°C (AM+CDq); composição AM/ $\beta$ -CD em água, a 25°C (0,05 mol/L de Sb). Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de Sb alcançados a partir do AM, das misturas equimolares de AM e  $\beta$ -CD aquecidas e não aquecidas. Por outro lado, para a composição AM/ $\beta$ -CD, a concentração de Sb no soro foi significativamente maior naquela submetida ao processo de liofilização, indicativo de que a liofilização da mistura AM/ $\beta$ -CD contribui de forma importante para a promoção da absorção oral do Sb.



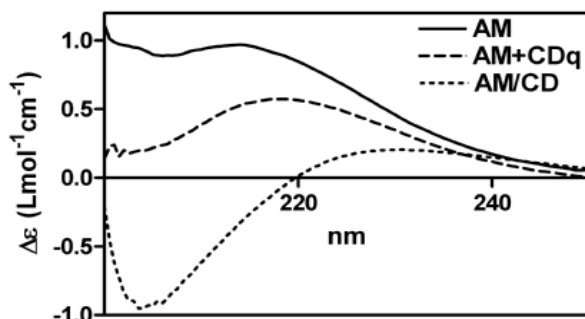
**FIGURA 26** Concentrações de Sb em soro de camundongos SWISS, 3 horas após a administração por via oral de diferentes preparações do AM (100 mg/Kg peso corporal). Preparações: solução de AM em água, a 25°C (0,05 mol/L de Sb) (AM); mistura equimolar de AM +  $\beta$ -CD em água, a 25°C (0,05 mol/L de Sb) (AM+CD); mistura equimolar de AM +  $\beta$ -CD em água, a 25°C (0,05 mol/L de Sb) previamente aquecida por 48 horas, a 55°C (AM+CDq); composição AM/ $\beta$ -CD em água, a 25°C (0,05 mol/L de Sb). Os dados são mostrados como média  $\pm$  DP (n=4). \*Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre a composição AM/CD e os outros grupos ( $p < 0,01$ ) (One-Way ANOVA seguido por Tukey's Post Test).

## I.2. Influência da etapa de liofilização nas características físico-químicas da composição AM/ $\beta$ -CD

### I.2.1. Caracterização por dicroísmo circular (DC)

A fim de se avaliar o efeito da liofilização no estado físico-químico da composição AM/ $\beta$ -CD, o espectro de DC de uma mistura equimolar AM + CD em água (previamente aquecida por 48 horas a 55°C), foi comparado com aquele da composição AM/ $\beta$ -CD em água (aquecida e submetida ao processo de liofilização). Como mostrado na **FIGURA 27**, a liofilização promoveu alterações importantes no espectro DC da mistura AM +  $\beta$ -CD, com aparecimento de uma banda negativa centrada em 205 nm. Além disso, para a forma liofilizada, foi observada uma maior alteração no sinal

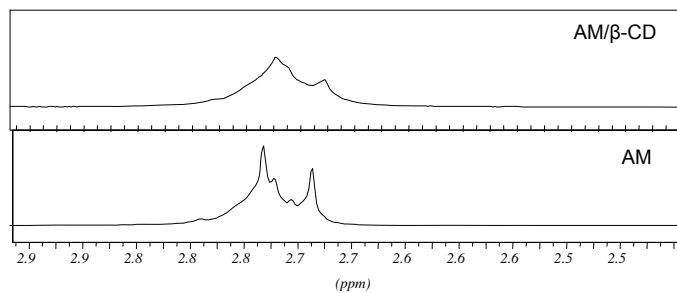
de DC do AM, indicativo de que a liofilização modifica as características físico-químicas daquela composição.



**FIGURA 27** Espectros de dicroísmo circular de preparações de AM, mistura equimolar de AM + β-CD em água e composição AM/β-CD (aquecida e liofilizada), na concentração de Sb 0,01 mol/L. Preparações: AM em água a 25°C (0,05 mol/L de Sb) (—); mistura equimolar de AM + β-CD em água (0,05 mol/L de Sb) a 25°C, previamente incubada, por 48 horas, a 55°C (---); composição AM/β-CD (aquecida e liofilizada), imediatamente após reconstituição em água a 25°C (0,05 M de Sb) (.....). As soluções foram diluídas para a concentração de Sb de 0,01 mol/L pouco antes da medição.

### I.2.2. Caracterização por RMN de hidrogênio

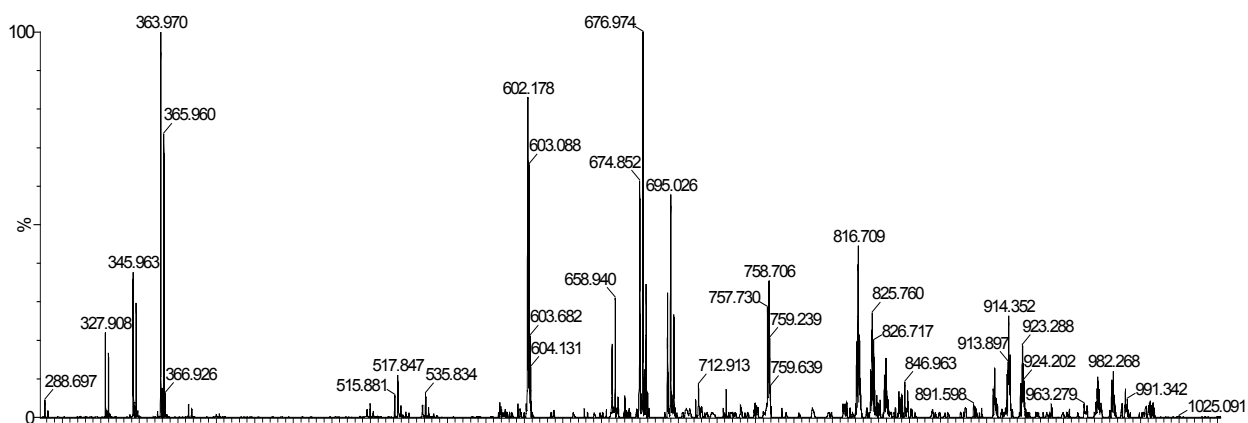
As mudanças no estado físico-químico da mistura AM + β-CD induzidas pela liofilização foram também evidenciadas por RMN<sup>1</sup>H. A **FIGURA 28** mostra a região referente ao sinal dos prótons do grupo metil do AM, na composição AM/β-CD e no AM em D<sub>2</sub>O. No caso da composição AM/β-CD, observa-se picos alargados e menos definidos, sugerindo uma alteração no T<sub>2</sub>, presumidamente por causa da presença de estruturas de maior tamanho.



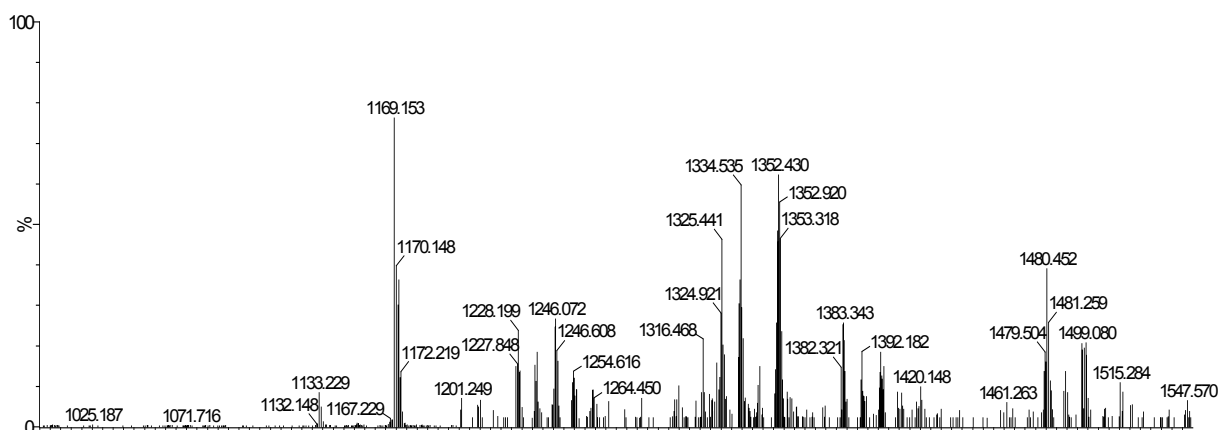
**FIGURA 28** Região do espectro de RMN<sup>1</sup>H da composição AM/β-CD e do AM, em D<sub>2</sub>O, correspondente aos hidrogênios do grupo metil da meglumina.

### 1.2.3. Caracterização da composição AM/β-CD por ESI-MS

A composição AM/β-CD (submetida aos processos de aquecimento e de liofilização) foi analisada por ESI(-)-MS, imediatamente depois da sua reconstituição em água. O espectro ESI(-)-MS obtido, quando comparado ao espectro da mistura AM + β-CD não liofilizada (**FIGURA 21**), mostra novos complexos Sb-β-CD. As **FIGURAS 29** e **30** apresentam os espectros ESI(-)-MS na faixa de m/z 200-1000 e de 1000-1500, respectivamente.



**FIGURA 29** Espectro de massa ESI(-)-MS da composição AM/ $\beta$ -CD (submetida aos processos de aquecimento e de liofilização), em água, na faixa de  $m/z$  200-1000.



**FIGURA 30** Espectro de massa ESI(-)-MS da composição AM/ $\beta$ -CD (submetida aos processos de aquecimento e de liofilização), em água, na faixa de  $m/z$  1000-1500.

A **TABELA 7** apresenta os principais complexos Sb- $\beta$ -CD identificados. Enquanto complexos monovalentes eram encontrados na mistura AM +  $\beta$ -CD (**TABELA 6**), complexos diferentes são identificados na composição AM/ $\beta$ -CD. Além disso, complexos de maior massa molar são observados na composição liofilizada.

Esses resultados indicam que um grau maior de associação entre o AM e  $\beta$ -CD foi induzida pela liofilização, o que pode explicar as alterações importantes observadas no espectro de dicroísmo circular da composição AM/ $\beta$ -CD, após liofilização.

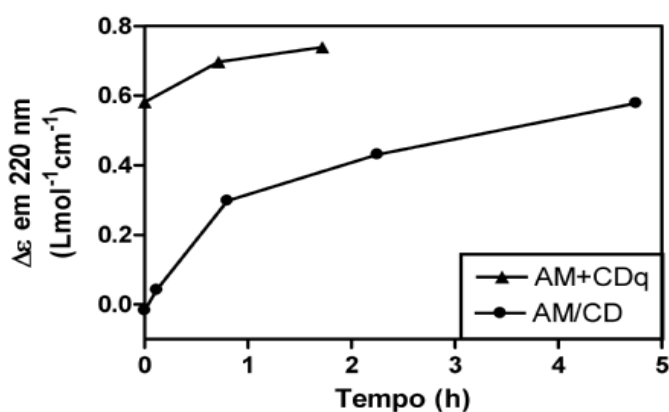
**TABELA 7 Complexos Sb- $\beta$ -CD identificados em ESI(-)-MS para a composição AM/ $\beta$ -CD 1:1 liofilizada.** O valor de  $m/z$  de cada espécie indicado foi aquele correspondente ao primeiro pico do grupo isotópico

<b>Complexos Sb-<math>\beta</math>-CD</b>	<i>m/z</i>
$[\text{CD}(\text{Sb})_2(\text{O})_4(\text{K})_2 - 4\text{H}]^{2-}$	757
$[\text{CD}(\text{NMG})(\text{Sb})_2(\text{OH})_4 - 9\text{H}]^{2-}$	816
$[\text{CD}(\text{NMG})(\text{Sb})_2(\text{OH})_4 - 9\text{H}]^{2-} + \text{H}_2\text{O}$	825
$[\text{CD}(\text{NMG})(\text{Sb})_2(\text{OH})_4 - 9\text{H}]^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$	836
$[\text{CD}(\text{NMG})_2(\text{Sb})_2(\text{OH})_3 - 11\text{H}]^{2-}$	904
$[\text{CD}(\text{NMG})_2(\text{Sb})_2(\text{OH})_3 - 11\text{H}]^{2-} + \text{H}_2\text{O}$	913
$[\text{CD}(\text{NMG})_2(\text{Sb})_2(\text{OH})_3 - 11\text{H}]^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$	922
$[\text{CD}(\text{NMG})(\text{Sb})(\text{OH})_2 - 5\text{H}]_2^{2-}$	1479
$[\text{CD}(\text{NMG})(\text{Sb})(\text{OH})_2 - 5\text{H}]_2^{2-} + \text{H}_2\text{O}$	1488
$[\text{CD}(\text{NMG})(\text{Sb})(\text{OH})_2 - 5\text{H}]_2^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$	1497

### I.3. Cinética de liberação do AM a partir da composição AM/ $\beta$ -CD

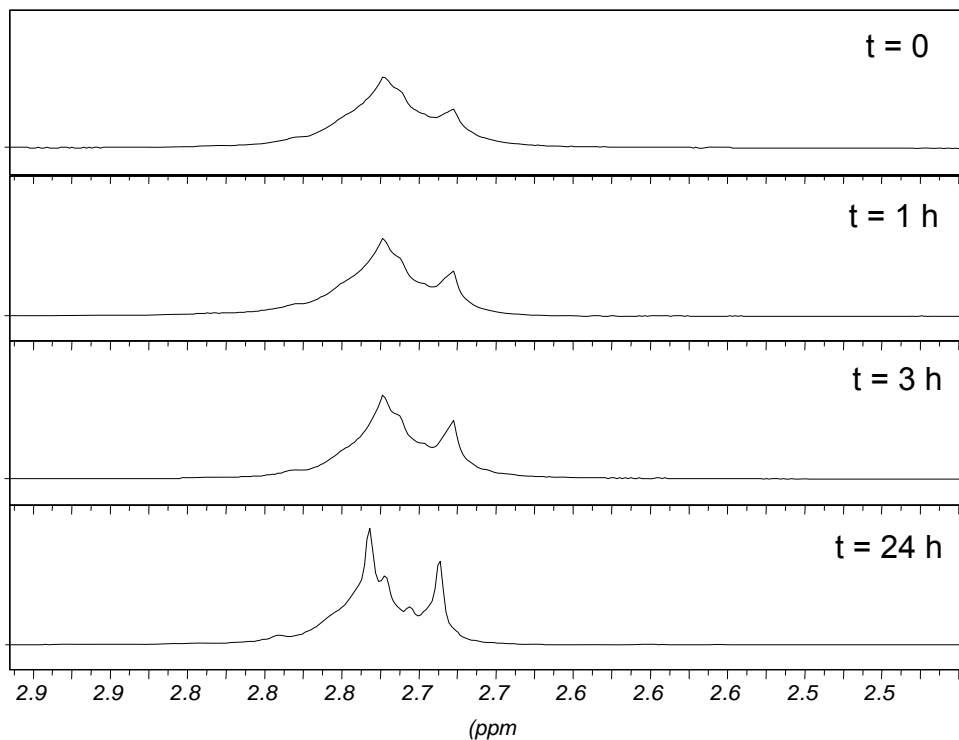
A **FIGURA 31** mostra as cinéticas de variação do sinal de DC no  $\lambda$  220 nm, a 25°C, de soluções da mistura equimolar AM +  $\beta$ -CD pré-aquecida, após diluição da concentração 0,05 a 0,01 mol/L de Sb. No caso da forma liofilizada, observa-se uma cinética bifásica, com uma fase inicial rápida nas

primeiras duas horas, e uma segunda fase mais lenta. Pode-se observar ainda, para a forma liofilizada, que, ao final das 5 hs, permanece ainda uma fração do AM no estado associado. Depois de 24 hs, um espectro DC característico do AM é observado, indicando uma dissociação completa da composição AM/ $\beta$ -CD a favor do AM.



**FIGURA 31** Cinéticas de variação do sinal de DC, no  $\lambda$  220 nm, a 25°C, após preparações da mistura AM +  $\beta$ -CDq pré-aquecida e da composição AM/ $\beta$ -CD em água, na concentração de Sb 0,01 mol/L. A mistura AM +  $\beta$ -CD foi preparada por diluição de uma solução 0,05 mol/L de Sb na concentração de 0,01 mol/L.

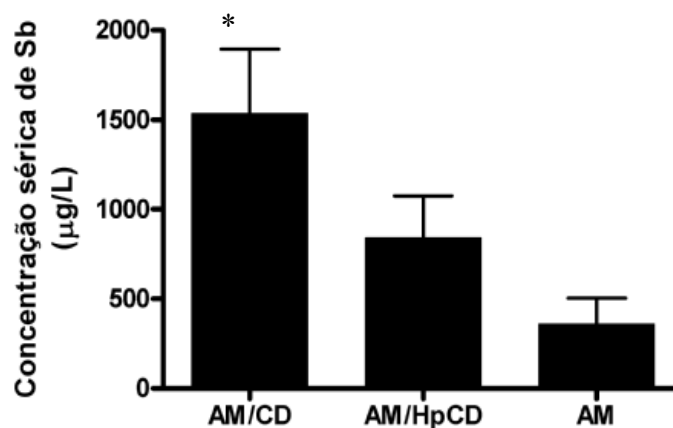
A **FIGURA 32** mostra as mudanças ocorridas no sinal RMN dos hidrogênios do grupo metil da NMG, em função do tempo, que confirmam a dissociação da composição AM/ $\beta$ -CD a favor do AM.



**FIGURA 32** Região do espectro de RMN<sup>1</sup>H da composição AM/β-CD em D<sub>2</sub>O, correspondente aos sinais de hidrogênios do grupo metil do AM, em diferentes tempos após preparação na 0,01 mol/L de Sb.

#### I.4. Influência da forma química da ciclodextrina na absorção oral de Sb

Devido à baixa solubilidade da β-CD, o que representa uma limitação no desenvolvimento de formulação farmacêutica, foi avaliado um derivado mais solúvel: a 2'-hidroxipropil-β-CD (Hpβ-CD). A **FIGURA 33** compara os níveis de Sb alcançados no soro de camundongos, três horas após administração oral da composição AM/Hpβ-CD com aqueles da composição AM/β-CD e do AM. A composição AM/Hpβ-CD promoveu um nível significativamente menor de Sb quando comparada à composição AM/β-CD, sugerindo que aquela não é tão eficaz na promoção da absorção de Sb por via oral.



**FIGURA 33** Concentrações de Sb em soro de camundongos SWISS, 3 horas após a administração por via oral de diferentes preparações do AM na dose de 100 mg/Kg peso corporal. Preparações: solução de AM em água, a 25°C (0,05 mol/L de Sb) (AM); composição AM/ $\beta$ -CD em água, a 25°C (0,05 mol/L de Sb) (AM/CD); composição AM/Hp $\beta$ -CD em água, a 25°C (0,05 mol/L de Sb) (AM/Hp $\beta$ -CD). Os dados são mostrados como média  $\pm$  DP (n=4). \*Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre a composição AM/CD e os outros grupos ( $p < 0,01$ ) (One-Way ANOVA seguido por Tukey's Post Test).























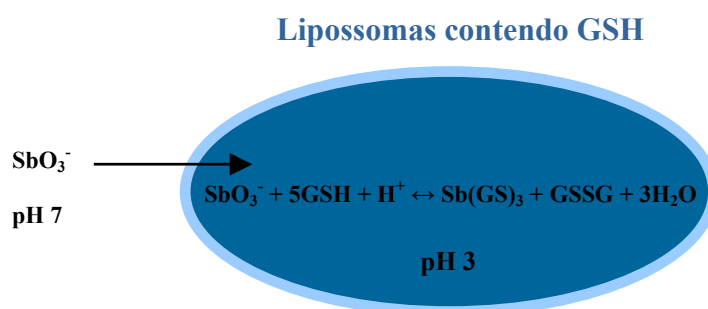
### III.1. Concepções e validação do modelo lipídico de membrana

#### II.1.1. Conceitos básicos

Um sistema-modelo foi concebido, a fim de que um estudo de permeação de antimoniais pentavalentes através de membranas lipídicas de composição controlada fosse realizado.

Este sistema consiste em lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina natural (PC) contendo a glutathiona reduzida (GSH) em seu interior, em elevada concentração (0,3 M) e meio ácido (pH 3). Como ilustrado na **FIGURA 41**, quando um antimomial pentavalente, como o  $\text{SbO}_3^-$  é incubado em presença desses lipossomas, o composto penetra no compartimento aquoso interno dos lipossomas, sob influência do gradiente

de concentração e sofre, logo em seguida, uma redução do estado de oxidação +5 para o estado de oxidação +3 (Sb(III)), de acordo com a reação descrita por FRÉZARD et al, 2001:



**FIGURA 41** Permeação do Sb(V) em modelo lipídico de membrana, a partir de lipossomas contendo GSH em seu interior.  $\text{SbO}_3^-$ : forma solúvel predominante do Sb(V); GSH: forma reduzida da glutatona; GSSG: forma oxidada da glutatona;  $\text{Sb}(\text{GS})_3$ : complexo entre Sb(III) e GSH.

A ocorrência dessa reação de oxi-redução tem duas implicações: Em primeiro lugar, o gradiente de concentração de Sb(V) seria mantido, com uma concentração intravesicular muito baixa. Em segundo lugar, a concentração de Sb(III) e sua cinética de aparecimento poderiam ser determinadas por ensaio colorimétrico simples, como descrito no item 3.2.5.2. Neste sistema, a escolha de uma concentração elevada de GSH e de um pH ácido tem por objetivo garantir uma elevada velocidade de reação para a reação de oxi-redução, permitindo que a etapa limitante dessa reação seja a permeação de Sb(V) através da membrana. Nesse

contexto, admite-se que a cinética de aparecimento de Sb(III) corresponde à cinética de permeação do Sb(V).

Assim, para a validação deste sistema-modelo, foi necessário avaliar:

- 1- se a redução do Sb(V) a Sb(III) ocorre apenas no compartimento intravesicular
- 2- se a etapa limitante da reação de oxi-redução é a permeação do Sb(V)

### III.1.2. Avaliação da velocidade da reação de redução do Sb(V) a Sb(III) pela GSH

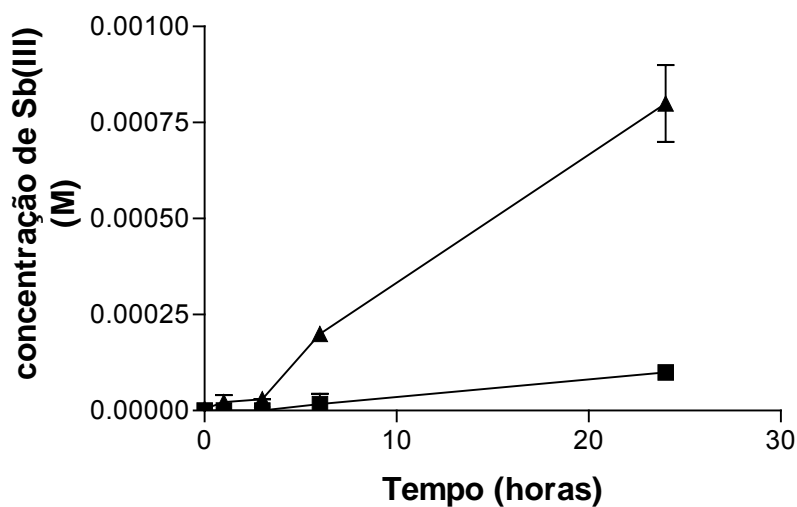
A incubação do antimoniato de potássio 20 mM, com GSH 0,3 M, pH 3 (a 37°C), mostrou uma redução completa e imediata do Sb(V) (em tempo inferior a 1 minuto) (dados não mostrados).

Considerando-se que o Sb(V), nos demais compostos testados neste modelo, encontra-se complexado a diferentes ligantes, foi avaliada a influência do estado de complexação do Sb(V) (AM e composições AM/ $\beta$ -CD nas relações molares 1:1 e 7:1) na velocidade de redução.

Para o AM incubado na concentração de Sb 20 mM em presença de GSH 0,3 M, pH 3, foi observada uma redução completa e imediata do Sb(V) (em tempo inferior a 1 minuto), tal como observado para o antimoniato. Para a composição AM/ $\beta$ -CD, a completa redução do Sb(V) se deu num tempo de 15-30 minutos.

### III.1.3. Avaliação do local de redução do Sb(V)

O antimoniato de potássio foi incubado, a 37°C, na concentração de 20 mM, na presença de lipossomas PC encapsulando GSH. A **FIGURA 42** mostra as cinéticas de aparecimento de Sb(III), na suspensão total (amostra tratada com TritonX-100 6%, no momento da medição, para a abertura dos lipossomas) e no meio externo (amostra não tratada com TritonX-100). Observa-se que a concentração de Sb(III) nas amostras tratadas com TritonX-100 foi aproximadamente 8 vezes maior, quando comparada à concentração de Sb(III), nas amostras não tratadas. Esses resultados indicam que a maior parte do Sb(III) encontra-se no compartimento interno dos lipossomas.



**FIGURA 42** Cinéticas de aparecimento de Sb(III) no meio extravascular (■) e na suspensão total (▲), à 37°C e pH 7, para o antimoniato de potássio (20 mM), em presença de lipossomas PC de soja (18 mM). A concentração de Sb(III) na suspensão total foi determinada pela adição de TritonX-100 6% na amostra, imediatamente antes da medição. A concentração de Sb(III) extravascular foi determinada na amostra não tratada com TritonX-100. Os dados mostram as médias  $\pm$  desvio padrão (n = 3).

### III.1.4. Interferência da $\beta$ -CD na integridade da membrana dos lipossomas

Estudos prévios demonstraram a habilidade das CDs em removerem componentes lipídicos de membranas celulares, pela formação de complexos de inclusão com lipídeos (UEKAMA & OTAGIRI, 1987; FOUVELLE et al., 1997; DEBOUZY et al., 1998; NISHIJO & MIZUNO, 1998). Neste contexto, foi avaliada a interferência da  $\beta$ -CD na integridade da membrana dos lipossomas.

Lipossomas de PC encapsulando a sonda fluorescente calceína foram incubados na ausência ou na presença de  $\beta$ -CD, seja na forma livre ou na forma associada ao AM, nas relações molares 1:1 ou 7:1. A **TABELA 11** mostra as frações de calceína liberada dos lipossomas, após 1h de incubação, a 37°C.

Esses dados mostram que a  $\beta$ -CD não interferiu na integridade da membrana avaliada, permitindo inferir que a permeação observada para as composições AM/ $\beta$ -CD no modelo proposto se deu na presença de membrana lipossomal intacta.

**TABELA 12** % calceína liberada de lipossomas PC (50 mM), após 6 hs de incubação, a 37°C, na ausência (solução controle PBS ou solução de AM com 20 mM de Sb) ou na presença de  $\beta$ -CD (20 mM), pura ou associada ao AM, nas relações molares Sb/CD 1:1 ou 7:1. Os dados mostram as médias  $\pm$  desvio padrão (n = 3)

Composto	% de calceína liberada em 6hs
Controle	0,30 ( $\pm$ 0,20)
CD	-0,03 ( $\pm$ 0,23)
AM	0,17 ( $\pm$ 0,06)
AM/CD (1:1)	-0,10 ( $\pm$ 0,26)
AM/CD (7:1)	0,17 ( $\pm$ 0,12)

### III.1.5. Determinação das concentrações de GSH nos compartimentos interno e externo dos lipossomas

Após encapsulação da GSH em lipossomas de PC de soja e eliminação do GSH não encapsulado por filtração em gel, a suspensão de lipossomas foi caracterizada do ponto de vista das suas concentrações do tiol GSH nos compartimentos externo e interno dos lipossomas e da concentração do lipídeo PC.

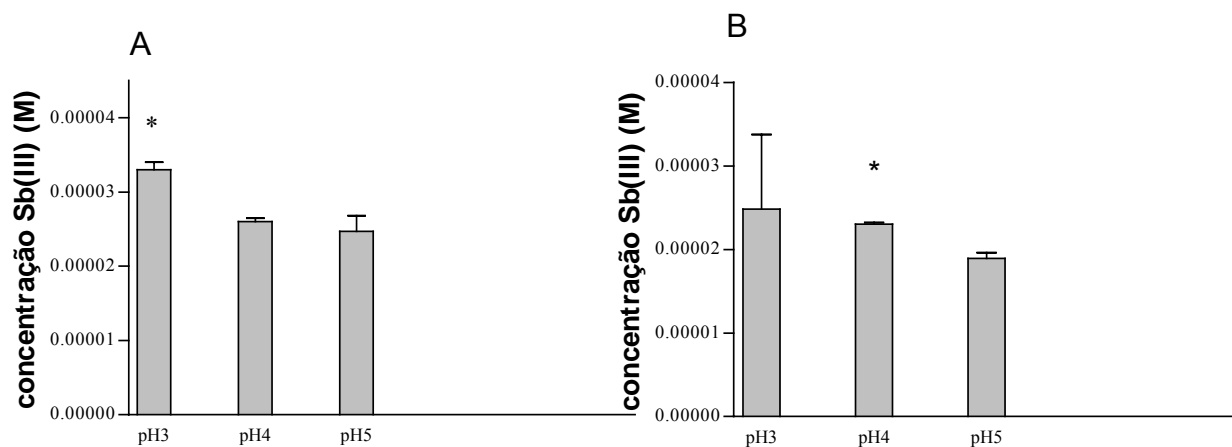
A dosagem de tiol forneceu a concentração de  $8,8 \pm 2$  mM e a de lipídeo o valor de 18 mM (14 g/L), a partir desses dados, pôde-se calcular a relação  $\text{tiol/PC} = 0,63 \cdot 10^{-3}$  mol tiol/g lipídeo.

Considerando-se a concentração de GSH de 8,8 mM e a reação de oxi-redução acima descrita, em que um mol de Sb(V) reage com 5 mols de GSH, esse sistema teria a capacidade máxima de redução de 1,7 mM de Sb(V), valor superior a concentração de Sb(V) reduzida no experimento, como se observa na **FIGURA 42**.

### III.1.6. Influência do pH interno e da concentração de GSH interna na velocidade de redução

A **FIGURA 43** mostra as concentrações de Sb(III) produzidas no intervalo de 6 hs, a 37°C, a partir de lipossomas apresentando diferentes valores de pH interno (3, 4, 5) e em pH externo de 7, para o antimoniato e o AM. Observa-se uma

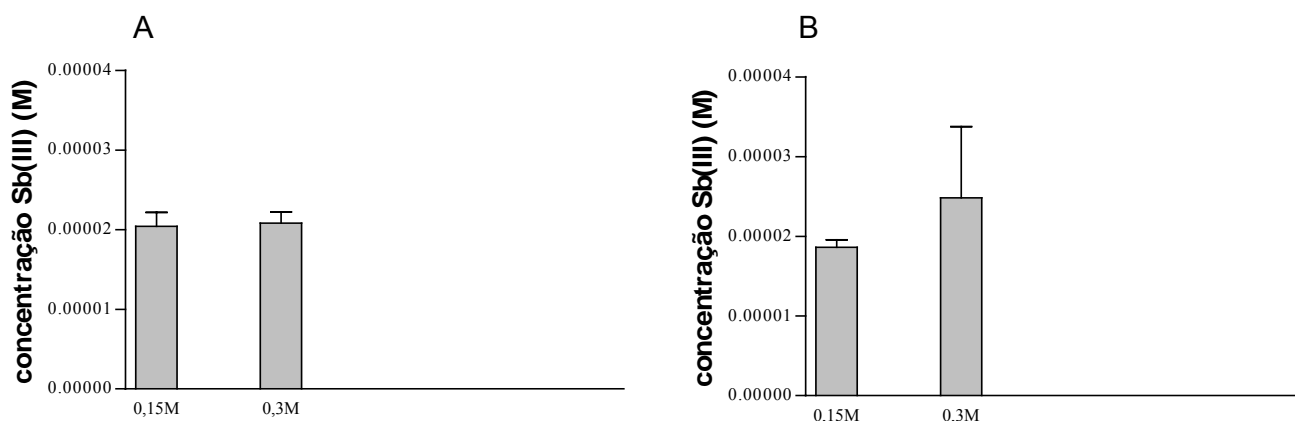
pequena influência do pH sobre a taxa de redução, a de Sb(III) sendo maior em pH 3 do que em pH 5.



**FIGURA 43** Influência do pH intravesicular (3, 4, 5) dos lipossomas de PC, na concentração de Sb(III) produzida no intervalo de 6 hs, a 37°C, a partir do antimoniato (A) e do AM (B), em pH ext = 7. Os dados são mostrados como médias  $\pm$  desvio-padrão n = 3.  $P < 0,05$  para comparação entre pH 5 e pH 3 ou pH 4, no AM (One-way ANOVA, com Tukey post test).

A **FIGURA 44** mostra as concentrações de Sb(III), produzidas no intervalo de 6 hs, a 37°C, a partir de lipossomas de PC contendo diferentes concentrações de GSH interna (0,15 e 0,3 M).

Para o antimoniato e o AM, não foram observadas diferenças significativas na concentração de Sb(III), em diferentes concentrações internas de GSH.



**FIGURA 44** Influência da concentração de GSH (0,15 M ou 0,3 M), na concentração de Sb(III) produzida no intervalo de 6 hs, a 37°C, a partir de preparações de lipossomas PC em presença do antimoniato (A) e do AM (B) ([Sb] = 20 mM, pH ext = 7 e pH int =4). Os dados são mostrados como médias  $\pm$  desvio-padrão.

Esses dados indicam que a velocidade de redução do Sb(V) pelos lipossomas de PC encapsulando a GSH independe da concentração interna de GSH, na faixa 0,15-0,3 M, e do pH interno, na faixa 3-5. Estudos prévios permitiram mostrar que a velocidade de reação da redução do Sb(V) a Sb(III) pelos tióis depende fortemente do pH e da concentração de tiol (FERREIRA et al, 2003; OLIVEIRA et al, 2006). Nesse contexto, a ausência de influência do pH e da concentração de GSH intravesicular na cinética de redução dos antimoniais pentavalentes pelos lipossomas encapsulando a GSH é um argumento a favor da hipótese de que a etapa limitante da redução é a permeação através da membrana lipossomal.





#### III.4. Determinação do coeficiente de permeabilidade do Sb(V) através da bicamada lipídica

Pode-se calcular o fluxo ( $J_s$ ) de soluto, através da membrana lipossomal, pela seguinte expressão:

$$(3) J_s = \frac{1}{s} \cdot \frac{dn}{dt}$$

onde S é a área da membrana e

$$\frac{dn}{dt}$$

é o número de moles de soluto que atravessa a membrana por unidade de tempo. Considerando-se a que toda a fração de Sb(V) permeada para o compartimento interno dos lipossomas é reduzida a Sb(III) pela GSH e que a taxa de Sb(III) encontrada no meio externo seria proveniente da migração do antimônio trivalente para aquele compartimento pela presença de GSH residual nele, tem-se que a concentração de Sb(V) permeado, após 24 horas, corresponde a concentração de Sb(III) obtida na presença de TritonX-100, cujo valor é de  $3,5 \cdot 10^{-4}$  M, em pH 7, como mostra a **FIGURA 45**.

Pode-se deduzir, então, que:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{3,5 \times 10^{-4} \times 10^{-3}}{24 \times 60 \times 60} = 4,05 \cdot 10^{-11} \text{ molis s}^{-1}$$

Sabendo-se que a área ocupada por cabeça polar do lipídeo fosfatidilcolina é de  $55 \text{ \AA}^2$ , ou seja,  $55 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$ , e tendo sido determinada a concentração de lipídeo no experimento (15 mM), para um volume de amostra de 1 mL, a área da superfície externa dos lipossomas é de  $24,8 \cdot 10^3 \text{ cm}^2$ .

Assim, pode-se calcular o fluxo ( $J_s$ ):

$$J_s = \frac{1}{s} \cdot \frac{dn}{dt}$$
$$J_s = \frac{4,05 \cdot 10^{-11} \text{ molis}}{24,8 \cdot 10^3 \text{ s}^1 \text{ cm}^2} = 1,63 \cdot 10^{-15} \text{ molis s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$$

Considerando-se que o  $J_s$  depende da diferença de concentração de soluto entre o meio externo e meio interno e do coeficiente de permeabilidade do soluto através da membrana ( $P_s$ ) e, de acordo com a lei da difusão simples:

$$(4) J_s = P_s \cdot ([Sb(V)]_{\text{externo}} - [Sb(V)]_{\text{interno}})$$

Sendo a concentração de  $Sb(V)$  interna desprezível frente a concentração externa, pode-se escrever  $J_s = P_s [Sb(V)]_{\text{externo}}$ .

Conhecendo-se a concentração externa de  $Sb(V)$ :

$$[Sb(V)]_{\text{externo}} = 20 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1}, \text{ ou seja, } 20 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}.$$

Pode-se determinar o coeficiente de permeabilidade para o antimoniato:

$$P_s = \frac{1,63 \times 10^{-15} \text{ molis s}^{-1} \text{ cm}^{-2}}{20 \times 10^{-6} \text{ molis cm}^{-3}} = 0,82 \times 10^{-10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$$

## DISCUSSÃO

A presente tese contribui para o avanço dos conhecimentos nas seguintes direções:

- 1 - na caracterização físico-química do AM
- 2 - na elucidação dos mecanismos envolvidos no aumento da concentração plasmática de Sb da composição AM/ $\beta$ -CD
- 3 - no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas do AM com potencial para o tratamento oral das leishmanioses

Serão discutidos a seguir os resultados obtidos em cada uma dessas direções.

### **1 - Características físico-químicas do AM**

No presente trabalho, o AM foi caracterizado por espectrometria de massa pela técnica de ionização por eletrodispersão, nos modos positivo e negativo (ESI(+)-MS e ESI(-)-MS).

Os resultados obtidos por ESI(+)-MS e ESI(-)-MS, no presente estudo, confirmaram a existência de uma mistura de complexos Sb-NMG pela identificação dos íons previamente relatados no AM e permitiram identificar novos complexos de estequiometria 1:1, 3:2 e 3:3.

Contudo, as estruturas para os complexos de estequiometria 1:1 e 1:2 foram diferentes daquelas propostas na literatura (ROBERTS et al., 1998), em que as moléculas de NMG apresentariam o grupo amino desprotonado e o Sb carregado positivamente.

Ao contrário, foram considerados resultados prévios de titulação potenciométrica do AM, onde foram identificados dois prótons dissociáveis, um atribuído ao grupo amino da NMG, de  $pK_a = 10,3$ , e outro atribuído ao antimoniato, de  $pK_a = 2,1$ , sendo propostas novas estruturas em que o grupo amino estaria carregado positivamente e o grupo antimoniato carregado negativamente (DEMICHELI et al., 1999). O complexo Sb-NMG 1:1, assim, estaria predominantemente na forma zwitteriônica, em pH fisiológico. Este modelo está de acordo com resultados anteriores de medida de condutividade de solução aquosa do AM, indicando que esse tem comportamento de eletrólito fraco (DEMICHELI et al., 1999).

De fato, a carga negativa do Sb pôde ser identificada pelo aparecimento, em ESI(-)-MS, dos complexos Sb-NMG de estequiometria 1:1 e 1:2 ( $m/z$  364 e 541, respectivamente). Segundo esse modelo, no íon de  $m/z$  507, o grupo amino das duas moléculas de NMG estaria carregado positivamente e o grupo antimoniato carregado negativamente (**FIGURA 5**).

Vale ressaltar que o único complexo Sb-NMG 1:1 identificado previamente (ROBERTS et al., 1998) era a espécie de  $m/z$  314. No presente estudo, a espécie de massa molar 314 foi atribuída a um complexo de Sb trivalente (Sb(III)) e não a um complexo de Sb pentavalente. Essa interpretação mostra-se compatível com dados da literatura em que uma quantidade significativa de Sb(III) foi encontrada nas amostras de AM analisadas (DZAMITIKA et al., 2006). Uma contribuição importante do presente trabalho foi a identificação das espécies de  $m/z$  330, 348, 386 e 404 (modo positivo) e  $m/z$  328, 346 e 364 (modo negativo) consistentes com complexo de Sb(V)-NMG de estequiometria 1:1. Para os complexos observados no modo positivo, foi considerado o grupo amino carregado positivamente e o grupo antimoniato eletricamente neutro, estado de

ionização favorecido pelo uso de condições ácidas ou pela formação de sais de  $K^+$ . Para os complexos observados no modo negativo, foi considerado o grupo amino desprotonado e o grupo antimoniato carregado negativamente.

Sobre a abundância relativa dos íons identificados na solução de AM em água, os dados são controversos. Em ROBERTS et al. (1998), o complexo Sb(V)-NMG de estequiometria 1:2 ( $m/z$  507) foi proposto como a espécie predominante. Considerando-se a média de 2 átomos de Sb por partícula e a relação molar Sb/NMG 1:1, pode-se propor a predominância de complexos Sb-NMG 2:2, 2:3 e 2:1 e uma mistura equimolar de complexos Sb-NMG de estequiometrias 2:3 e 2:1.

Por outro lado, em solução aquosa diluída do AM ou submetida ao aquecimento, a média de 1 átomo de Sb por partícula sugere a predominância de complexo Sb-NMG zwitteriônico de estequiometria 1:1. Foi proposto, portanto, que a abundância aparentemente menor do pico correspondente ao complexo 1:1 se deve ao seu caráter zwitteriônico. Conclui-se assim que avanços significativos foram alcançados na caracterização da estrutura molecular do AM.

## **2 – Mecanismos envolvidos no aumento da concentração plasmática de Sb na composição AM/ $\beta$ -CD**

Estudos prévios permitiram mostrar que a associação do AM com a  $\beta$ -CD promove a absorção oral de Sb em camundongos e torna o AM ativo por via oral em modelo murino de leishmaniose cutânea (DEMICHELI et al., 2004). Medidas dos tempos de relaxação dos prótons por RMN revelaram ainda a existência de interações entre o AM e a  $\beta$ -CD. Entretanto, as espécies formadas entre o AM e a  $\beta$ -CD não tinham sido caracterizadas do ponto de vista físico-químico nem foi proposto um mecanismo para

explicar o aumento da concentração plasmática de Sb promovido pela composição AM/ $\beta$ -CD.

O processo utilizado no preparo da composição AM/ $\beta$ -CD envolve duas etapas principais. Na primeira etapa, uma mistura equimolar dos reagentes AM e  $\beta$ -CD é submetida a aquecimento, por 48 horas, a 55°C. Na segunda etapa, a solução resultante é submetida ao processo de liofilização.

Na presente tese, foi avaliada a influência de cada etapa nas características físico-químicas do AM e no nível de absorção oral de Sb a partir do produto resultante. Foi observado que na primeira etapa ocorre a dissociação do AM, de complexos de elevada massa molecular para complexos de baixa massa molecular, principalmente complexos Sb-NMG de estequiometria 1:1. Essa despolimerização do AM, segundo os resultados de absorção oral obtidos, pode ter contribuição no aumento de absorção oral de Sb promovida pela composição AM/ $\beta$ -CD. Contudo, o fato dessa composição ter promovido uma maior absorção de Sb que o AM aquecido ou ainda uma mistura AM +  $\beta$ -CD (não aquecida e não liofilizada) sugere que fatores relativos à interação específica entre os reagentes, influenciada pelo aquecimento e/ou pela liofilização, estão envolvidos no aumento de concentração plasmática da composição AM/ $\beta$ -CD. De fato, a caracterização físico-química da mistura AM/ $\beta$ -CD aquecida revelou uma nova espécie química formada pelo complexo ternário NMG-Sb- $\beta$ -CD. A manutenção do complexo Sb-NMG está em concordância com sua alta constante de estabilidade previamente observada ( $k \sim 8600 \text{ Lmol}^{-1}$ ) (FERREIRA et al., 2006), indicativo de que este não sofre dissociação com a formação do complexo ternário. Vale ressaltar ainda a baixa constante de estabilidade deste complexo, apesar do envolvimento de ligações covalentes, como sugerido pelos dados de espectrometria de massa.

Os dados obtidos mostraram ainda que a liofilização da mistura AM/ $\beta$ -CD aquecida modificou as interações entre o AM e a  $\beta$ -CD, resultando em aumento importante da absorção oral do Sb para a composição resultante. A caracterização da mistura AM +  $\beta$ -CD por dicroísmo circular revelou decréscimo no sinal do AM após adição da  $\beta$ -CD, sob aquecimento, e mudanças muito mais pronunciadas no espectro do AM, após liofilização. A análise da composição AM/ $\beta$ -CD por ESI(-)-MS permitiu ainda evidenciar a ocorrência de associações múltiplas entre o AM e a  $\beta$ -CD, sob o efeito da liofilização. Novos complexos NMG-Sb- $\beta$ -CD de estequiometrias 2:2:1 e 2:2:2 foram identificados.

Vale também ressaltar que, após diluição da composição AM/ $\beta$ -CD em água, o espectro de dicroísmo circular dessa composição mostrou variações lentas em função do tempo, até a obtenção de um espectro característico do AM não associado. Essas mudanças no estado físico-químico do AM foram confirmadas por medidas de RMN de hidrogênio e ESI-EM. Esses dados sugerem fortemente que a composição AM/ $\beta$ -CD atua como um sistema de liberação prolongada do AM.

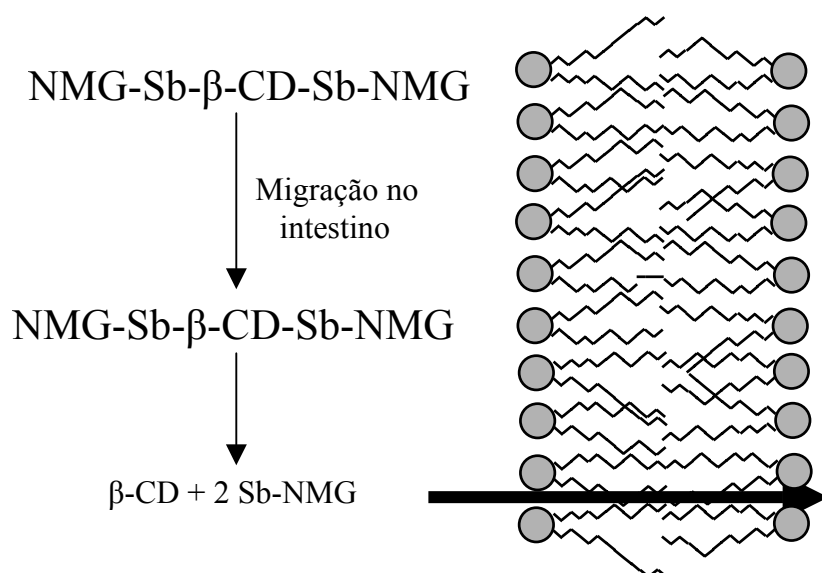
Diferentemente dos complexos de inclusão convencionais, cujo aumento de absorção do fármaco lipofílico incluso na CD está relacionado ao aumento da atividade termodinâmica e/ou da taxa de dissolução do fármaco (HIRAYAMA & UEKAMA, 1999; LOFTSSON & MASSON, 2001), naquela composição estaria favorecida a manutenção e a disponibilização do complexo Sb-NMG de estequiometria 1:1, favorecendo a permeação de Sb pela barreira gastrointestinal. O fato da composição AM/ $\beta$ -CD atuar como sistema de liberação prolongada (ou sustentada) do AM sugere ainda que o aumento na concentração plasmática de Sb promovido pela composição AM/ $\beta$ -CD poderia representar uma mudança no sítio de absorção desse antimonial, uma

vez que as CDs atravessam praticamente intactas o intestino delgado, sofrendo completa degradação no cólon. Mudanças no sítio de absorção de fármacos foi relatada previamente para complexos fármaco-CD, nos quais o fármaco é conjugado à CD através de ligações covalentes (HIRAYAMA & UEKAMA, 1999).

Sobre o mecanismo de permeação dos antimoniais pentavalentes através de membranas biológicas, até o presente nenhuma proteína transportadora foi identificada para compostos à base de Sb(V). Nesse contexto, foi desenvolvido um modelo lipídico de membrana para avaliar a permeação do AM e da composição AM/ $\beta$ -CD por difusão simples através de uma bicamada lipídica e um possível efeito da  $\beta$ -CD na permeação do AM. Esse sistema modelo permitiu, pela primeira vez, determinar o coeficiente de permeabilidade do AM através de uma bicamada lipídica. O valor encontrado foi de  $1,5 \times 10^{-10} \text{ cm s}^{-1}$ . Este valor se aproxima do valor relatado previamente para a permeação do íon  $\text{Cl}^-$  através da bicamada lipídica. Esse coeficiente pode ser comparado também àquele estimado a partir de dados de permeação do estibogluconato de sódio em macrófagos J774 (ROBERTS et al., 1995):  $P(\text{Sb(V)}) = 5 \times 10^{-9} \text{ cm s}^{-1}$ . O fato deste coeficiente apresentar valor 60 vezes maior do que aquele determinado no modelo lipídico de membrana sugere que o Sb(V) penetra nas células por outro mecanismo que a difusão simples pela bicamada lipídica. Foi observado ainda que o coeficiente de permeabilidade do Sb(V) aumenta com o aumento de pH na faixa de pH 6,5-7,5, sugerindo que a espécie mais permeável poderia apresentar grupo amino desprotonado. Essa observação sustenta a hipótese de que esta composição aumenta a disponibilidade de espécies de Sb de baixo peso molecular e eletricamente neutras, logo, com alto coeficiente de permeabilidade. A partir dos dados de ESI-MS, pode-se propor a espécie neutra  $\text{O}=\text{Sb-NMG}$ , de peso molecular 329, como sendo a espécie de maior permeabilidade. Não foi observada diferença significativa no coeficiente de

permeabilidade do Sb(V) entre o AM e a composição AM/ $\beta$ -CD. A ausência de correlação entre esses resultados de permeação e os dados de absorção oral pode ter várias explicações. As condições de concentração (0,02 mol/L de Sb) e de temperatura (37°C) utilizadas no ensaio de permeação podem ter favorecido a dissociação do AM para complexo de menor peso molecular e a composição AM/ $\beta$ -CD para o complexo AM em intervalo de tempo inferior a 24 hs, não ocasionando diferenças entre o AM e a composição AM/ $\beta$ -CD. Por outro lado, há possibilidade do transporte do Sb(V) pelo epitélio intestinal não ocorrer por difusão simples pela bicamada lipídica, mas por outros mecanismos, tais como o transporte mediado por proteína ou a endocitose. Neste caso, os lipossomas não seriam um bom modelo para a predição da velocidade de permeação do Sb(V) pelo epitélio.

A **FIGURA 47** ilustra o modelo proposto para o mecanismo de ação da  $\beta$ -CD na composição AM/ $\beta$ -CD, incluindo a espécie presente na composição AM/ $\beta$ -CD responsável pelo aumento de absorção oral de Sb e o mecanismo de permeação de Sb(V) pela barreira intestinal.



**FIGURA 49** Modelo proposto para o mecanismo de ação da  $\beta$ -CD na composição AM/ $\beta$ -CD, incluindo a espécie presente na composição AM/ $\beta$ -CD responsável pelo aumento de absorção oral de Sb e o mecanismo de permeação de Sb(V) pela barreira intestinal.

### **3 - Novas formulações farmacêuticas do AM para o tratamento oral das leishmanioses**

O fato do AM ser constituído por estruturas poliméricas de fórmulas  $(\text{NMG-Sb})_n\text{NMG}$ ,  $(\text{Sb-NMG})_n\text{-Sb}$  e  $(\text{NMG-Sb})_n$  (ROBERTS et al., 1998) permitiu propor, neste trabalho, a hipótese de que este estado polimerizado do AM poderia comprometer seu nível de absorção oral. ROBERTS et al. (1998) mostraram que a diluição de uma solução de AM de concentração 0,8 mol/L a 0,1 mol/L de Sb leva a uma dissociação lenta de complexos Sb-NMG de elevado peso molecular a complexos de baixo peso molecular. No presente estudo, foi mostrado que o aquecimento da solução de AM 0,1 mol/L acelera essa reação de dissociação e que o "estado dissociado" do AM é preservado após a liofilização. Uma contribuição importante da presente tese é a demonstração do

aumento da absorção oral de Sb em decorrência da dissociação do AM induzida pelo aquecimento.

Esses resultados sugerem que o aquecimento do AM antes de sua administração poderia promover a absorção oral do Sb, encontrando aplicação clínica no tratamento por via oral de doenças como as leishmanioses (DEMICHELI & FRÉZARD, 2005), câncer, hepatite C ou AIDS (YAN et al., 2005). Uma formulação oral a base de Sb viria a contrapor as terapias convencionais com antimoniais, em que injeções diárias, por 20 dias, acompanhadas de dor e desconforto, representam importante limitação para a adesão e/ou manutenção do tratamento pelo paciente (BERMAN, 1997), além de representar uma redução no atual custo de administração desse medicamento. Representa, contudo, um desafio no desenvolvimento dessa formulação identificar excipientes que permitam sua estabilização na forma liofilizada e a manutenção do estado dissociado (após reconstituição), em soluções concentradas do AM.



## CONCLUSÕES

Na presente tese, foi mostrado que o AM consiste principalmente de espécies zwitteriônicas: complexos Sb-NMG 2:2 em solução concentrada (0,7 mol/L de Sb) e complexos Sb-NMG 1:1 em solução diluída (< 0,1 mol/L de Sb).

Novas informações foram obtidas sobre as características físico-químicas da composição AM/ $\beta$ -CD 1:1, bem como sobre os fatores que influenciam a absorção oral de Sb a partir dessa composição.

Foi mostrado que a etapa de aquecimento, 1<sup>a</sup> etapa do processo de preparo da composição, promove a dissociação do AM para complexos Sb-NMG 1:1 e a formação do complexo ternário NMG-Sb- $\beta$ -CD.

Foi mostrado ainda que a liofilização, 2<sup>a</sup> etapa do processo de preparo, promove associações múltiplas entre o AM e a  $\beta$ -CD, incluindo a formação de complexos (NMG-Sb)<sub>2</sub>- $\beta$ -CD e (NMG-Sb- $\beta$ -CD)<sub>2</sub>. Foi observado que a etapa de liofilização é necessária para que a composição possa promover um aumento significativo de absorção oral de Sb.

Os resultados apresentados revelaram ainda que a composição AM/ $\beta$ -CD atua como um sistema de liberação prolongada para o AM, podendo alterar o sítio de liberação desse antimônio no trato gastrointestinal, uma vez que a CD se mantém quase intacta até o cólon, onde é completamente degradada.

Em adição às novas informações obtidas sobre o modo de atuação da composição AM/ $\beta$ -CD, esse trabalho permitiu propor duas novas formulações para a administração oral de Sb: uma consistindo no AM pré-aquecido, potencialmente menos tóxico e de menor custo em relação à composição AM/ $\beta$ -CD; a outra, uma composição AM/ $\beta$ -CD

de relação molar superior a 1:1, mais solúvel em relação à composição 1:1, e potencialmente menos tóxica e de com menor custo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. M.; SANTOS GOMES G. M.; JANZ, J. G. Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J. Parasitol.**, v. 77(4), p. 557-561, 1991.
- AKHTAR, MASOUD. **Geographical distribution and epidemiology of Visceral leishmaniasis.** s.n.t. Available from Internet: <[www.homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/akhter/geog.htm](http://www.homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/akhter/geog.htm)>. Cited: 23 August 2002.
- ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKEN, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.2(2), p. 1145-6, 1996.
- ALVAR, J., AMELA, C.; MOLINA, R. El perro como reservorio de la leishmaniosis. **Med. Vet.**, v. 12, p. 7-8, 1995.
- ALVIN, C. R.; SWARTZ, G. M. Em **Liposome Technology**; Gregoriadis, G., ed.; CRC Press: Boca Raton, v. II, cap. 4, 1984.
- ALVIN, C. R. Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria. **Parasitol. Today**, v. 2, p. 101-107, 1986.
- BARDELMEIJER, H. A.; TELLINGEN, O, V.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H. The oral route for the administration of cytotoxic drugs: strategies to increase the efficiency and consistency of drug delivery. **Invest. New Drugs**, v. 18, p. 231-241, 2000.
- BELLRINGER, M. E.; SMITH, T. G.; READ, R., GOPINATH, C.; OLIVIER, P. Beta-Cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. **Food Chem. Toxicol.**, v. 33(5), p. 367-376, 1995.
- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 684-703, 1997.
- BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **Rev. Infect. Dis**, v. 10(3), p. 560-586, 1988.
- BORST, P.; OUELLETTE, M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 427-460, 1995.
- BRASIL/MS/FUNASA. Leishmaniose visceral (calazar). **Guia de Vigilância Epidemiológica**, vol. II, 5ªed, p. 527-539, 2002.
- BROCHU, C.; WANG, J.; ROY, G.; MESSIER, N.; WANG, X. Y.; SARAVIA, N. G.; OUELLETTE, M. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 3073-3079, 2003.

BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M.; PETIT DE PENA, Y.; LUGO, A.; ANEZ, N. Selective determination of antimony(III) and antimony(V) in serum and urine and of total antimony in skin biopsies of patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. **Trace Elem. Med.**, v. 10, p. 66-70, 1993.

DAVID, J. R.; STAMM, L. M.; BEZERRA, H. S.; SOUZA, R. N.; KILLICK-KENDRICK, R.; LIMA, J. W. O. Deltamethrin impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomya longipalpis* and *L. migonei*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96(6), p. 839-847, 2001.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da rapoza (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. **O Hospital**, v. 48, p. 61-76, 1955.

DELNOMDEDIEU, M.; BASTI, M. M.; OTVOS, J. D.; THOMAS, D. J. Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. **Chem.-Biol. Interact.**, v. 90, p. 139-155, 1994.

DEMICHELI, C.; DE FIGUEIREDO, T. L.; CARVALHO, S.; SINESTERRA, R. D.; LOPES, J. C.; FRÉZARD, F. Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate. **Biometals**, v. 12(1), p. 63-66, 1999.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; LECOUCVEY, M.; GARNIER-SUILLVEROT, A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1570, p. 192-198, 2002.

DEMICHELI, C.; OCHOA, R.; GOZZO, F. C.; EBERLIN, M. N.; FRÉZARD, F. Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient methods for meglumine antimoniate. **Appl. Org. Chem.**, v. 17, p. 226-231, 2003.

DEMICHELI, C.; OCHOA, R.; DA SILVA, J. B. B.; FALCÃO, C. A. B.; ROSSI-BERGMANN, B.; DE MELO, A. L.; SINESTERRA, R. D.; FRÉZARD, F. Oral delivery of meglumine antimoniate using  $\beta$ -cyclodextrin for the treatment of leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 100-103, 2004.

DIETZE, R. M.; FAGUNDES, S. M.; BRITO, E. F.; MILAN, E. P.; FEITOSA, T. F. M.; SUASSUNA, F. A.; FONSCHEFFREY, G.; KSIONSKI, G.; DEMBER, J. Treatment of Kala-azar in Brazil with Amphocil (amphotericin B cholesterol dispersion) for 5 days. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89(3), p. 309-311, 1995.

DUFFIN, J.; CAMPLING, B. G. Therapy and disease concepts: the history (and the future?) of antimony in cancer **J. Hist. Med. Allied. Sci.**, v. 57, p. 61-78, 2002.

DZAMITIKA, S. A.; FALCÃO, C. A.; DE OLIVEIRA, F. B.; MARBEUF, C.; GARNIER-SILLEROT, A.; DEMICHELI, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; FRÉZARD, F. Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance. **Chem. Biol. Int.**, 2006.

- ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70-77, 1959.
- FERREIRA, C. S.; MARTINS, P. S.; DEMICHELI, C.; BROCHU, C.; OUELLETTE, M.; FRÉZARD, F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. **Biometals**, v. 16(3), p. 441-443, 2003.
- FRÉZARD, F.; MICHALICK, M. S.; SOARES, C. F.; DEMICHELI, C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33(7), p. 841-846, 2000.
- FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; FERREIRA, C.; COSTA, M. A. Glutathione-induced Conversion of Pentavalent antimony to Trivalent Antimony in Meglumine Antimoniate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45(3), p. 913-916, 2001.
- FERREIRA, C. S.; PIMENTA, A. M. C.; DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Characterization of reactions of antimoniate and meglumine antimoniate with a guanine ribonucleoside at different pH. **Biometals**, in press.
- FRIEND, D. R. (Ed.) Oral Colon-specific Drug Delivery, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.
- GERLÓCZY, A.; FÓNAGY, A.; KERESZTES, P.; PERLAKY, L.; SZEJTLI, J. Absorption, distribution, excretion and metabolism of orally administered 14C-beta-cyclodextrin in rat. **Arzneim.-Forsch.**, v. 35(7), p. 1042-1047, 1985.
- GRADONI, L.; MAROLI, M.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F. Leishmania infantum infection rates Phlebotomus perniciosus fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. **Med. Vet. Entomol.**, v. 1, p. 339-342, 1987.
- GRAMICCIA, M.; BETTINI, S.; CICALÒ, C. Leishmaniasis in Sardinia. Leishmanin reaction in the human population of a focus of low endemicity of canine leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, p. 371-374, 1990.
- GOODWIN, L. C.; PAGE, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem. J.**, v. 22, p. 236-240, 1943.
- HASHIM, F. A.; KHALIL, E. A.; ISMAIL, A.; EL HASSAM, A. M. Apparently successful treatment of two cases of Kala-azar dermal leishmaniasis with liposomal amphotericin B. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.**, v. 89(4), p. 440, 1995.
- HIRAI, S.; KOYAMA, H.; MAKINO, T.; KITAMORI, N.; TOGUCHI, H. Formulation studies of a new oral cephalosporin, cefotiam hexetil hydrochloride [SCE-2174 (2HCl)]. **Yakuzaigaku**, v. 48, p. 189-196, 1988.
- HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 36, p. 125-141, 1999.

HEADLEY, J. V.; YONG, M. S.; BROOKS, P. W.; PHILIPS, A. Fast-atom bombardment mass spectrometry of the organometallic parasiticide, meglumine antimonate. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 9, p. 372-376, 1995.

HOUGAAD, L.; BROENDSTED, H. Current applications of polysaccharides in colon targeting. **CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v. 13, p. 185-223, 1996.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues And Safety Evaluation. **Pharm. Sci.**, v. 86(2), p. 147-162, 1997.

IRIE, T.; TSUNENARI, Y.; UEKAMA, K.; PITHA, J. **Int. J. Pharm.**, v. 43, p. 41-44, 1988.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; BACHANN, P.; KARBWANG, J.; FICHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v.34(24), p. 1795-1800, 1999.

KAYSER, O.; OLBRICH, C.; YARDLEY, V.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. **Int. J. Pharm.**, v. 254, p. 73-75, 2003.

KATSURA, T.; INUI, K. Intestinal Absorption of Drugs Mediated by Drug Transporters: Mechanisms and Regulation. **Drug Metab. Pharmacokin.**, v. 18(1), p. 1-15, 2003.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med. Vet. Entomol.** v. 4, p. 1-24, 1990.

KOIZUMI, K.; KUBOTA, Y.; OKADA, Y.; UTAMURA, T. Microanalyses of beta-cyclodextrin in plasma by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 341, p. 31-41, 1985.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS ; KILLICK-KENDRICK. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. **Lond. Acad. Press**, v. 1, p. 1-20, 1987.

LAVERAN, A.; MESNIL, F. Sur un protozaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. ; Mesn.). Parasire d'une fièvre de l'Inde. **Comp. R. Hébd. Séanc. Acad. Sci.**, v. 137, p. 957-961, 1903.

LEISHMANIASIS and Leishmania/IHV co-infection. In: **WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infections Diseases**. s.l., WHO, 2000. cap. 10 (WHP/CDS/CSR/ISR/2000.1) Available from Internet: [www.who.int/enc/surveill/index.html](http://www.who.int/enc/surveill/index.html). Cited: 23 August 2002.

LIU, Z.; CARBREY, J. M.; AGRE, P.; ROSEN, B. P. Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 316, p. 1178-1185, 2004.

LOFTSSON, T.; MASSOM, M. Cyclodextrin in topical drug formulations: theory and practice. **Int. J. Pharm.**, v. 225, p. 15-30, 2001.

LUCUMI, A.; ROBLEDO, S.; GAMA, V.; SARAIVA, N. G. Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42(8), p. 1990-1995, 1998.

LUGO, A.; ANEZ, N.; PETIT DE PENA, Y.; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. Antimony determination in tissues and serum of hamsters infected with meglumine antimoniate. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, p. 37-41, 1994.

MaCALLUM, R. I. **Antimony in Medical History**, Pentland Press, Edinburgh, 1999.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drug for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, p. 187-198, 1985.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública do Rio de Janeiro**, v. 10, p. 359-375, 1994.

MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLES, P. R.; JANOFF, A. S. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 817(1), 193-196, 1985.

MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Vesicles of variable sizes produced by rapid extrusion procedure. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 858(1), p. 161-168, 1986.

MEYERHOFF, S. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28(1), p. 42-48, 1999.

MIYAZAWA, I.; UEDA, H.; NAGASE, H.; ENDO, T.; KOBAYASHI, S.; NAGAI, T. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 3, p. 153-162, 1995.

MONTEIRO, S. P.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Leishmaniose visceral no Brasil: perspectivas de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35(1), p. 335, 2002.

MORILLAS, F.; BENAVIDES, L.; GONZÁLEZ, J.; REYES, A.; VALERO, A. Découvert de *Leishmania sp.* dans le *Rattus rattus* en la province de Grénade (Espagne). **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 60, p. 768-770, 1985.

NAKANISHI, K.; MASADA, M.; NADAI, T.; MIYAJIMA, M. Effect of the interaction of drug-beta-cyclodextrin complex with bile salts on the drug absorption from rat small intestinal lumen. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 37, p. 211-214, 1989.

NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine canine du Kala-azar. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, v. 1, p. 299-301, 1908.

NISHIJO, J.; MORIYAMA, S.; SHIOTA, S. Interactions of cholesterol with Cyclodextrins in Aqueous Solution. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51(11), p. 1253-1257, 2003.

OCHOA, R.; FERREIRA, L. A.; FRÉZARD, F.; DA SILVA, J. B.; SINESTERRA, R. D.; DEMICHELI, C. Improved Percutaneous Absorption of antimony following Association of Meglumine antimoniate with Cyclodextrins, #864, Proceedings of the 30th Annual Meeting & Exposition. Controlled Release Society, Minneapolis, MN., 2003.

OLIVIER, P.; VERWAERDE, F.; HEDGES, A. R. **J. Am. Coll. Toxicol.**, v. 10, p. 407-419, 1991.

PETIT DE PENA, Y. M.; GALLIGNANI, M.; BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L.; ANEZ, N.; LUGO, Y. Selective determination of antimony(III) and antimony(V) in blood serum and urine by hydride generation and atomic absorption spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 1, p. 72-75, 1990.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. The 2<sup>nd</sup> International Forum on Canine leishmaniasis was held in Seville, Spain. **Trends in Parasitology**, v. 18 (7), p. 289-290, 2002.

REMME, J. H. F.; BLAS, E.; CHITSULO, L.; DESJEUX, P. M. P.; ENGERS, H. D.; KANYOK, T. R.; KAYONDO, J. F. K.; KIOY, D. W.; KUMARASWAMI, V.; LAZDINS, J. K.; NUNN, P. P.; ODUOLA, A.; RIDLEY, R. G.; TOURE, Y. T.; ZICKER, F.; MOREL, C. M. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends in Microbiology**, V. 10 (10), P. 435-440, 2002.

RIDDLES, P. W.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Ellman's Reagent: 5,5' - Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid) - a Reexamination. **Anal. Biochem.**, v. 94, p. 75-81, 1979.

ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D.; RAINEY, P. M. In vitro Antileishmanial Properties of Tri- and Pentavalent Antimonial Preparations. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39(6), p. 1234-1239, 1995.

ROBERTS, W. L.; McMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 1076-1082, 1998.

RODRIGUES, M. L. O.; COSTA, R. S.; FOSS, N. T.; ROSELINO, A. M. F. Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 41, p. 33-37, 1999.

ROSSI-BERGMANN, B.; LANGLET, A.; BEZERRA-SANTOS, R. C.; COSTA-PINTO, D.; TRAUB-CZEKO, M. Y.; Use of fluorescent Leishmania for faster quantitation of parasite growth in vitro and in vivo. **Parasitology**, v. 94, p. 74-74, 1999.

ROZENBAUM, W.; DORMONT, D.; SPIRE, B.; VILMER, E.; GENTILINI, M.; GRISCELLI, C.; MONTAGNIER, L.; BARRI\_SINOUSI, F.; CHERMANN, J. C.

Antimoniotunfstate (HPA 23) treatment of three patients with AIDS and one with prodrome. **Lancet.**, v. 23;1(8426) 325, p. 450-451, 1985.

SCHETTINI, D. A.; RIBEIRO, R. R.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O. G. F.; MELO, M. N.; MICHALIK, M. S. M.; FRÉZARD, F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **Int. J. Pharm.**, v. 315, p. 140-147, 2006.

SCOTT, J. A.; DAVIDSON, R. N.; MOODY, A. H.; GRANT, H. R. & FLEMINGHAN, D., SCOTT, G. M., OLLIARO, P. & BRYCESON, A. D. Aminosidine (paramomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 86(6), p. 617-619, 1992.

STEWART, J. C. M. Colorimetric Determination of phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 104, p. 10-13, 1980.

STECK, E. A. The Leishmaniasis. **Prog. Drug Res.**, v. 18, p. 289-351, 1974.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chem Rev.**, v. 98, p. 1743-1754.

TESH, R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: it is time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. and Hyg.**, v. 52, p. 287-292, 1995.

SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrin in industrial products and processes. **J. Mter. Chem.**, v. 7, p. 575-587, 1997.

TAKUR, C. P.; BHOWMICKS, S.; DOLFI, L.; OLLIARO, P. Aminosidine plus sodium stibogluconate for the treatment of Indian Kala azar: a randomized dose - finding clinical trial. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89(2), p. 219-223, 1995.

UEKAMA, K.; HIRAMAYA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier system. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 2045-2076, 1998.

UNDP/World Bank/WHO Special Programme For Research & Training In Tropical Diseases (TDR). Em Tropical Disease Research Programme Report, 11; progress 1991-92. Geneva: **World Health Organization**, 1993. cap. 8, p. 100-111.

UNDP/World Bank/WHO Special Programme For Research & Training In Tropical Diseases (TDR). Em Tropical Disease Research Programme Report, 13; progress 1995-96. Geneva: **World Health Organization**, 1997. cap. 8, p. 100-111.

UNDP/World Bank/WHO Special Programme For Research & Training In Tropical Diseases (TDR). **World Health Organization**. Available from Internet: [www.who.int/tdr/disease/leish](http://www.who.int/tdr/disease/leish). Cited: 20 February 2007.

VERNHET, L.; COURTOIS, A.; ALLAIN, N.; PAYEN, L.; ANGER, J. P.; GUILLOUZO, A.; FARDEL, O. Overexpression of the multidrug resistance-associated

protein (MRP1) in human heavy metal-selected tumor cells. **FEBS Lett.**, v. 443, p. 321-325, 1999

VIANNA, G. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v. 2, p. 426-428, 1913. .

YAN, S.; JIN, L; SUN, H. Antimony in Medicine, In: Gielen, M. & Tiekink, E. R. (Eds.), *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine.*, v. 10. John Wiley & Sons, p. 441-461, 2005.

ZANNOU, E. A.; STRENG, W. H.; STELLA, V. J. Osmotic Properties of Sulfobutylether and Hydroxipropyl Cyclodextrins. **Pharm Res.**, V. 18(8), P. 1226-1231, 2001.