

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Weverson Alves Ferreira

**Complexos anfifílicos de antimônio(V) e composições de fármacos à base antimônio com ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e potencial terapêutico**

BELO HORIZONTE

2010

UFMG / ICEx / DQ 811<sup>a</sup>

T. 340<sup>a</sup>

Weverson Alves Ferreira

**Complexos anfifílicos de antimônio(V) e composições de fármacos à base antimônio com ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e potencial terapêutico**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências-Química.

BELO HORIZONTE

2010

F383c Ferreira, Weverson Alves.  
2010 Complexos anfifílicos de antimônio(V) e  
T composições de fármacos à base de antimônio com  
ciclodextrina: síntese, caracterização físico-  
química e potencial terapêutico / Weverson  
Alves Ferreira. 2010.

xiii, 99 f. : il.

Orientadora: Cynthia Peres Demicheli.

Co-orientador: Frédéric Jean Georges  
Frézard.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química inorgânica - Teses 2. Antimônio -  
Uso terapêutico - Teses 3. Ciclodextrina -  
Teses 4. Complexos anfifílicos - Teses 5.  
Leishmaniose - Teses I. Demicheli, Cynthia  
Peres, Orientadora II. Frézard, Frédéric Jean  
Georges, Co-orientador III. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3409-5732  
FAX: 031 - 3409-5711  
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



**"Complexos anfifílicos de Antimônio(V) e Composições de Fármacos à Base de Antimônio com Ciclodextrina: Síntese, caracterização Físico-Química e Potencial Terapêutico "**

**Weverson Alves Ferreira**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profª. Cynthia Peres Demicheli - Orientadora  
UFMG

Prof. Frédéric Jean Georges Frézard - Co-Orientador  
UFMG

Prof. Breno Pannia Espósito  
USP

Profª. Maria Domingues Vargas  
UFF

Prof. Geraldo Magela de Lima  
UFMG

Profª. Maria Irene Yoshida  
UFMG

Belo Horizonte, 05 de abril de 2010.

Este trabalho foi desenvolvido sob orientação da Profa Dra. Cynthia Peres Demicheli e co-orientação do professor Dr. Frédéric Jean Georges Frézard.

Os alquimistas estão chegando...  
Eles são discretos e silenciosos  
Moram bem longe dos homens  
Escolhem com carinho a hora  
e o tempo do seu precioso trabalho  
São pacientes, assíduos e perseverantes  
Executam, segundo as regras herméticas  
desde a trituração, a fixação,  
a destilação e a coagulação  
Trazem consigo cadinhos,  
vasos de vidro, potes de louça  
Todos bem iluminados  
Evitam qualquer relação com pessoas  
de temperamento sórdido  
Os alquimistas estão chegando...

Jorge Ben Jor (1973)

Dedico os frutos dos meus esforços às  
Profas. Geni Vitor Fonseca e Cynthia  
Demicheli, pela excelência como educadoras,  
exemplos primorosos que desejo seguir.

## Agradecimentos

À Fonte de Manifestação, Pai-Mãe Celestial, por iluminar minha jornada e aconchegar-me em Seu coração.

À minha querida mãe, Vera Lúcia Vitor - Verdadeira Vitória da Luz, por me fazer acreditar que os sonhos são possíveis e por estar ao meu lado nos momentos felizes e árduos da vida.

À Profa. Cynthia Demicheli, por me conduzir com grande paciência e sabedoria durante esta rica jornada.

Ao Prof. Frédéric Frézard pela ilustre co-orientação, paciência e respeito.

Às minhas amáveis tias, Geni e Samara, pelo apoio, confiança e carinho.

À Profa. Beth Totti, por estimular a continuidade de meus estudos.

Aos colegas de laboratório e demais colegas do Departamento de Química (DQ), pelas inúmeras ajudas, em especial à jovem Lílian, pela companhia e amizade.

Ao Dr. Cláudio dos Santos Ferreira, pela vasta contribuição durante minha adaptação no DQ.

Aos colegas Raul Rio Ribeiro, Rubens Lima do Monte Neto e Kelly Cristina Kato, pela importante colaboração nos estudos biológicos.

Aos professores do DQ, por compartilharem generosamente sua ciência, técnica e arte.

Aos técnicos dos laboratórios, pelo profissionalismo e disponibilidade.

Aos demais funcionários do DQ, pela cordialidade e boa convivência durante estes quatro anos.

À Profa. Maria Irene Yoshida, pelas inúmeras análises térmicas e amizade.

Ao Prof. José Dias, pela importante colaboração durante os estudos de microscopia.

Ao Prof. Luís Roberto Pascoal, pelo apoio e incentivo.

Aos vários professores e professoras que a vida me apresentou, todos foram importantes na construção do saber que aqui exponho.

À minha querida “irmãzinha” Linda Luz, pelo seu Amor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela bolsa. Realmente foi uma experiência ímpar poder dedicar-me exclusivamente a este curso de doutorado.

## Índice

Lista de abreviaturas	i
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	viii
Resumo	x
Abstract	xii
CAPÍTULO 1- Introdução	1
1.1- Leishmanioses: doença e manifestações clínicas	1
1.2- Quimioterapia e medicamentos em uso	4
1.2.1- Antimoniais pentavalentes	4
1.2.2- Anfotericina B	6
1.2.3- Pentamidina	7
1.2.4- Hexadecilfosfocolina	7
1.3- Uso de nanocarreadores para os fármacos leishmanicidas	9
1.3.1- Formulações a base de ciclodextrinas (CD)	9
1.3.2- Formulações a base de lipossomas	10
1.4- Complexos metálicos anfifílicos	13
1.5- A necessidade de se buscar um tratamento oral e tópico para as leishmanioses	14
1.6- Objetivos	15
CAPÍTULO 2- Materiais e métodos	16
2.1- Reagentes	16
2.2- Microanálises	16
2.3- Espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS)	17

2.4- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	17
2.5- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	18
2.6- Analisador de tamanho de partículas	18
2.7- Medidas de dicroísmo circular (DC)	18
2.7.1- Estudo da dissociação dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 a 25 °C por DC	19
2.7.2- Estudo da dissociação dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 a 60 °C por DC	19
2.7.3- Estudo da cinética de formação do complexo Sb-LA8 e seus nanoagregados a 60 °C por DC	19
2.8- Espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray	20
2.9- Análise térmica	20
2.10- Medidas de condutância eletrolítica	21
2.11- Determinações de pH	21
2.12- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	21
2.13- Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	21
2.14- Osmolaridade	22
2.15- Liofilizador	22
2.16- Centrífuga	22
2.17- Síntese do estibogluconato de sódio (SSG)	22
2.18- Preparo da formulação do estibogluconato de sódio com a $\beta$ -ciclodextrina (SSG: $\beta$ -CD 1:1)	23
2.19- Avaliação da absorção oral de Sb em camundongos <i>Swiss</i> a partir das formulações do SSG e da formulação SSG: $\beta$ -CD (1:1)	23
2.20- Síntese do antimoniato de meglumina (AM)	24
2.21- Preparo da formulação do antimoniato de meglumina com a $\beta$ -ciclodextrina (AM: $\beta$ -CD 7:1)	25
2.22- Avaliação da absorção oral de Sb em cães da raça Beagle a partir das formulações AM e AM: $\beta$ -CD 7:1	25

2.23- Avaliação da absorção oral de Sb em camundongos <i>Swiss</i> a partir das formulações AM e AM: $\beta$ -CD 7:1	25
2.24- Síntese dos dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG)	26
2.25- Determinação do coeficiente de partição óleo/água do Sb nos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG)	26
2.26- Avaliação da absorção oral de Sb em camundongos <i>Swiss</i> a partir dos novos complexos anfílicos de Sb(V)	27
CAPÍTULO 3- Caracterização do estibogluconato de sódio (SSG) e da formulação estibogluconato de sódio: $\beta$ -ciclodextrina 1:1 (SSG: $\beta$ -CD 1:1) e avaliação da absorção oral de Sb, em camundongos <i>Swiss</i> , promovida por estas formulações	28
3.1- Introdução	28
3.2- Caracterização físico-química do estibogluconato de sódio (SSG)	29
3.2.1- Análise termogravimétrica do SSG	29
3.2.2- Microanálises do SSG	30
3.2.3- Condutividade do SSG	31
3.2.4- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do SSG	31
3.2.5- Análises do SSG por espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray (ESI-MS) nos modos positivo e negativo	33
3.2.6- Avaliação da cinética de osmolaridade do SSG	36
3.3- Caracterização físico-química da formulação estibogluconato de sódio: $\beta$ -ciclodextrina 1:1 (SSG: $\beta$ -CD 1:1)	37
3.3.1- Análise termogravimétrica da formulação SSG: $\beta$ -CD 1:1	37
3.3.2- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho da formulação SSG: $\beta$ -CD 1:1	39
3.4- Absorção de Sb por via oral em camundongos <i>Swiss</i> a partir das formulações preparadas com o SSG	40
3.5- Conclusões	42

CAPÍTULO 4- Caracterização da formulação antimoniato de meglumina: $\beta$ -ciclodextrina 7:1 (AM: $\beta$ -CD 7:1) e avaliação da absorção oral de Sb, em cães da raça Beagle e em camundongos <i>Swiss</i> , promovida por estas formulações	42
4.1- Introdução	43
4.2- Caracterização físico-química do antimoniato de meglumina (AM)	44
4.2.1- Análise termogravimétrica do AM	44
4.2.2- Microanálises do AM	45
4.2.3- Condutividade do AM	45
4.2.4- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do AM	46
4.3- Caracterização físico-química da formulação antimoniato de meglumina: $\beta$ -ciclodextrina 7:1 (AM: $\beta$ -CD 7:1)	47
4.3.1- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1	47
4.3.2- Análise termogravimétrica da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1	48
4.3.3- Estudos de $^1\text{H}$ RMN da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1	50
4.3.4- Estudo do tamanho das partículas da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 por espectroscopia de correlação de fótons	54
4.4- Avaliação da absorção oral de Sb em cães da raça Beagle a partir das formulações AM e AM: $\beta$ -CD 7:1	55
4.5- Avaliação da absorção oral de Sb em camundongos <i>Swiss</i> a partir das formulações AM e AM: $\beta$ -CD 7:1	57
4.6- Conclusões	59
CAPÍTULO 5: Caracterização físico-química dos complexos de alquimetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG) e avaliação da capacidade destes novos complexos em promover a absorção de Sb em camundongos por via oral	60
5.1- Introdução	60
5.2- Caracterização físico-química dos complexos de alquimetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG)	61
5.2.1- Microanálises dos complexos Sb-AMG	61

5.2.2- Condutividade dos complexos Sb-AMG	62
5.2.3- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho dos complexos Sb-AMG	62
5.2.4- Estudo de RMN do ligante anfífilo octanoil-N-metil-glucamida (LA8) e do complexo Sb-LA8	65
5.2.5- Avaliação dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG) por espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray (ESI-MS)	75
5.2.6- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG)	81
5.2.7- Avaliação dos nanoagregados formados pelo complexo Sb-LA8 por dicroísmo circular (DC)	83
5.2.7.1- Estudo da dissociação dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 a 25 °C por DC	83
5.2.7.2- Estudo da dissociação dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 a 60 °C por DC	84
5.2.7.3- Estudo da cinética de formação do complexo Sb-LA8 e seus nanoagregados a 60 °C por DC	86
5.2.8- Coeficiente de partição óleo/água do Sb a partir dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG)	87
5.3- Avaliação da capacidade dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG) em promover a absorção oral de Sb em camundongos <i>Swiss</i>	88
5.4- Conclusões	90
CAPÍTULO 6- Referências Bibliográficas	91

## Lista de abreviaturas

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AM	Antimoniato de meglumina
AMG	Alquilmetilglucamidas
$\beta$ -CD	Beta-ciclodextrina
CD	Ciclodextrina
Cebio (UFMG)	Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
COSY	Espectroscopia de correlação
Da	Dalton
DC	Dicroísmo circular
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO <sub>d6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTA	Análise térmica diferencial
DTG	Derivada da termogravimetria
$\epsilon$	Absorbtividade molar
ESI-MS	Espectrometria de massa com ionização por eletrospray
FDA	U.S.Food and Drug Administration
$\delta$	Deslocamento químico
GFAAS	Espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite
GLU	Ácido glucônico
GMP	Guanosina monofosfato
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMQC	Correlação heteronuclear múltiplo-quântica
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
LAREMAR (UFMG)	Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFMG
LA8	Octanoil N-metil-glucamida

LA10	Decanoil N-metil-glucamida
LA12	Dodecanoil N-metil-glucamida
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LV	Leishmaniose visceral
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mosmol/L	Miliosmolaridade por litro
NMG	N-metil-d-glucamina
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>[P]</i>	Coefficiente de partição aparente
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
Sb(III)	Antimônio trivalente
Sb(V)	Antimônio pentavalente
SSG	Estibogluconato de sódio
SUV	Lipossoma unilamelar pequeno
TG	Termogravimetria

## Lista de figuras

Figura 1.1: Protozoário flagelado causador das leishmanioses (a) e seu vetor transmissor (b) [3,4].	1
Figura 1.2: Protozoário causador das leishmanioses. Forma amastigota que assumem após sua fagocitose pelos macrófagos (setas vermelhas) [6].	1
Figura 1.3: Caráter endêmico das leishmanioses no Brasil (seta azul) e no mundo [8].	2
Figura 1.4: Distribuição global dos países que reportaram casos de leishmanioses e de sua co-infecção com HIV [8].	3
Figura 1.5: Estrutura química do AM (a) e do SSG (b).	4
Figura 1.6: Estruturas químicas propostas recentemente para o AM, após seu estudo por ESI-MS.	5
Figura 1.7: Estrutura química da anfotericina B.	6
Figura 1.8: Estrutura química da pentamidina.	7
Figura 1.9: Estrutura química da hexadecilfosfocolina.	8
Figura 1.10: Ligantes anfifílicos utilizados na obtenção dos novos complexos de Sb(V).	8
Figura 1.11: Vesículas de fosfatidilcolina de ovo com uma alquimetilglucamida, preparadas por diálise lenta. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão [28].	8
Figura 1.12: Esquema geral da estrutura das ciclodextrinas, com vista superior (a) e frontal da cavidade hidrofóbica (b) [32].	9
Figura 1.13: Esquema geral da estrutura dos lipossomas [29].	11
Figura 1.14: Lipossoma unilamelar pequeno (SUV) com a anfotericina B (amarelo) incorporada à bicamada lipídica (azul) [37].	11
Figura 1.15: Imagem obtida por microscopia eletrônica do fígado de um hamster, mostrando a detalhada estrutura lamelar de um lipossoma (L) adjacente a <i>Leishmania</i> intracelular (P) [38].	12
Figura 2.1: Ácido glucônico.	23
Figura 2.2: N-metil-d-glucamina	24

Figura 3.1: Estrutura proposta para o SSG.	28
Figura 3.2: Curvas TG, DTG (azul) e DTA (verde) do SSG.	30
Figura 3.3: Espectro no infravermelho do GLU.	32
Figura 3.4: Espectro no infravermelho do SSG.	32
Figura 3.5: Espectro de ESI(+)-MS do SSG em água, 0,005 mol/L Sb (voltagem do cone = 40 V).	34
Figura 3.6: Espectro de ESI(-)-MS do SSG em água, 0,005 mol/L Sb (voltagem do cone = 40 V).	34
Figura 3.7: Fórmulas estruturais propostas para as espécies 365 Da, 587 Da, 779 Da e 1025 Da, identificadas no SSG.	35
Figura 3.8: Cinética de osmolaridade em uma solução de SSG após diluição de 0,7 mol/L para 0,1 mol/L de Sb e incubação a 37°C. Dados expressos como média $\pm$ SEM (n = 3).	36
Figura 3.9: Curvas TG, DTG (azul) e DTA (verde) da mistura mecânica SSG+ $\beta$ -CD (1+1).	38
Figura 3.10: Curvas TG, DTG (azul) e DTA (verde) da formulação SSG: $\beta$ -CD 1:1.	38
Figura 3.11: Curvas TG, DTG (azul) e DTA (verde) da $\beta$ -CD.	39
Figura 3.12: Espectro no infravermelho da $\beta$ -CD (verde), da mistura mecânica SSG+ $\beta$ -CD (1+1) (vermelho), da composição SSG: $\beta$ -CD 1:1 (azul) e do SSG (preto).	40
Figura 3.13: Concentrações de Sb no soro de camundongos SWISS, 30 min após a administração oral de diferentes formulações do SSG na dose de 80 mg Sb/Kg (n=3-6).	41
Figura 3.14: Concentrações de Sb no soro de camundongos SWISS, 3 h após a administração oral de diferentes formulações do SSG na dose de 80 mg Sb/Kg (n=3-6).	41
Figura 4.1: Curvas TG, DTG (azul) e DTA (verde) do AM.	44
Figura 4.2: Espectro no infravermelho do AM.	46
Figura 4.3: Espectro no infravermelho do AM (preto), da $\beta$ -CD (vermelho) e da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 (azul).	47
Figura 4.4: Curvas TG (azul) e DTA (verde) da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1.	48

Figura 4.5: Curvas TG (azul) e DTA (verde) da mistura mecânica AM+ $\beta$ -CD (7+1).	49
Figura 4.6: Curvas TG (azul) e DTA (verde) da $\beta$ -CD.	49
Figura 4.7: Curvas TG (azul) e DTA (verde) do AM.	50
Figura 4.8: Espectro de $^1\text{H}$ RMN (200 MHz) em $\text{D}_2\text{O}$ com ênfase nos sinais dos hidrogênios da $\beta$ -CD (0,0057 mol/L). Formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 (vermelho), solução AM+ $\beta$ -CD (7+1) (azul), $\beta$ -CD livre (preto).	51
Figura 4.9: COSY (200 MHz) da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 em $\text{D}_2\text{O}$ .	52
Figura 4.10: Distribuição das partículas da composição AM: $\beta$ -CD 7:1 por tamanho, em diferentes intervalos de tempo, após dissolução do pó liofilizado em água (0,04 mol/L Sb) e incubação a 25°C. Os dados representam diferentes populações de partículas, identificadas pelo nanosizer através de uma análise multi-modal de distribuição de tamanho. Cada população foi caracterizada pelo volume hidrodinâmico médio e pela porcentagem (em volume) de toda população.	55
Figura 4.11: Farmacocinética do Sb no soro de cães da raça Beagle, após administração das composições do AM e do AM: $\beta$ -CD 7:1 por via oral (100 mg Sb/Kg). Os dados mostrados são a média $\pm$ S.E.M (n = 3).	56
Figura 4.12: Concentração de Sb no soro de camundongos <i>Swiss</i> após 1 h da administração oral das composições do AM e do AM: $\beta$ -CD 7:1 (300 mg Sb/Kg).	58
Figura 4.13: Concentração de Sb no soro de camundongos <i>Swiss</i> após 3 h da administração oral das composições do AM e do AM: $\beta$ -CD 7:1 (300 mg Sb/Kg).	58
Figura 5.1: Espectro no infravermelho dos complexos Sb-LA8 (Preto), Sb-LA10 (Azul) e Sb-LA12 (Vermelho).	63
Figura 5.2: Espectro no infravermelho do LA8 e do complexo Sb-LA8 (Azul).	63
Figura 5.3: Espectro no infravermelho do LA10 e do complexo Sb-LA10 (Azul).	64
Figura 5.4: Espectro no infravermelho do LA12 e do complexo Sb-LA12 (Azul).	64
Figura 5.5: Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400 MHz) do LA8 em $\text{CDCl}_3$ .	65
Figura 5.6: COSY (400 MHz) do LA8 em $\text{CDCl}_3$ .	67
Figura 5.7: HMQC (400 MHz) do LA8 em $\text{CDCl}_3$ .	67

Figura 5.8: Expansão do HMQC (400 MHz) do LA8 (CDCl <sub>3</sub> ) entre 3,8-4,4 ppm.	68
Figura 5.9: <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) do complexo Sb-LA8 em CDCl <sub>3</sub> .	70
Figura 5.10: DEPT (400 MHz) do complexo Sb-LA8 em CDCl <sub>3</sub> .	70
Figura 5.11: Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) do LA8 em DMSO <sub>d6</sub> .	73
Figura 5.12: Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) do complexo Sb-LA8 em DMSO <sub>d6</sub> .	74
Figura 5.13: Estrutura proposta para o complexo Sb-LA8.	74
Figura 5.14: Espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA8 em água.	75
Figura 5.15: Expansão do espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA8 obtido em água.	76
Figura 5.16: Espectro MS/MS para o íon de <i>m/z</i> igual a 1078,60.	76
Figura 5.17: Espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA10 em água.	77
Figura 5.18: Expansão do espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA10 obtido em água.	78
Figura 5.19: Espectro MS/MS para o íon de <i>m/z</i> igual a 1162,81.	78
Figura 5.20: Espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA12 em água.	79
Figura 5.21: Expansão do espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA12 obtido em água.	80
Figura 5.22: Espectro MS/MS para o íon de <i>m/z</i> igual a 1246,91.	80
Figura 5.23: Microscopia Eletrônica de Varredura do Sb-LA10 (aumento de 10.000 vezes).	81
Figura 5.24: Microscopia Eletrônica de Transmissão do Sb-LA8 (aumento de 50.000 vezes).	82
Figura 5.25: Microscopia Eletrônica de Transmissão do Sb-LA12 (aumento de 50.000 vezes).	82
Figura 5.26: Espectros de DC (25 °C) do Sb-LA8 em diferentes intervalos de tempo (0 min= verde, 15 min= azul claro e 30 min= rosa), do modelo de complexo dissociado (azul) e do ligante LA8 (vermelho).	84

- Figura 5.27: Espectros de DC do Sb-LA8 a 25 °C (0 min= azul claro) e após aquecimento a 60 °C (15 min= laranja e 30 min= azul). O ligante LA8 também foi avaliado a 25 °C (vermelho). 85
- Figura 5.28: Espectros de DC da mistura do  $\text{KSb(OH)}_6$  com o LA8 a 25 °C (0 min= azul claro) e após aquecimento a 60 °C (30 min= laranja, 60 min= verde e 120 min= azul). O ligante LA8 também foi avaliado a 25 °C (vermelho). 86
- Figura 5.29: Coeficientes de partição óleo/água do Sb a partir dos complexos anfifílicos de Sb(V). Os dados representam as médias  $\pm$  desvio padrão (n=2). 87
- Figura 5.30: Concentração de Sb no soro de camundongos *Swiss* após 1 h da administração oral dos complexos anfifílicos de Sb(V) e do AM (100 mg Sb/Kg). 89
- Figura 5.31: Concentração de Sb no soro de camundongos *Swiss* após 3 h da administração oral dos complexos anfifílicos de Sb(V) e do AM (100 mg Sb/Kg). 89

**Lista de tabelas**

Tabela 2.1: Reagentes utilizados na parte experimental.	16
Tabela 2.2: Representação das figuras de mérito para determinação de Sb em soro por GFAAS.	17
Tabela 3.1: Percentuais dos elementos C, H, Sb e Na encontrados para o SSG.	30
Tabela 3.2: Medidas de condutividade elétrica	31
Tabela 3.3: Espécies iônicas identificadas nos espectros de ESI(+)-MS e ESI(-)-MS do SSG (0,005 mol/L Sb) em água <sup>a</sup> .	33
Tabela 4.1: Percentuais dos elementos C, H, N e Sb encontrados para o AM.	45
Tabela 4.2: Medidas de condutividade elétrica	45
Tabela 4.3: Deslocamentos químicos ( $\delta$ ), <sup>1</sup> H RMN, dos prótons da $\beta$ -CD em D <sub>2</sub> O, na formulação AM: $\beta$ -CD 7:1, na solução AM + $\beta$ -CD (7+1) e na $\beta$ -CD livre.	51
Tabela 5.1: Percentuais dos elementos C, H, N, Sb e K encontrados para os complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio.	61
Tabela 5.2: Medidas de condutividade elétrica	62
Tabela 5.3: Atribuição dos principais deslocamentos químicos de hidrogênios (ppm) encontrados para o ligante anfifílico octanoil-N-metilglucamida* em CDCl <sub>3</sub> .	66
Tabela 5.4: Atribuição dos principais deslocamentos químicos de carbonos (ppm) encontrados para o ligante anfifílico octanoil-N-metilglucamida* em CDCl <sub>3</sub> .	69
Tabela 5.5: Atribuição dos principais deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos (ppm) encontrados para o complexo Sb-LA8 em CDCl <sub>3</sub> (LA8*).	71
Tabela 5.6: Variações dos deslocamentos químicos ( $\Delta \delta$ ) de hidrogênios e carbonos encontrados entre o octanoil N-metilglucamida* e o complexo Sb-LA8.	72
Tabela 5.7: Espécies iônicas identificadas no espectro de ESI(-)-MS do complexo Sb-LA8 em água <sup>a</sup> .	77

Tabela 5.8: Espécies iônicas identificadas no espectro de ESI(-)-MS do complexo Sb-LA10 em água<sup>a</sup>. 79

Tabela 5.9: Espécies iônicas identificadas no espectro de ESI(-)-MS do complexo Sb-LA12 em água<sup>a</sup>. 81

## Resumo

As leishmanioses são enfermidades que podem produzir manifestações cutâneas, mucocutâneas e viscerais. A alta incidência desta doença levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a incluí-la entre as seis mais importantes endemias do mundo. Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses, porém, sua toxicidade e administração parenteral prolongada limitam seu uso clínico.

Essa tese apresenta novas formulações para os antimoniais pentavalentes clássicos, antimoniato de meglumina (AM) e estibugluconato de sódio (SSG), com a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e uma nova série anfifílica de antimoniais pentavalentes. Estes compostos e formulações foram planejados com intuito de promover a absorção de Sb por via oral.

O SSG, avaliado por análise elementar, análise térmica, IV, estudos de osmolaridade e ESI-MS, apresentou complexos Sb(V)-ligante 1:1, 1:2, 2:2 e 2:3. As estruturas inéditas propostas para esta droga poderão ajudar a compreender sua farmacologia. Ensaios preliminares foram realizados em camundongos *Swiss* a partir do SSG e da composição SSG: $\beta$ -CD 1:1 visando avaliar a influência da  $\beta$ -CD na absorção de Sb por via oral.

Uma composição AM: $\beta$ -CD foi preparada na relação molar 7:1 e caracterizada por análise térmica, IV, RMN de  $^1\text{H}$  e espectroscopia de correlação de fótons. Além de promover uma maior absorção oral de Sb em cães da raça Beagle, esta composição atuou como sistema de liberação sustentada, e conseguiu prolongar os níveis plasmáticos de Sb em relação ao AM. Este trabalho apresenta uma nova modalidade de liberação, baseada na interação Sb-O-( $\beta$ -CD).

Os antimoniais pentavalentes anfifílicos foram obtidos com os ligantes octanoil N-metil-glucamida, decanoil N-metil-glucamida e dodecanoil N-metil-glucamida, e ao serem avaliados por análise elementar, IV, dicroísmo circular,

RMN de  $^1\text{H}$  e ESI-MS, revelaram a formação de complexos Sb(V)-ligante 1:3. Os ensaios preliminares realizados em camundongos *Swiss* a partir destes compostos, visando modular a absorção de Sb por via oral, mostraram resultados muito promissores. O caráter anfifílico destes novos antimoniais também permite propor formulações para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea, até então inexistente.

## Abstract

Leishmaniasis are diseases that can produce cutaneous, mucocutaneous or visceral clinical manifestations. The World Health Organization (WHO) included this disease among the six most important endemic diseases in the World, because of its high incidence. The pentavalent antimonials are the first-line drugs used in the treatment of leishmaniasis, however, their toxicity and prolonged parenteral administration limit their clinical use.

This thesis presents new formulations for the classical pentavalent antimonials, meglumine antimonate (MA) and sodium stibogluconate (SSG), with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and a new amphiphilic antimony series. These compounds and formulations have been designed to promote the absorption of Sb by the oral route.

The SSG, evaluated by elemental analysis, thermal analysis, IR, osmolarity measurements and ESI-MS, showed 1:1, 1:2, 2:2 and 2:3 Sb(V)-ligand complexes. The novel structures proposed for this drug may help to understand its pharmacological properties. Preliminary assays were performed in Swiss mice with SSG and its SSG: $\beta$ -CD 1:1 composition to evaluate the influence of  $\beta$ -CD on the absorption of Sb by oral route.

A (non-conventional) composition MA: $\beta$ -CD was prepared at 7:1 molar ratio and characterized by thermal analysis, IR,  $^1\text{H}$  RMN and light scattering spectroscopy. The novel composition was found to act as a sustained drug release system and to promote greater and more prolonged plasma levels of Sb when compared to MA, after administration to Beagle dogs by oral route. This work presents a new modality of release system, based on the Sb-O-( $\beta$ -CD) interaction.

Amphiphilic pentavalent antimonials were obtained with the ligands octanoyl N-methyl-glucamide, decanoyl N-methyl-glucamide and dodecanoyl N-

methyl-glucamide and, when evaluated by elemental analysis, IR, circular dichroism,  $^1\text{H}$  RMN and ESI-MS, revealed the formation of 1:3 Sb(V)-ligand complexes. The preliminary tests of these compounds carried out in Swiss mice, with the aim of evaluating the impact on the absorption of Sb by the oral route, showed very promising results. The amphiphilic character of these new antimonials allows us to propose for the first time innovative antimony-based formulations for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis.

## CAPÍTULO 1- Introdução

### 1.1- Leishmanioses: doença e manifestações clínicas

Leishmanioses são zoonoses causadas por cerca de vinte espécies de um protozoário do gênero *Leishmania*, ordem *Kinetoplastida*, família *Tripanosomatidae*. Estas patologias são transmitidas por cerca de quinhentas espécies de vetores do gênero *Phlebotomus* no velho mundo e por apenas uma espécie do gênero *Lutzomia* nas Américas (Figura 1.1) [1,2].

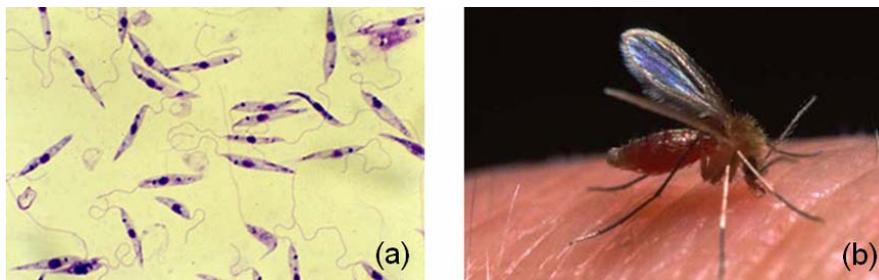


Figura 1.1: Protozoário flagelado causador das leishmanioses (a) e seu vetor transmissor (b) [3,4].

Fonte: (a) <[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Leishmania\\_major\\_promastigotes.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Leishmania_major_promastigotes.jpg)>, (b) <[http://villechamonix.blogspot.com/2008\\_12\\_01\\_archive.html](http://villechamonix.blogspot.com/2008_12_01_archive.html)>. Acessos em 15/01/2010.

No ciclo evolutivo completo, os protozoários flagelados são fagocitados por macrófagos e se multiplicam no ambiente ácido dos lisossomas secundários, principalmente no fígado, baço e medula óssea, no caso da forma visceral (Figura 1.2) [5].



Figura 1.2: Protozoário causador das leishmanioses. Forma amastigota que assumem após sua fagocitose pelos macrófagos (setas vermelhas) [6].

Fonte: <[http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero\\_Leishmania.htm](http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Leishmania.htm)>. Acesso em 15/01/2010.

Estas enfermidades acometem o homem na forma cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV), apresentado caráter endêmico em países dos cinco continentes (Figura 1.3) [2,7].

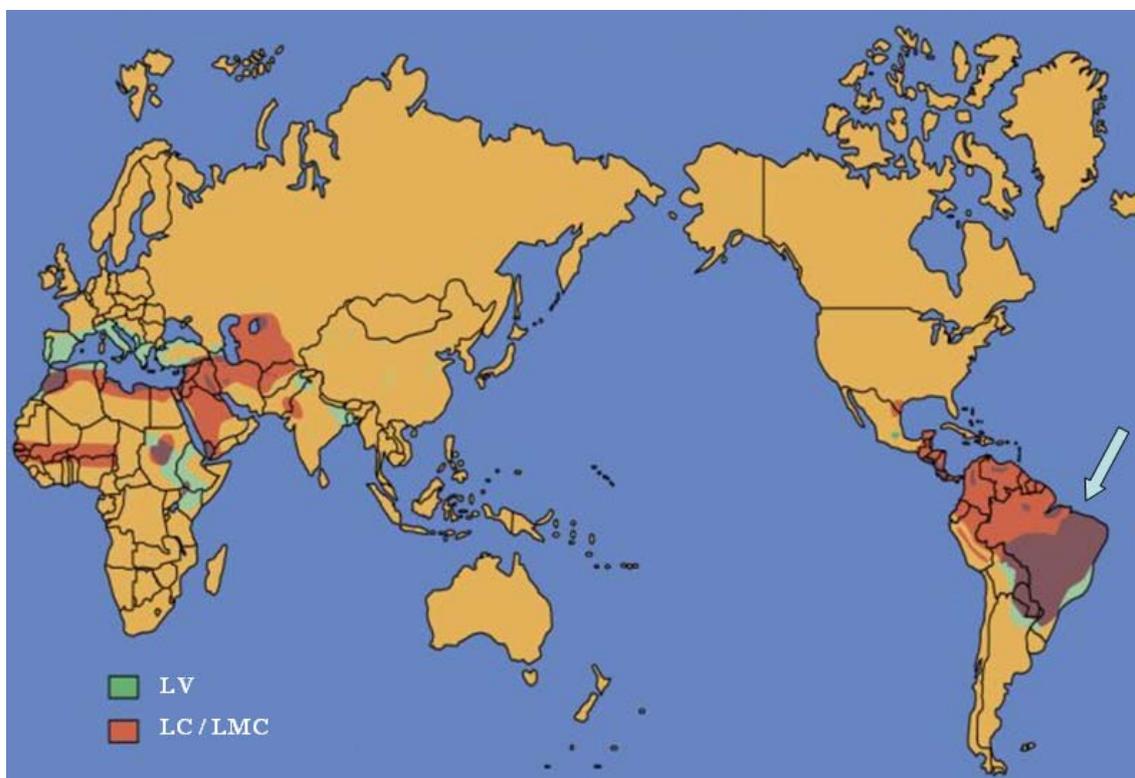


Figura 1.3: Caráter endêmico das leishmanioses no Brasil (seta azul) e no mundo [8].

Fonte: <[http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)>. Acesso em 15/01/2010.

O Brasil é um dos países mais acometidos pela leishmaniose cutânea (LC), que, apesar de ser a forma clínica de maior incidência, as ulcerações geralmente evoluem para cura espontânea. Porém, por estar associada à leishmaniose mucocutânea (LMC), doença degenerativa inflamatória da mucosa nasofaríngea, esta forma da doença é muito preocupante. A LMC é uma doença crônica e de difícil tratamento, podendo levar a um considerável grau de destruição, que muitas vezes compromete a reinserção do indivíduo na sociedade, assim, sua baixa incidência (1-2%) não a torna menos relevante [2].

O Brasil também é destaque entre os países com maior número de casos de leishmaniose visceral (LV), a forma de consequências mais severas para a saúde pública. A LV é letal a quase 100% dos pacientes não tratados e



## 1.2- Quimioterapia e medicamentos em uso

### 1.2.1- Antimoniais pentavalentes

Desde o início do século XX que os medicamentos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses possuem o antimônio em sua composição. Em 1912, o cientista brasileiro Gaspar Viana introduziu o tártaro hermético, um antimônio trivalente, no tratamento destas patologias. Entretanto, a partir de 1945 esse composto foi substituído por antimoniais pentavalentes, que apresentaram menor toxicidade [12, 13].

Atualmente, dois complexos hidrossolúveis de antimônio pentavalente estão disponíveis no mercado: o antimoniato de meglumina (AM), conhecido comercialmente como Glucantime<sup>®</sup>, e o estibogluconato de sódio (SSG), conhecido como Pentostam<sup>®</sup> (Figura 1.5) [12, 14].

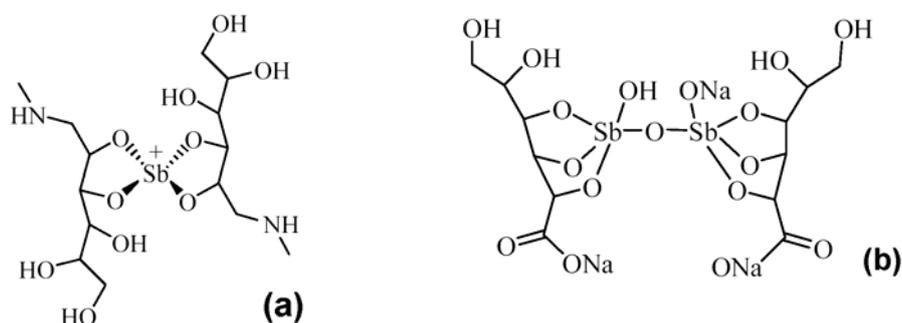


Figura 1.5: Estrutura química do AM (a) e do SSG (b).

No Brasil o medicamento de primeira escolha é o AM, um sólido amorfo de difícil caracterização estrutural [15]. Apesar destes medicamentos serem utilizados por mais de meio século, sua estrutura química e composição ainda não foram completamente esclarecidas. Baseado em estudos realizados por espectrometria de massas, Roberts e colaboradores sugeriram que o AM é composto por uma mistura de estruturas oligoméricas de fórmula geral  $(\text{meglumina-Sb})_n$  e  $(\text{meglumina-Sb})_n\text{-meglumina}$  e no mesmo trabalho sugeriram a estrutura apresentada na figura (1.5 a) [16]. Recentemente, utilizando a técnica de espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray (ESI-MS), nosso grupo de pesquisa demonstrou que este fármaco

realmente consiste em uma mistura de complexos polymerizados Sb-meglumina, e propõem novas estruturas para estes complexos (Figura 1.6) [14]. Como veremos detalhadamente neste trabalho, sugerimos que o SSG também se trata de uma mistura de oligômeros.

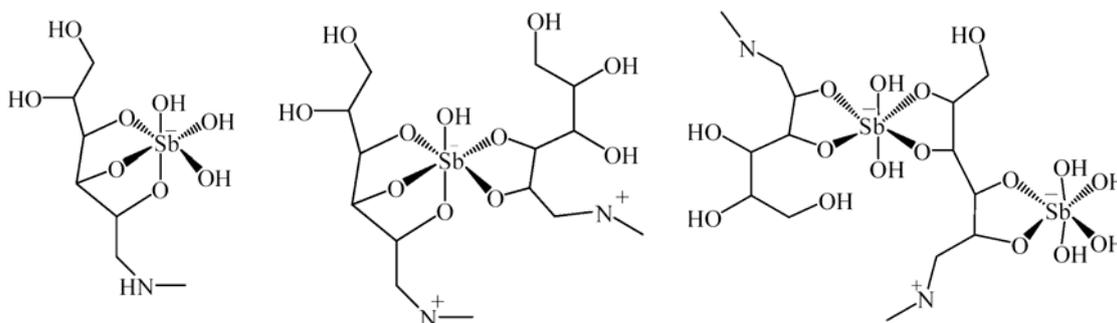


Figura 1.6: Estruturas químicas propostas recentemente para o AM, após seu estudo por ESI-MS.

Esses compostos são administrados diariamente por via intravenosa ou intramuscular (20 mg de Sb/Kg), durante um período de 20 a 40 dias, porém, por serem freqüentes os casos de resistência, administrações diárias podem ser realizadas por mais de quatro meses [17]. Mesmo apresentando excreção renal rápida, esses antimoniais freqüentemente apresentam efeitos colaterais, principalmente no final do tratamento [7,12].

Apesar de serem utilizados por cerca de sessenta anos no tratamento das leishmanioses, pouco se sabe sobre o metabolismo [18], mecanismo de ação [19, 20, 21] e de toxicidade [19] dos antimoniais pentavalentes. Ainda não foram identificadas a forma final do princípio ativo e seu alvo biológico. Entretanto, supõe-se que a atividade dos antimoniais pentavalentes requer sua dissociação e transferência do metal para uma ou várias biomoléculas [12].

Um estudo demonstrou que a baixa toxicidade do Sb (V) poderia ser atribuída em parte, às altas taxas de excreção deste em relação à forma trivalente [22]. Mais tarde, a redução de Sb(V) a Sb(III) no organismo foi comprovada através de dosagens realizadas em amostras de sangue e urina humana e parece ser fundamental na atividade farmacológica [23, 24]. Entretanto, o local da redução, bem como a biomolécula que promoveria tal reação, permaneceram desconhecidos. Recentemente, nosso grupo de

pesquisa propôs que tióis intracelulares poderiam estar envolvidos, como agentes redutores, na conversão *in vivo* do Sb (V) a Sb (III). Essa hipótese se baseia na observação de que, no AM, a glutatona e a tripanotona, principais tióis encontrados nos macrófagos e no parasito, podem promover a redução de Sb (V) a Sb (III) em condições próximas às fisiológicas [21].

Cabe ressaltar que formulações tópicas do Pentostam<sup>®</sup> não revelaram ação terapêutica satisfatória para o tratamento da LC, provavelmente isso se deve á baixa absorção destes compostos hidrofílicos por esta via de administração [25].

### 1.2.2- Anfotericina B

O uso de formulações contendo anfotericina B (Figura 1.7) para o tratamento das leishmanioses é bioquimicamente racional, pois, esse antifúngico inibe a síntese do ergosterol, o principal esterol constituinte da membrana celular das espécies de *Leishmania*. Antes de 1990 este fármaco era administrado raramente em função das reações adversas decorrentes de sua infusão. Atualmente, novas formulações da anfotericina B a base de lipídeos estão sendo utilizadas com freqüência no tratamento da LV devido a sua reduzida toxicidade, constituindo o maior avanço na quimioterapia anti-leishmanial dos últimos anos. O aumento do uso deste fármaco se deve principalmente ao aparecimento de muitos casos de LV resistente ao antimonial e a pentamidina [26].

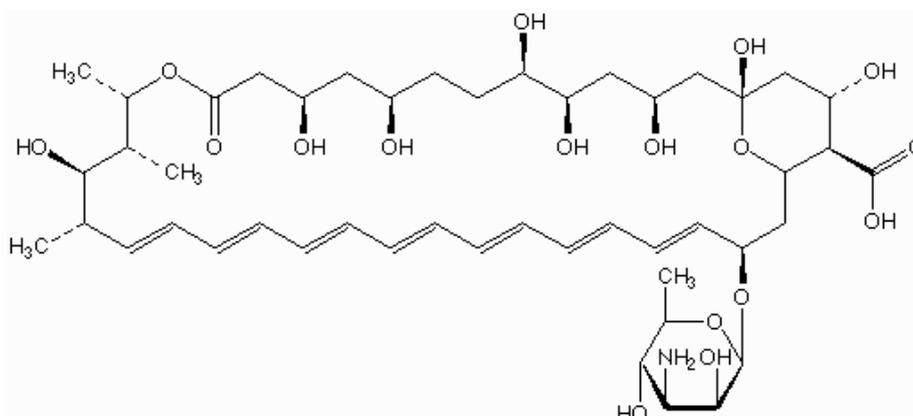


Figura 1.7: Estrutura química da anfotericina B.

### 1.2.3- Pentamidina

Na Índia, com intuito de contornar o problema da resistência clínica ao antimônio, a pentamidina tem sido utilizada para o tratamento da LV, porém, devido à alta dosagem e ao longo período de tratamento, esta droga é mais tóxica do que os regimes com antimoniais [26].

A pentamidina (Figura 1.8) é comercializada sob duas formas: o dimetanosulfonato (mesilato) e o isotionato, que por ser menos pancreatotóxico é mais utilizado. Sua administração pode ser realizada pelas vias inalatória, intramuscular ou endovenosa, e causa vários efeitos colaterais indesejáveis. O mecanismo de ação da pentamidina não está bem esclarecido. Sua atividade pode estar associada a interações com o DNA ou com nucleotídeos e seus derivados, ou por interferência na captação de poliaminas.

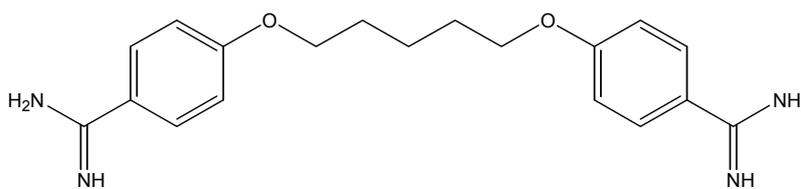


Figura 1.8: Estrutura química da pentamidina.

### 1.2.4- Hexadecilfosfocolina

A localização intracelular da *Leishmania* dificulta a ação dos fármacos, pois, estes necessitam atravessar barreiras biológicas específicas (membrana plasmática, epitélio do trato gastrointestinal e pele) para atuarem [5]. A principal vantagem dos fármacos lipofílicos é sua grande facilidade em atravessar tais obstáculos, entretanto, compostos muito apolares tendem a ficar retidos na camada lipídica dessas barreiras, o que dificulta sua absorção e restringe sua utilização. Assim, o uso de fármacos ou sistemas anfifílicos é uma proposta mais apropriada e racional.

Princípios ativos lipofílicos apresentam a possibilidade de serem administrados oralmente e/ou em aplicação tópica. É o caso de um dos derivados da fosfocolina, o hexadecilfosfocolina (Miltefosina<sup>®</sup>), que foi avaliado

inicialmente para o tratamento de câncer e encontra-se em uso na Índia para o tratamento oral da LV (Figura 1.9). Os resultados preliminares desses estudos mostraram uma elevada eficácia desse medicamento por via oral, mas, ao mesmo tempo, efeitos tóxicos indesejáveis foram relatados [27].

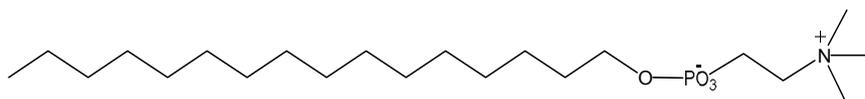


Figura 1.9: Estrutura química da hexadecilfosfocolina.

Neste contexto, a obtenção de antimoniais anfifílicos poderá facilitar a passagem de Sb através das barreiras biológicas, propriedade que também poderá ser explorada no desenvolvimento de um tratamento oral e/ou tópico das leishmanioses. As alquilmetilglucamidas octanoil N-metil-glucamida (LA8), decanoil N-metil-glucamida (LA10) e dodecanoil N-metil-glucamida (LA12) foram utilizadas como ligantes na obtenção destes antimoniais (Figura 1.10).

Por apresentarem cabeça polar, com sítios de ligação para o Sb [14], e cauda hidrocarbônica, os novos antimoniais poderão formar micelas, lipossomas ou nanoagregados (Figura 1.11) [28], e direcionar sua captação pelas células fagocitárias (macrófagos) que hospedam o parasito [29].

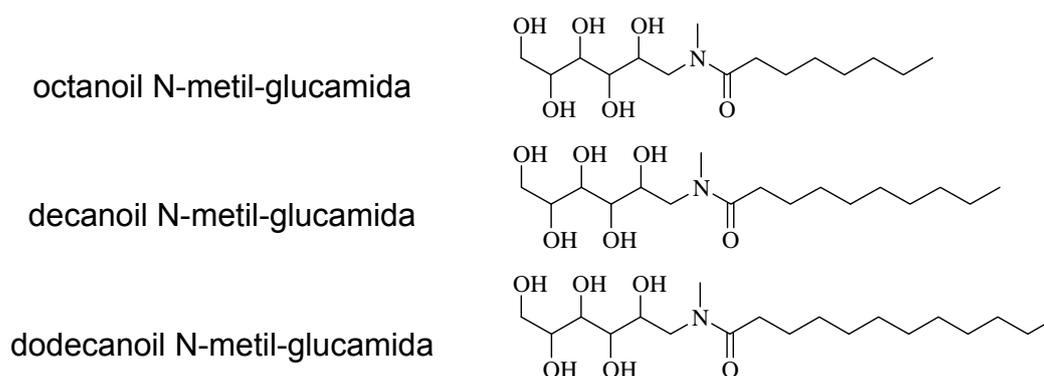


Figura 1.10: Ligantes anfifílicos utilizados na obtenção dos novos complexos de Sb(V).

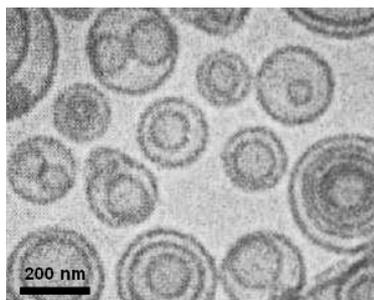


Figura 1.11: Vesículas de fosfatidilcolina de ovo com uma alquimetilglucamida, preparadas por diálise lenta. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão [28].

Fonte: Walter, A., *et al.* Biochimica et Biophysica Acta, n. 1029, p. 67-74, 1990.

### 1.3- Uso de nanocarreadores para os fármacos leishmanicidas

#### 1.3.1- Formulações a base de ciclodextrinas (CD)

As ciclodextrinas são sistemas formados por 6-12 unidades cíclicas de glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1-4), e são muito utilizadas como carreadores de drogas [30]. Esses veículos têm sido amplamente aplicados para melhorar a solubilidade, a velocidade de dissolução, a estabilidade e a biodisponibilidade de fármacos, e obtiveram sucesso em formulações orais [31]. A estrutura das ciclodextrinas apresenta um formato tronco cônico, com uma cavidade interna hidrofóbica capaz de associar-se a moléculas apolares de diâmetro apropriado (Figura 1.12).

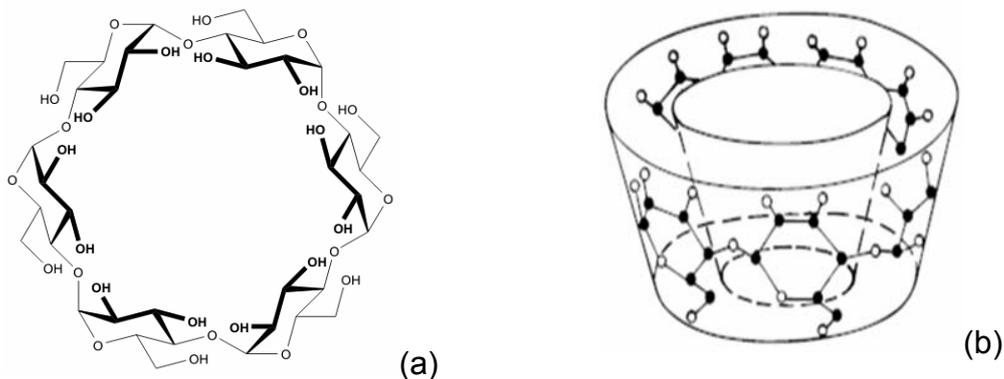


Figura 1.12: Esquema geral da estrutura das ciclodextrinas, com vista superior (a) e frontal da cavidade hidrofóbica (b) [32].

Fonte: <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:AlphaCyclodextrin\\_structure.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:AlphaCyclodextrin_structure.png)>. Acesso: 10/01/2010.

Um estudo recente realizado em camundongos *Swiss* mostrou que a administração oral de uma formulação do AM com a  $\beta$ -CD permitiu aumentar a absorção do antimonial [33]. A caracterização desta composição por espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS) identificou, além do AM e da CD, um complexo ternário meglumina-Sb-CD [34]. Esta pesquisa também mostrou que o aquecimento do AM livre, sem CD, procedimento empregado na preparação da formulação AM: $\beta$ -CD, provoca a despolimerização dos complexos de elevada massa molar, (meglumina-Sb)<sub>n</sub> e (meglumina-Sb)<sub>n</sub>-meglumina, a complexos menores (Sb-meglumina 1:1), melhorando em aproximadamente duas vezes a absorção oral de Sb em camundongos, em relação ao antimonial não aquecido [34]. Estes resultados sugerem que a baixa biodisponibilidade do AM por via oral se deve, pelo menos em parte, ao seu elevado grau de polimerização. De forma importante, estes autores mostraram que a indução de despolimerização, seja pelo aquecimento ou pela interação com a  $\beta$ -CD, resulta em um aumento da biodisponibilidade do princípio ativo.

### **1.3.2- Formulações a base de lipossomas**

O uso de lipossomas como veículos de fármacos é uma tendência na indústria farmacêutica e tem permitido o desenvolvimento de medicamentos mais eficientes, a partir de drogas clássicas já conhecidas. Os lipossomas são vesículas esféricas, constituídas de uma ou mais bicamadas lipídica, que se organizam de maneira semelhante à membrana celular e são capazes de armazenar substâncias hidrossolúveis em seu interior e lipossolúveis na bicamada lipídica (Figura 1.13). Por serem capturadas rapidamente pelos macrófagos, presentes principalmente no fígado, baço e medula óssea, estas vesículas podem direcionar a droga para os sítios de infecção, melhorando sua disponibilidade para interação com o parasito [9, 29].

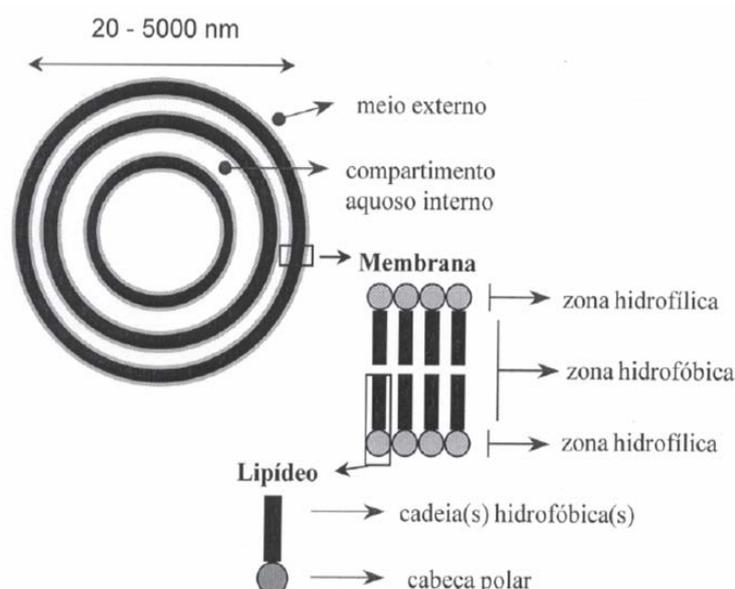


Figura 1.13: Esquema geral da estrutura dos lipossomas [29].

Fonte: Frézard, F., *et al.* Quím. Nova, v. 28, n. 3, 2005.

Ensaio envolvendo a anfotericina B incorporada em lipossomas vêm apresentando resultados promissores. A AmBisome<sup>®</sup>, formulação comercial a base de lipossomas, foi usada com sucesso no tratamento de pacientes não responsivos a outras drogas disponíveis no mercado [35] e no tratamento de pacientes reincidentes [9] (Figura 1.14). A grande eficácia em pacientes imunocompetentes (100%), associada à baixa incidência de efeitos colaterais, rendeu-lhe aprovação pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) como a primeira apresentação à base de lipossomas a ser reconhecida para o tratamento da LV [36]. Entretanto, este medicamento é administrado por meios invasivos e seu alto custo restringe sua utilização aos países ricos.

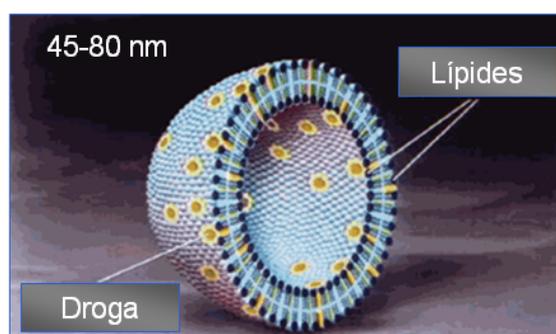


Figura 1.14: Lipossoma unilamelar pequeno (SUV) com a anfotericina B (amarelo) incorporada à bicamada lipídica (azul) [37].

Fonte: <<http://www.rxlist.com/ambisome-drug.htm>>. Acesso: 11/11/2009

Estudos pré-clínicos em modelos experimentais de LV revelaram que o AM encapsulado em lipossomas é entre 200-700 vezes mais eficaz que o AM na forma livre (Figura 1.15) [38, 39].

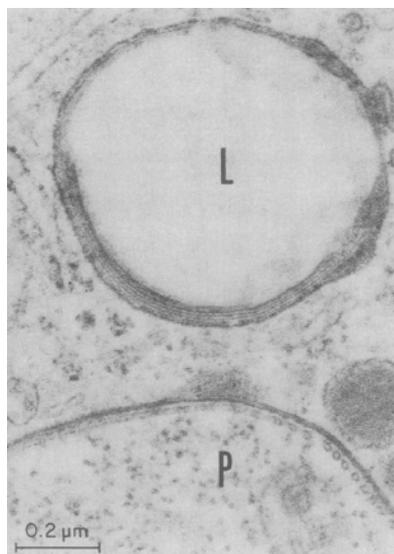


Figura 1.15: Imagem obtida por microscopia eletrônica do fígado de um hamster, mostrando a detalhada estrutura lamelar de um lipossoma (L) adjacente a *Leishmania* intracelular (P) [38].

Fonte: Alving C. R., *et al.* Medical Sciences, v. 75, p. 2959-2963, 1978.

Recentemente, uma nova formulação lipossomal do AM foi administrada por via intravenosa em cães da raça Beagle ocasionando um direcionamento de Sb para o fígado, baço e medula óssea. Mesmo tendo sido aplicada uma dose onze vezes menor (4 mg Sb/Kg) que a administrada com o AM livre (45 mg Sb/Kg), os níveis teciduais de antimônio atingidos pela forma encapsulada foram significativamente superiores. Essa nova formulação pode ser armazenada liofilizada e, no momento do uso, sua reidratação permite a obtenção de lipossomas pequenos multilamelares, responsáveis pela acumulação da droga nos sítios onde se localizam os parasitos [40].

Desde que os antimoniais começaram a ser reformulados com lipossomas, trinta anos se passaram e o mercado ainda não dispõe de um antimonial lipossomal. Isso pode estar relacionado às dificuldades tecnológicas de se obter uma formulação estável e/ou ao desinteresse da indústria farmacêutica em relação às doenças negligenciadas.

#### 1.4- Complexos metálicos anfifílicos

Complexos metálicos anfifílicos podem facilitar a veiculação de metais através das membranas biológicas, portanto, são considerados uma boa estratégia no planejamento racional de novos fármacos.

Compostos de platina são agentes antitumorais bem estabelecidos no uso clínico. Um trabalho recente mostra a obtenção de novos complexos anfifílicos de platina(II) e platina(IV) com ligantes N-alkilados de cadeia longa derivados da 1,2-etanodiamina e da 1,3-propanodiamina. Tendo em vista as propriedades anfifílicas desses complexos, alguns deles foram incorporados em lipossomas furtivos e apresentaram boa taxa de encapsulação [41].

Por apresentar grande atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro*, o rutênio (Ru) é um dos metais mais promissores no desenvolvimento de drogas contra o câncer. Nano-vetores lipídicos foram considerados ideais para a veiculação de complexos de Ru. Portanto, a obtenção de um composto anfifílico de Ru que se organiza de maneira semelhante a vesículas pode permitir o direcionamento deste metal para seu sítio de ação. Assim, um novo composto anfifílico de Ru foi planejado e obtido pela complexação deste metal com um ligante sintetizado a partir de um derivado da uridina. Após dissolução em pH fisiológico e extrusão em membrana de policarbonato, este complexo anfifílico formou vesículas unilamelares e multilamelares, abrindo desta maneira novas perspectivas na aplicação de sistemas supramoleculares de Ru na terapia anti-câncer [42].

Em um outro trabalho, novos ligantes anfifílicos foram sintetizados através da reação do ácido dianidrido dietileno triamino pentacético com o octadecil éster de tirosina ou com a fenilalanina. A partir destes ligantes, complexos metálicos paramagnéticos de  $Gd^{III}$ ,  $Yb^{III}$  e  $Mn^{II}$  foram obtidos e caracterizados. Esses complexos anfifílicos foram incluídos na bicamada lipídica de lipossomas e as vesículas paramagnéticas obtidas apresentaram grande tempo de relaxação ( $R_1$ ) em relação aos prótons aquosos da vizinhança. Estes compostos foram sintetizados para serem utilizados como agentes de contraste em imagens obtidas por ressonância magnética (MRI).

Em relação à tomografia computadorizada esta técnica oferece uma melhor visualização dos diferentes tecidos moles do corpo [43].

### **1.5- A necessidade de se buscar um tratamento oral e tópico para as leishmanioses**

No Brasil, além de ser extremamente tóxica [12, 26], a terapia utilizada no tratamento das leishmanioses prediz a administração injetável do AM por um longo período de tempo, podendo se estender por até quatro meses. Os efeitos colaterais geralmente aparecem no final do tratamento e alguns pacientes desenvolvem problemas no coração, nos rins e no fígado. Um outro fator que limita a adesão dos pacientes ao tratamento é sua grande ocorrência em zonas rurais com pouca assistência médica. Nesse contexto, desistências do tratamento tornam-se freqüentes e, além de aumentar os reservatórios da doença, essa atitude ajuda a selecionar formas resistentes do parasito.

Infelizmente a humanidade ainda não dispõe de medicamentos práticos, seguros e eficazes contra as leishmanioses. Cabe ressaltar que também não existe um tratamento tópico eficaz que possa substituir a terapia convencional no tratamento da leishmaniose cutânea. Em face dessas limitações, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a busca de fármacos e formulações que possam ser administrados por vias mais simples e seguras, como a oral e tópica [42]. Além de facilitar a utilização do medicamento, estes novos procedimentos de administração ajudariam a aliviar o sistema de saúde, pois, dispensam a internação do paciente e, conseqüentemente, a utilização de um grande número de leitos hospitalares.

## 1.6- Objetivos

- Obter o estibogluconato de sódio (SSG) e fazer sua caracterização físico-química.
- Obter uma formulação do estibugluconato de sódio (SSG) com a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), SSG: $\beta$ -CD 1:1, fazer sua caracterização físico-química e avaliar a absorção de Sb por via oral, em camundongos *Swiss*, promovida por esta formulação.
- Obter uma formulação antimoniato de meglumina (AM) com a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), AM: $\beta$ -CD 7:1, fazer sua caracterização físico-química e avaliar a absorção de Sb por via oral, em camundongos *Swiss* e em cães da raça Beagle, promovida por esta formulação.
- Obter novos complexos anfifílicos de Sb(V), a partir dos ligantes octanoil N-metil-glucamida (LA8), decanoil N-metil-glucamida (LA10) e dodecanoil N-metil-glucamida (LA12), fazer sua caracterização físico-química e avaliar a absorção de Sb por via oral, em camundongos *Swiss*, promovida por estas formulações.

## CAPÍTULO 2- Materiais e métodos

### 2.1- Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e estão listados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Reagentes utilizados na parte experimental.

Reagentes	Origem
N-metil-d-glucamina (NMG)	Aldrich Chemical Co.
Ácido glucônico (GLU)	Aldrich Chemical Co.
Pentacloreto de antimônio (SbCl <sub>5</sub> )	Aldrich Chemical Co.
Hexahidróxido antimoniato de potássio (KSb(OH) <sub>6</sub> )	Fluka Chemie GmbH
Ácido clorídrico	Aldrich Chemical Co.
Hidróxido de sódio (NaOH)	Aldrich Chemical Co.
Hidróxido de potássio (KOH)	Grupo Química
Clorofórmio	Merck
Acetona	Merck
n-octanol	Merck
Metanol	Merck
Etanol	Merck
Octanoil N-metil-glucamida (LA8)	Sigma
Decanoil N-metil-glucamida (LA10)	Sigma
Dodecanoil N-metil-glucamida (LA12)	Sigma
β-ciclodextrina (C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub> • 11H <sub>2</sub> O)	Sigma
Nitrato de Paládio (Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	Perkin Elmer®
Nitrato de Magnésio (Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	Perkin Elmer®
Ácido nítrico	Aldrich Chemical Co.

### 2.2- Microanálises

Os percentuais dos elementos C, H e N foram determinados nos compostos sintetizados usando um analisador CHN/S Perkin Elmer modelo 2400 (Departamento de Química, UFMG).

### 2.3- Espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS)

O teor de antimônio nas formulações e no soro dos camundongos *Swiss* foi determinado por espectroscopia de absorção atômica em um espectrômetro Perkin Elmer® AAnalyst 600 (GFAAS), equipado com plataforma de aquecimento do tipo forno de grafite e corretor Zeeman de back ground (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG).

As amostras foram diluídas 60 vezes em HNO<sub>3</sub> (0,2%) e lidas em 217,6 nm, com auxílio dos modificadores universais paládio e magnésio. As temperaturas utilizadas na pirólise e atomização foram 1100 °C e 1900 °C respectivamente e o sinal medido foi toda área do pico.

O método utilizado [18] foi certificado no laboratório de pesquisa do Prof. Frédéric Frézard (ICB-UFMG) e as figuras de mérito determinadas encontram-se representadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Representação das figuras de mérito para determinação de Sb em soro por GFAAS.

Faixa de calibração (µg L <sup>-1</sup> )	Coef. de determinação (r <sup>2</sup> )	Linearidade (µg L <sup>-1</sup> )	Limite de detecção (µg L <sup>-1</sup> )	Limite de quantificação (µg L <sup>-1</sup> )	Precisão (%CV)	Exatidão (% de recuperação)
0 - 200	0,9973	20 - 200	1,77	5,44	< 5 *	99 - 111

\* para medidas com teor de Sb entre 40 – 200 (µg L<sup>-1</sup>)

### 2.4- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um equipamento Perkin Elmer® FT-IR System Spectrum GX (Departamento de Química, UFMG), na região de 4000-400 cm<sup>-1</sup> e resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr.

## 2.5- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear das amostras foram obtidos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFMG (LAREMAR/UFMG) utilizando-se os espectrômetros Bruker AVANCE DPX 200 e Bruker AVANCE DRX 400.

Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN das composições AM: $\beta$ -CD 7:1, AM+ $\beta$ -CD (7+1) e AM foram obtidos no espectrômetro Bruker AVANCE DPX 200 MHz a 25 °C. Estas amostras foram preparadas em  $\text{D}_2\text{O}$  nas concentrações de 0,04 mol/L Sb e/ou 0,0057 mol/L  $\beta$ -CD. Os deslocamentos químicos verificados foram calibrados pelo sinal da água (4,75 ppm).

Já os espectros de  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, DEPT, HMQC e COSY do complexo Sb-LA8 e do ligante octanoil-N-metil-glucamida, foram obtidos no espectrômetro Bruker AVANCE DRX 400 MHz a 25 °C. As amostras foram preparadas em  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CDCl}_3$  e DMSO, na concentração de 25 mg/mL.

## 2.6- Analisador de tamanho de partículas

O diâmetro hidrodinâmico médio dos lipossomas e o índice de polidispersividade da suspensão foram determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), com um ângulo de espalhamento de 90°, usando um analisador de tamanho de partículas modelo Zetasizer 3000 Malver Instruments (Departamento de Química, UFMG).

A análise de tamanho de partícula das composições AM: $\beta$ -CD 7:1, AM+ $\beta$ -CD (7+1) e AM, foram realizadas em diferentes intervalos de tempo, após dissolução do pó liofilizado em água na concentração de 0,04 mol/L Sb e 0,0057 mol/L  $\beta$ -CD (25°C).

## 2.7- Medidas de dicroísmo circular (DC)

As análises por dicroísmo circular (DC) foram realizadas em atmosfera de nitrogênio entre 190–280 nm, utilizando-se um espectrômetro Chirascan™ com resolução de comprimento de onda igual a 0,1 nm e cubeta de quartzo com caminho ótico de 0,1 mm (Departamento de Fisiologia e Biofísica,

ICB/UFMG).

Estes estudos permitiram avaliar a dissociação dos nanoagregados formados pelo complexo Sb-LA8, a 25 °C e a 60 °C, e sua cinética de formação a 60 °C.

### **2.7.1- Estudo da dissociação dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 a 25 °C por DC**

Para avaliar a dissociação dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 a 25 °C, uma solução deste foi preparada na concentração 2,5 mmol/L de Sb e os espectros de DC obtidos nos tempos: 0 min, 15 min e 30 min. Uma solução preparada a partir da mistura do  $\text{KSb}(\text{OH})_6$  (2,5 mmol/L de Sb) e do LA8 (7,5 mmol/L) foi utilizada como modelo de complexo dissociado. O ligante LA8 (7,5 mmol/L) também foi avaliado na ausência de Sb. O composto  $\text{KSb}(\text{OH})_6$  não é detectável por DC, portanto, somente o ligante foi avaliado diretamente.

### **2.7.2- Estudo da dissociação dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 a 60 °C por DC**

Para avaliar o comportamento dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 após seu aquecimento a 60 °C, uma solução deste foi preparada na concentração 2,5 mmol/L de Sb e os espectros de DC obtidos nos tempos: 0 min (25 °C), 15 min e 30 min, após aquecimento a 60 °C. O ligante LA8 (7,5 mmol/L) também foi avaliado na ausência de Sb.

### **2.7.3- Estudo da cinética de formação do complexo Sb-LA8 e seus nanoagregados a 60 °C por DC**

Para avaliar a formação do complexo Sb-LA8 e de seus nanoagregados, foi preparada uma solução concentrada a partir da mistura do  $\text{KSb}(\text{OH})_6$  (50 mmol/L de Sb) e do LA8 (150 mmol/L) e seus espectros de DC obtidos nos tempos: 0 min (25 °C), 30 min, 60 min e 120 min, após aquecimento a 60 °C. Antes de cada leitura a amostra era diluída 20 vezes. O ligante LA8 (7,5 mmol/L de Sb) também foi avaliado na ausência de Sb.

## 2.8- Espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray

Os espectros de massa foram obtidos em um equipamento ESI Q-ToF Micro™ (ICB/UFMG) ou em um equipamento Waters/Micromass QToF-2 (Manchester, UK), com fonte Z-spray operando nos modos positivo e negativo. Nos experimentos realizados no QToF, a voltagem capilar foi entre 3-3,5 kV e a voltagem do cone da amostra foi de 40 V [45, 46]. O equipamento Q-ToF-2 foi utilizado em experimentos conduzidos com cone de voltagem baixo (18-20 V). Neste caso, a fonte de temperatura do bloco e o gás de desolvatação de nitrogênio foram ajustados para 100 °C e 20 °C, respectivamente, e as voltagens do capilar mantidas a 2.8 kV. A pressão do gás na célula de colisão foi  $\sim 3.0 \times 10^{-5}$  mbar.

Nos espectros ESI-MS de antimoniais, íons complexos contendo Sb são facilmente reconhecidos devido aos seus isótopos (proporção de  $^{121}\text{Sb}$ : $^{123}\text{Sb}$ , 57:43). O número de átomos de Sb em cada complexo também pode ser determinado a partir dos isótopos de origem. Cada espécie está indicada com o valor de  $m/z$  do primeiro pico isotópico. A previsão teórica de relação isotopomérica foi realizada usando um Calculador Molecular de Peso.

As calibrações dos espectrômetros foram realizadas com iodeto de sódio e iodeto de céσιο na faixa de 100 a 2000  $m/z$ . As amostras foram preparadas em água deionizada, contendo ou não 0,1% TFA e introduzidas com um fluxo de 5-10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Os dados foram analisados no software MassLynx® 4.0.

## 2.9- Análise térmica

As análises térmicas (TG/DTG/DTA) foram realizadas em um equipamento NETZSCH-STA 409 EP (Departamento de Química, UFMG).

Os estudos foram feitos entre 25 e 800 °C, com uma razão de aquecimento de 10 °C/min e com uma vazão média de 10 mL/min de ar comprimido.

## **2.10- Medidas de condutância eletrolítica**

As medidas de condutância eletrolítica foram realizadas utilizando-se um condutivímetro Digimed, modelo DM31 (Departamento de Química, UFMG), equipado com célula condutimétrica de 3 mL de capacidade e constante igual a  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Foram preparadas soluções aquosas do padrão ( $10^{-3} \text{ mol/L}$ ) de NaCl, KCl,  $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{CaCl}_2$  para calibração do equipamento.

As determinações da condutância eletrolítica dos antimoniais foram realizadas à temperatura ambiente ( $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ), em soluções aquosas  $10^{-3} \text{ mol/L}$  de Sb.

## **2.11- Determinações de pH**

As medidas de pH foram realizadas com um potenciômetro Micronal, modelo B371 (Departamento de Química, UFMG). Antes de ser utilizado o aparelho era calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

## **2.12- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As características micro e nanoestruturais dos complexos anfifílicos de Sb (forma e tamanho de partículas, poros, grãos, aglomerados) foram avaliadas, utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM-840A, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise, no Departamento de Física/UFMG.

Para evitar efeitos de carga dentro da câmara do microscópio, as amostras foram submetidas ao processo de metalização por sputtering, resultando em deposição de um finíssimo filme de ouro ( $\sim 40 \text{ nm}$ ) sobre a superfície do pó.

## **2.13- Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

As características micro e nanoestruturais dos complexos anfifílicos de Sb também foram estudadas em um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2–Spirit - FEI - 2006 (120 kV), com câmera CCD e câmera de

negativos; resolução de linha: 0,34nm; resolução de ponto: 0,49 nm; aumento de 22 a 300.000 vezes, Cs:6,3 (aberração esférica) implicando em alto contraste (Centro de Microscopia da UFMG).

As amostras foram diluídas em água (0,001 mol/L Sb), depositadas sobre películas de formvar e coradas com acetato de uranila 5%.

#### **2.14- Osmolaridade**

Os estudos de osmolaridade foram realizados em um freezing point osmometer  $\mu$ OSMETTE™ Model 5004, Precision Systems Inc. (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG).

Para realização deste experimento foi preparada uma solução do SSG (0,7 mol/L de Sb) em água deionizada. Esta solução foi diluída 0,1 mol/L de Sb, incubada a 37 °C e lida em triplicata no freezing point osmometer em função do tempo.

#### **2.15- Liofilizador**

As formulações AM: $\beta$ -CD 7:1 e SSG: $\beta$ -CD 1:1 foram liofilizadas em um aparelho Labconco Freeze Dry System/Freezone 4.5 (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG).

#### **2.16- Centrífuga**

As amostras de sangue foram centrifugadas em uma centrífuga Jouan modelo MR 23i (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG).

#### **2.17- Síntese do estibogluconato de sódio (SSG)**

Primeiramente, foram solubilizados 10 g de ácido glucônico (Figura 2.1) em 500 mL de água deionizada e, em quantidade equimolar, 10,537 g de Sb(OH)<sub>5</sub> foram adicionados a esta solução. O Sb(OH)<sub>5</sub> foi previamente obtido pela hidrólise do SbCl<sub>5</sub> em água e separado por centrifugação (4000 rpm/10 min). A solução foi submetida à agitação e aquecimento (55 °C) e seu pH

mantido em sete, com auxílio de NaOH e HCl, até ela ficar límpida. Após esta etapa, a solução ficou em repouso até esfriar e o complexo obtido foi precipitado com acetona e seco. O rendimento desta síntese foi de aproximadamente 70%. Este produto foi sintetizado de acordo com a rota sintética relatada no pedido de patente PI 0106305-7 [47].

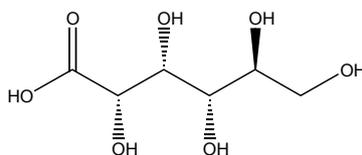


Figura 2.1: Ácido glucônico.

### 2.18- Preparo da formulação do estibogluconato de sódio com a $\beta$ -ciclodextrina (SSG: $\beta$ -CD 1:1)

O SSG foi associado a  $\beta$ -CD na relação molar 1:1. Para isso, o SSG (0,1 mol/L de Sb) e a  $\beta$ -CD (0,1 mol/L) foram solubilizados separadamente em banho-maria (60°C) e, após serem misturados, a solução obtida foi mantida sob agitação (60°C) durante 3 horas. Depois, esta solução foi congelada em N<sub>2</sub> líquido e liofilizada. O pH não foi ajustado durante a preparação.

### 2.19- Avaliação da absorção oral de Sb em camundongos *Swiss* a partir das formulações do SSG e da formulação SSG: $\beta$ -CD (1:1)

Camundongos *Swiss* pesando entre 20-30 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Cebio), receberam por gavagem diversas formulações do SSG e a composição SSG/ $\beta$ -CD, na dose de 80 mg Sb/Kg. Os animais (n=5) foram sacrificados nos tempos de 30 minutos e 3 horas e o sangue foi coletado por punção cardíaca (Procedimento aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG, Protocolo 004/2003). O soro foi separado por centrifugação (3000 g/10 min) e congelado (-20 °C) para posterior doseamento de Sb por GFAAS. O SSG foi utilizado como controle neste estudo.

Preparação das formulações do SSG e da formulação SSG: $\beta$ -CD (1:1):

Grupo 1: No momento da administração foi preparada uma solução do SSG em água (25 °C) na concentração 0,06 mol/L de Sb. O volume de administração por animal foi 300 µL.

Grupo 2: No dia anterior à administração foi preparada uma solução do SSG em água na concentração 0,06 mol/L de Sb. Esta solução foi aquecida a 60 °C, durante 3 h e armazenada a 25 °C. O volume de administração por animal foi 300 µL.

Grupo 3: No dia anterior à administração foi preparada uma solução concentrada do SSG em água na concentração 0,65 mol/L de Sb. Esta solução foi aquecida a 60 °C, durante 3 h e armazenada a 25 °C. No momento da administração, esta solução foi diluída para 0,06 mol/L de Sb. O volume administrado por animal foi 300 µL.

Grupo 4: No momento da administração foi preparada uma solução do composto SSG:β-CD (1:1) em água (25 °C) na concentração 0,06 mol/L de Sb. O volume de administração por animal foi 300 µL.

## 2.20- Síntese do antimoniato de meglumina (AM)

Este produto foi sintetizado de acordo com a rota sintética relatada no pedido de patente PI 0106305-7 [47].

Primeiramente, foram solubilizados 10 g de N-metil-d-glucamina (Figura 2.2) em 500 mL de água deionizada e, em quantidade equimolar, 10,537 g de Sb(OH)<sub>5</sub> foram adicionados a esta solução. O Sb(OH)<sub>5</sub> foi previamente obtido pela hidrólise do SbCl<sub>5</sub> em água e separado por centrifugação (4000 rpm/10 min). A solução foi submetida à agitação e aquecimento (55 °C) e seu pH mantido em sete, com auxílio de hidróxido de potássio (KOH), até ela ficar límpida. Após esta etapa, a solução ficou em repouso até esfriar e o complexo obtido foi precipitado com acetona e seco. O rendimento desta síntese foi de aproximadamente 70%.

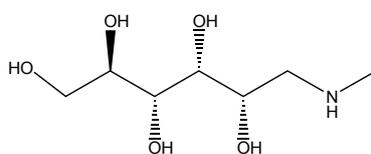


Figura 2.2: N-metil-d-glucamina.

### **2.21- Preparo da formulação do antimoniato de meglumina com a $\beta$ -ciclodextrina (AM: $\beta$ -CD 7:1)**

O AM foi associado a  $\beta$ -CD na relação molar 7:1. Para isso, o AM (0,7 mol/L de Sb) e a  $\beta$ -CD (0,1 mol/L) foram solubilizados separadamente em banho-maria (60°C) e, após serem misturados, a solução obtida foi mantida sob agitação (60°C) durante 3 horas. Depois, esta solução foi congelada em N<sub>2</sub> líquido e liofilizada. O pH não foi ajustado durante a preparação.

### **2.22- Avaliação da absorção oral de Sb em cães da raça Beagle a partir das formulações AM e AM: $\beta$ -CD 7:1**

Três cães fêmeas da raça Beagle de sete anos de idade, saudáveis e pesando entre 10,5 ± 12,5 Kg, foram usadas no estudo farmacocinético. Os cães foram alimentados 6 horas antes da administração das formulações. As soluções do AM: $\beta$ -CD 7:1 e do AM foram preparadas, na concentração de 0,7 mol/L de Sb, quinze minutos antes da sua administração. Foi realizada uma única administração de cada formulação, na dose de 100 mg Sb/Kg de peso, com auxílio de um cateter nasogástrico. As formulações, AM: $\beta$ -CD 7:1 e AM, foram estudadas subsequentemente com um intervalo de quatro semanas. Após cada administração, amostras de sangue foram coletadas por punção na veia jugular nos tempos de 0, 30, 60 e 90 minutos e 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 24 horas. O soro foi separado por centrifugação (3000 g/10 min) e congelado (-20 °C) para posterior doseamento de Sb por GFAAS. O AM foi utilizado como controle neste estudo. (Procedimento aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG, Protocolo 142/2006).

### **2.23- Avaliação da absorção oral de Sb em camundongos *Swiss* a partir das formulações AM e AM: $\beta$ -CD 7:1**

Camundongos *Swiss* fêmeas pesando entre 20-30 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Cebio), receberam por gavagem as composições AM: $\beta$ -CD 7:1 e AM, na dose de 300

mg Sb/Kg, preparadas no momento da administração. Os camundongos foram divididos em grupos de 5 animais por formulação/tempo. Administrou-se por via oral 0,1 mL das composições na concentração de 0,7 mol Sb/L. Os animais foram sacrificados nos tempos de 1 e 3 horas e o sangue foi coletado por punção cardíaca (Procedimento aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG, Protocolo 004/2003). O soro foi separado por centrifugação (3000 g/10 min) e congelado (-20 °C) para posterior doseamento de Sb por GFAAS. O AM foi utilizado como controle neste estudo.

#### **2.24- Síntese dos dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG)**

Nesta síntese, as alquilmetilglucamidas (octanoil N-metil-glucamida, decanoil N-metil-glucamida e dodecanoil N-metil-glucamida), foram adicionadas a uma solução de  $\text{KSb(OH)}_6$  na relação molar 3:1. Primeiramente, solubiliza-se o  $\text{KSb(OH)}_6$  em água deionizada (60 °C) e, em seguida, adiciona-se o ligante anfifílico. O pH da solução não precisa ser ajustado. Após duas horas de reação sob agitação (60 °C) esta solução deve ser seca em chapa aquecedora (60 °C). Depois, o filme translúcido obtido deve ser solubilizado em metanol e seco novamente. Finalmente, o sólido obtido deve ser solubilizado em clorofórmio, seco em chapa aquecedora, raspado e armazenado em dessecador.

#### **2.25- Determinação do coeficiente de partição óleo/água do Sb nos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG)**

Os coeficientes de partição dos complexos anfifílicos de Sb(V) foram determinados em duplicata em sistema n-octanol/água. Primeiramente os complexos eram dissolvidos em n-octanol e, depois, um volume igual de tampão fosfato pH 7,0 era adicionado, resultando em uma concentração final de  $0,5 \cdot 10^{-3}$  mol/L de Sb. A mistura foi agitada mecanicamente e mantida em repouso por 24 h para a distribuição das duas fases do sistema. Após a separação, amostras das duas fases foram coletadas e o teor de Sb dosado por Espectroscopia de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS). Os

resultados são expressos em coeficiente de partição aparente  $[P]$ , obtido pela divisão da concentração de Sb na fase orgânica pela concentração de Sb na fase aquosa. O  $\text{KSb(OH)}_6$  e o AM foram utilizados como referência de antimonial hidrofílico.

## **2.26- Avaliação da absorção oral de Sb em camundongos Swiss a partir dos novos complexos anfifílicos de Sb(V)**

Camundongos *Swiss* pesando entre 20-30 g, provenientes do Cebio, receberam por gavagem os complexos, Sb-LA8, Sb-LA10 e Sb-LA12, na dose de 100 mg Sb/Kg. Os camundongos foram divididos em grupos de 4 animais por formulação/tempo e receberam por via oral 0,2 mL do antimonial na concentração de 0,1 mol Sb/L. Os animais foram sacrificados nos tempos de 1 e 3 horas e o sangue foi coletado por punção cardíaca (Procedimento aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG, Protocolo 004/2003). O soro foi separado por centrifugação (3000 g/10 min) e congelado (-20 °C) para posterior doseamento de Sb por GFAAS. O AM foi utilizado como controle neste estudo, sendo preparado e administrado nas mesmas condições experimentais de concentração e dose.

### CAPÍTULO 3- Caracterização do estibogluconato de sódio (SSG) e da formulação estibogluconato de sódio: $\beta$ -ciclodextrina 1:1 (SSG: $\beta$ -CD 1:1) e avaliação da absorção oral de Sb, em camundongos *Swiss*, promovida por estas formulações

#### 3.1- Introdução

O antimonial pentavalente, estibogluconato de sódio (SSG) é uma das drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses [13]. Recentemente, foi descoberto que os antimoniais pentavalentes também apresentam atividade em modelos experimentais de câncer, hepatite C e AIDS [48]. Apesar destes medicamentos serem utilizados por mais de meio século na medicina, sua estrutura química e composição não foram confirmadas.

A análise do SSG por cromatografia por peneiramento molecular mostrou que ele é composto de múltiplas espécies de peso molecular variando entre 100 e 4000 Da [49], em vez da espécie única Sb-gluconato de sódio 2:2 proposta (Figura 3.1) [48, 50]. Apesar dos conflitantes dados encontrados na literatura, este modelo geralmente tem sido aceito [48].

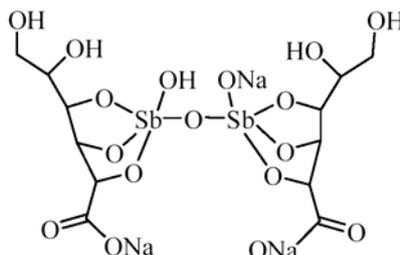


Figura 3.1: Estrutura proposta para o SSG.

Estas incertezas demonstram a necessidade de se reavaliar a estrutura química deste medicamento e o seu comportamento nos fluidos biológicos. Tais elucidações são essenciais para ajudar a compreender o perfil farmacológico do SSG e direcionar o planejamento de fármacos mais potentes e menos tóxicos.

Neste capítulo, a estrutura química e a composição do SSG foram estudadas por medidas de osmolaridade, análises elementares, análises

termogravimétricas, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) e espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray (ESI-MS) nos modos positivo e negativo.

As ciclodextrinas têm sido muito utilizadas pela indústria farmacêutica para melhorar a biodisponibilidade oral de drogas, levando a um aumento da atividade termodinâmica da droga e velocidade de dissolução [30]. Com intuito de modular a absorção de Sb por via oral em camundongos *Swiss* e avançar no desenvolvimento de um medicamento oral para o tratamento das leishmanioses, também foram realizados ensaios preliminares *in vivo* a partir de formulações: SSG e SSG: $\beta$ -CD 1:1.

### **3.2- Caracterização físico-química do estibogluconato de sódio (SSG)**

#### **3.2.1- Análise termogravimétrica do SSG**

No SSG são observadas quatro etapas de decomposição térmica (Figura 3.2).

A primeira, entre 25 e 127,9 °C (14,81%), corresponde a perda de água de cristalização. A segunda (127,9 - 254,7 °C), a terceira (257,16 - 418,5 °C) e a quarta etapa (418,5 - 600 °C) estão relacionadas à decomposição do composto e a perda de matéria orgânica.

Não foi verificada decomposição completa da amostra até 700 °C, a porcentagem de resíduo obtida, 46,95%, é atribuída à presença de óxidos de Sb.

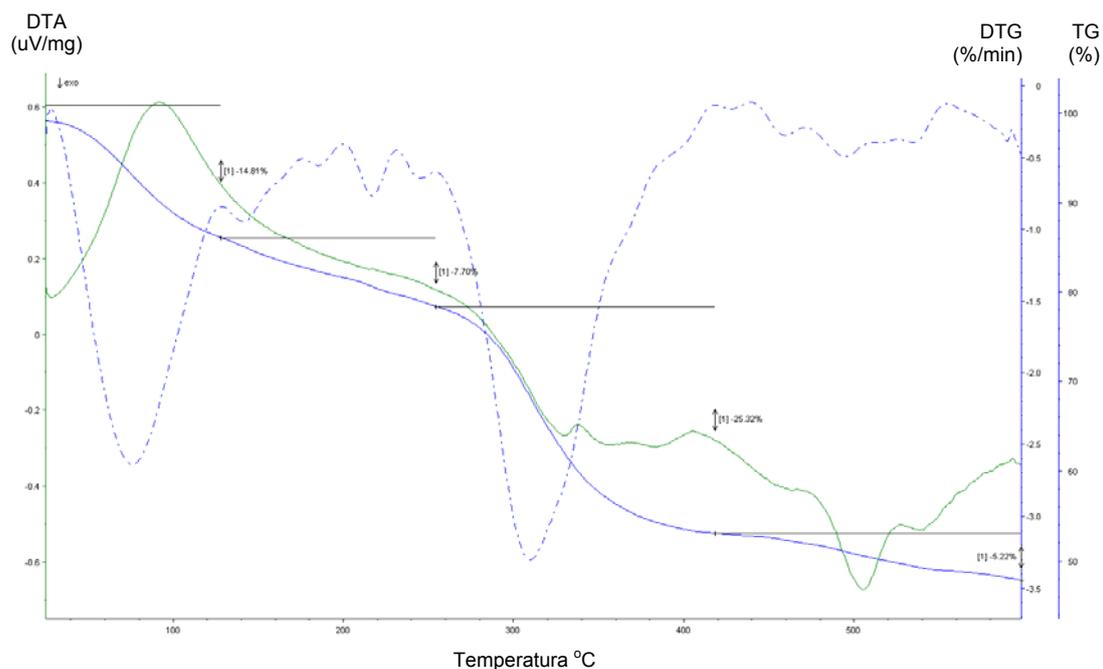


Figura 3.2: Curvas TG, DTG (azul) e DTA (verde) do SSG.

### 3.2.2- Microanálises do SSG

Os resultados dos percentuais dos elementos C, H, Sb e Na do SSG são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Percentuais dos elementos C, H, Sb e Na encontrados para o SSG.

Calculado				Experimental			
$C_{24}H_{33}Na_5O_{33}Sb_4 \cdot 15H_2O$							
%C	%H	%Sb	%Na	%C	%H	%Sb	%Na
16,74	3,66	28,29	6,68	15,94	3,57	28,40	6,70

Considerando a presença das moléculas de água indicadas pela análise termogravimétrica, esses dados e as análises apresentadas a seguir sugerem a formação de complexos oligoméricos entre o Sb(V) e o ácido glucônico (GLU) com a seguinte fórmula mínima:



### 3.2.3- Condutividade do SSG

A medida de condutividade elétrica do SSG foi feita a partir de uma solução aquosa de concentração  $10^{-3}$  mol/L de Sb. Os resultados obtidos foram comparados aos resultados obtidos para eletrólitos padrões de estequiometria 1:1 e 2:1. Os resultados são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Medidas de condutividade elétrica

Composto	( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
KCl	161,4
NaCl	126,3
Ba(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	259,7
CaCl <sub>2</sub>	274,4
SSG	171,2

Observou-se que a condutividade elétrica do SSG é compatível com a presença de eletrólitos de estequiometria 1:1. Esse resultado indica que esses complexos possuem uma carga negativa e um contra íon, Na<sup>+</sup>.

### 3.2.4- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do SSG

Em relação ao espectro do ligante ácido glucônico (GLU) (Figura 3.3), o espectro de absorção no infravermelho do estibogluconato de sódio (SSG) apresentou várias alterações (Figura 3.4).

Houve um estreitamento da banda larga, em  $3427\text{ cm}^{-1}$ , relacionada às vibrações de estiramento dos grupos O-H. A banda de deformação axial de C=O do GLU, em  $1735\text{ cm}^{-1}$ , foi deslocada para  $1675\text{ cm}^{-1}$ , indicando formação do ânion carboxilato. Também observou-se significativa alteração nas bandas de deformação angular no plano dos grupos O-H ( $1412\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$ ) e C-O ( $1132$  e  $1060\text{ cm}^{-1}$ ), sugerindo complexação do Sb com o oxigênio das hidroxilas do GLU [51]. O aparecimento de uma nova banda no espectro do SSG em  $800\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída à vibração de estiramento assimétrico Sb-O e, portanto, à formação do complexo [52].

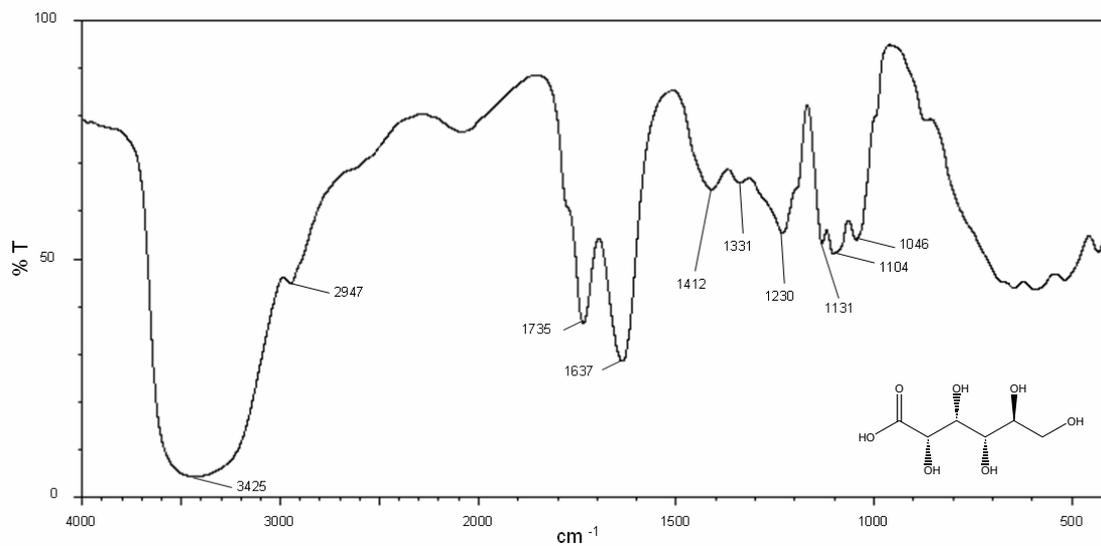


Figura 3.3: Espectro no infravermelho do GLU.

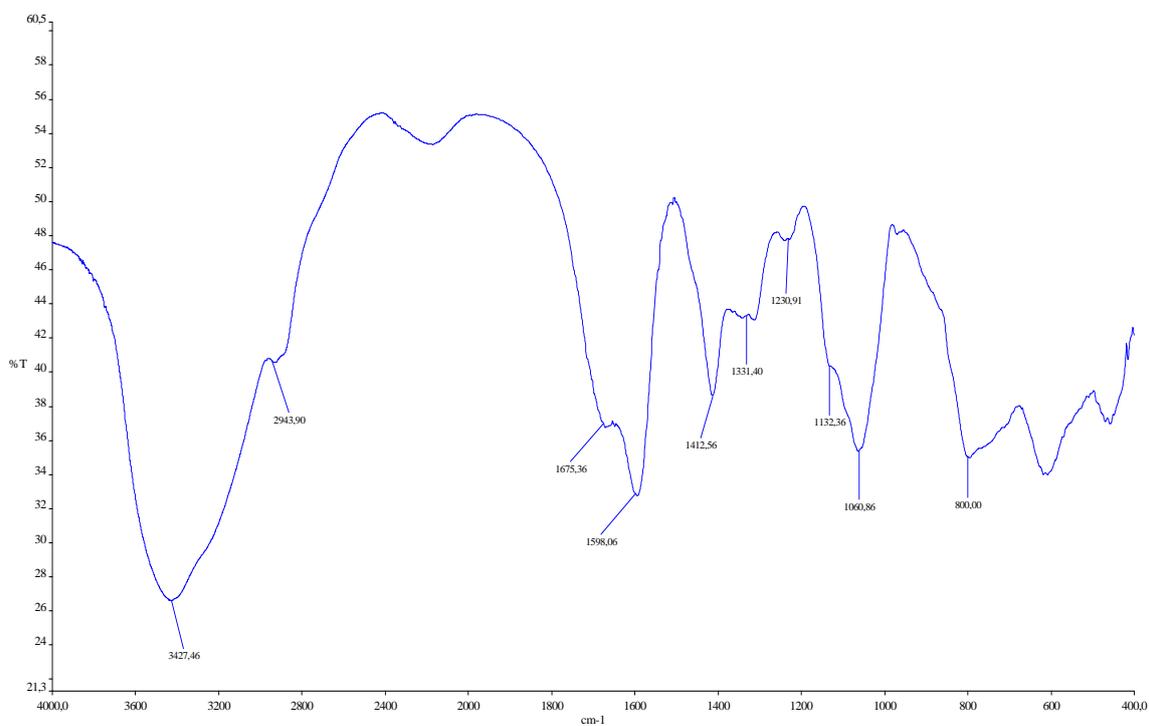


Figura 3.4: Espectro no infravermelho do SSG.

### 3.2.5- Análises do SSG por espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray (ESI-MS) nos modos positivo e negativo

As Figuras 3.5 e 3.6 mostram os espectros ESI-MS do SSG em água nos modos positivo (+) e negativo (-), respectivamente. A Tabela 3.3 apresenta a razão *massa/carga* ( $m/z$ ) das principais espécies observadas no espectro e a respectiva fórmula molecular proposta.

Tabela 3.3: Espécies iônicas identificadas nos espectros de ESI(+)-MS e ESI(-)-MS do SSG (0,005 mol/L Sb) em água <sup>a</sup>.

Espécies catiônicas	$m/z$	Espécies aniônicas	$m/z$
$[\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_2(\text{ONa})_2]^+$	233	$[\text{GLU} - \text{H}]^-$	195
$[\text{GLU} + \text{Na}]^+$	219	$[(\text{GLU} - 4\text{H})\text{Sb}^{\text{III}}]^-$	313
$[\text{GLU} - \text{H} + 2\text{Na}]^+$	241	$365 - 2\text{H}_2\text{O}$	329
$411 - \text{H}_2\text{O}$	393	$365 - \text{H}_2\text{O}$	347
$433 - 2\text{H}_2\text{O}$	397	$[(\text{GLU} - 3\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_3]^-$	365
$[(\text{GLU} - 3\text{H} + 2\text{Na})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_3]^+$	411	$[(\text{GLU} - 4\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})(\text{ONa})]^-$	369
$433 - \text{H}_2\text{O}$	415	$369 + \text{H}_2\text{O}$	387
$[(\text{GLU} - 3\text{H} + 2\text{Na})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_2(\text{ONa})]^+$	433	$[(\text{GLU} - 4\text{H} + \text{Na})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_2(\text{ONa})_2]^-$	431
$[(2\text{GLU} - 7\text{H} + 3\text{Na})\text{Sb}^{\text{V}}]^+$	575	$[(2\text{GLU} - 5\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})]^-$	525
$575 + \text{H}_2\text{O}$	593	$587 - \text{H}_2\text{O}$	569
$651 - 3\text{H}_2\text{O}$	597	$[(2\text{GLU} - 6\text{H} + 2\text{Na})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_2]^-$	587
$575 + 2\text{H}_2\text{O}$	611	$[(2\text{GLU} - 8\text{H} +$	779
		$2\text{Na})(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{OH})_4(\text{ONa})]^-$	
$651 - 2\text{H}_2\text{O}$	615	$779 + \text{H}_2\text{O}$	797
		ou	
		$[(2\text{GLU} - 6\text{H} + 2\text{Na})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_2$	
		$(\text{O})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_2(\text{ONa})]^-$	
$651 - \text{H}_2\text{O}$	633		
$[(2\text{GLU} - 5\text{H} + 4\text{Na})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_3]^+$	651		
$785 - \text{H}_2\text{O}$	767		
$[(2\text{GLU} - 9\text{H} + 4\text{Na})(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{OH})_4]^+$	785		
$[(2\text{GLU} - 8\text{H} + 4\text{Na})(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{OH})_4\text{ONa}]^+$	825		
$825 + \text{H}_2\text{O}$	843		
$1043 - \text{H}_2\text{O}$	1025		
$[(3\text{GLU} - 10\text{H} + 6\text{Na})(\text{Sb}^{\text{V}})_2(\text{OH})_5]^+$	1043		

<sup>a</sup> Proposta para os íons que mostraram os picos mais intensos.

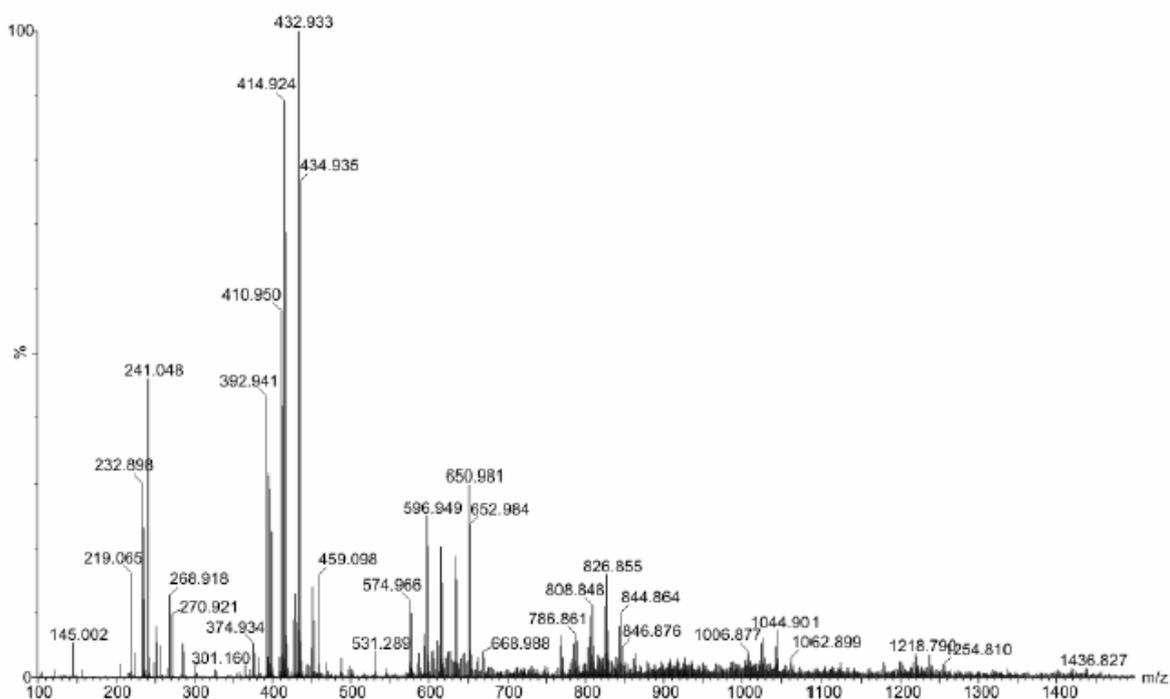


Figura 3.5: Espectro de ESI(+)-MS do SSG em água, 0,005 mol/L Sb (voltagem do cone = 40 V).

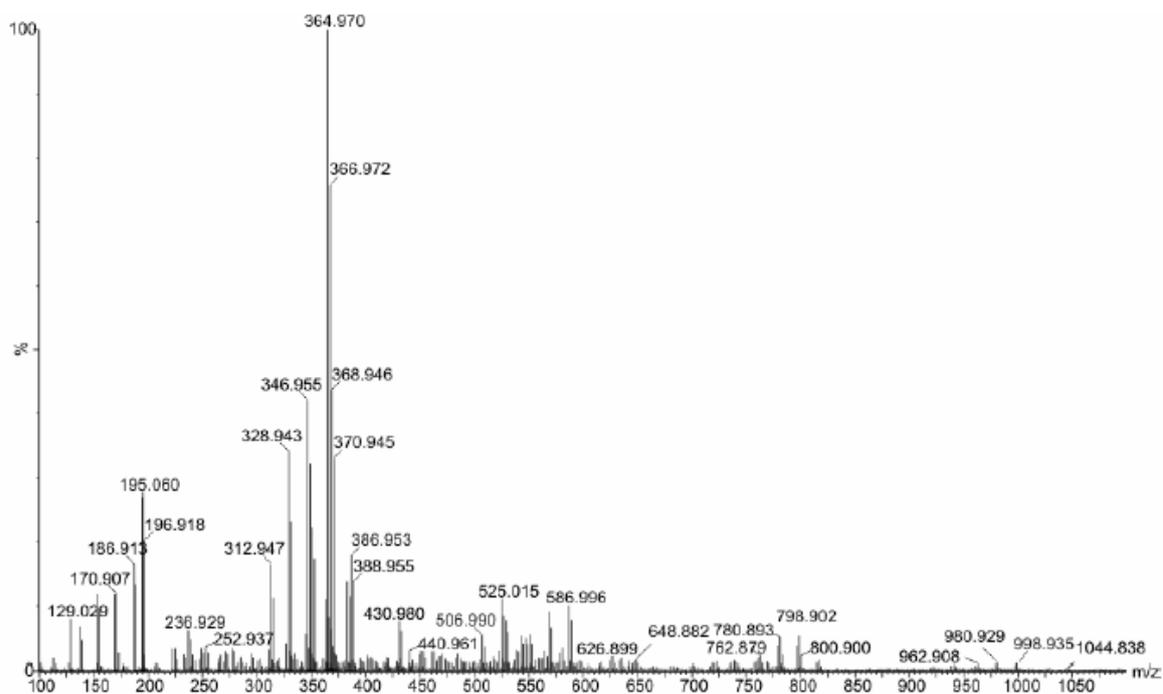


Figura 3.6: Espectro de ESI(-)-MS do SSG em água, 0,005 mol/L Sb (voltagem do cone = 40 V).

O espectro ESI(+)-MS mostrou íons  $m/z$  393, 397, 411, 415 e 433, correspondentes a complexos Sb(V)-GLU 1:1. Os íons  $m/z$  575, 597, 615, 633 e 651, são correspondentes a complexos Sb(V)-GLU 1:2. Os íons  $m/z$  767, 825 e 843, são correspondentes a complexos Sb(V)-GLU 2:2 e os íons  $m/z$  1025 e 1043 são correspondentes a complexos Sb(V)-GLU 2:3. Estes complexos estão associados ao íon sódio.

O espectro ESI(-)-MS mostrou íons  $m/z$  329, 347, 365, 369 e 387, que correspondem a complexos Sb(V)-GLU 1:1 associados ou não com íon sódio. Os íons  $m/z$  525 e 587 e os com  $m/z$  779 podem ser atribuídos a complexos Sb(V)-GLU 1:2 e 2:2, respectivamente, associados ou não com íon sódio.

As fórmulas estruturais das principais espécies identificadas no SSG estão demonstradas na Figura 3.7.

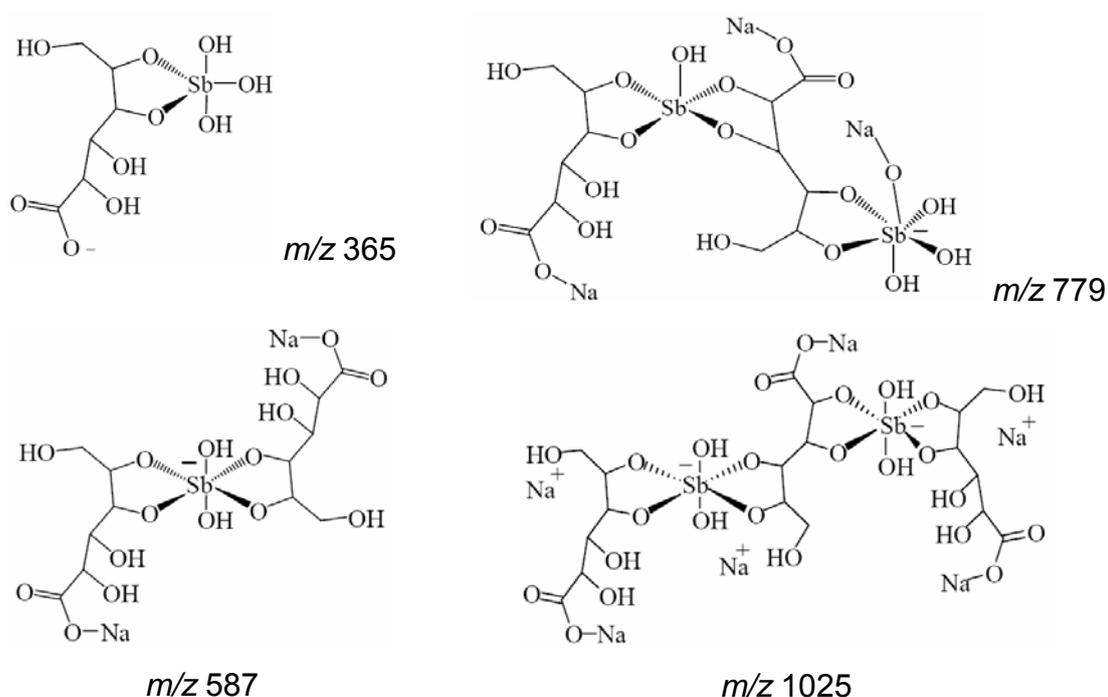


Figura 3.7: Fórmulas estruturais propostas para as espécies 365 Da, 587 Da, 779 Da e 1025 Da, identificadas no SSG.

O SSG apresentou complexos Sb(V)-ligante com estequiometrias 1:1, 1:2, 2:2 e 2:3, indicando que este medicamento é constituído por uma mistura oligomérica com fórmulas gerais  $(\text{GLU-Sb})_n\text{-GLU}$  e  $(\text{GLU-Sb})_n$ .

A hipotética fórmula estrutural,  $m/z$  797, encontrada na literatura para o complexo Sb-GLU 2:2 (Figura 3.1) [48], difere bastante da proposta elaborada

a partir da espécie  $m/z$  779 encontrada neste estudo (Figura 3.7). Além do mais, somente esta estrutura pode explicar a formação do complexo Sb-GLU 2:3 identificado por ESI(+)-MS.

### 3.2.6- Avaliação da cinética de osmolaridade do SSG

Mudanças significativas na osmolaridade foram observadas durante as primeiras 5 horas de incubação (Figura 3.8).

A osmolaridade inicial do SSG foi 135 mosmol/L e um aumento de 53 mosmol/L foi observado durante as primeiras 5 horas de incubação. A explicação mais provável para este comportamento é a hidrólise de espécies oligoméricas em espécies mais simples, resultando em um aumento no número de partículas. A cinética de osmolaridade também mostrou que a dissociação do SSG tem uma meia-vida de aproximadamente 20 minutos.

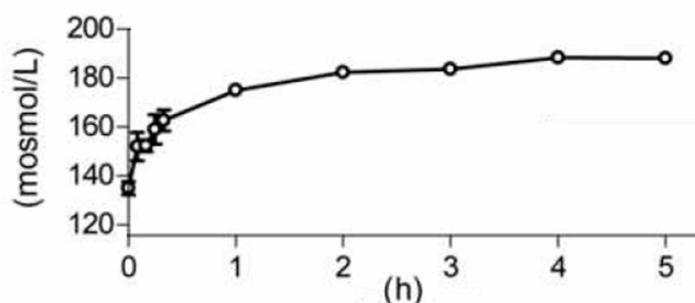


Figura 3.8: Cinética de osmolaridade em uma solução de SSG após diluição de 0,7 mol/L para 0,1 mol/L de Sb e incubação a 37°C. Dados expressos como média  $\pm$  SEM (n = 3).

Estes dados demonstram que a composição do SSG é dependente da concentração e do tempo. Este fármaco apresenta uma preparação comercial muito concentrada (85-100 g/L de Sb) que deve consistir em uma mistura de complexos Sb-GLU 2:1, 2:2 e 2:3. Por outro lado, em soluções aquosas diluídas, como o SSG no soro de pacientes após administração, este complexo poderia converter-se lentamente a complexos Sb(V)-GLU 1:1, como sugerido pela relação Sb/partícula perto de um após 5 horas de incubação a 37 °C.

O aumento da despolimerização com a diluição era esperado, mas este comportamento também reflete uma labilidade relativa às ligações

coordenadas. O complexo Sb(V)-ligante 1:1 é provavelmente o mais estável, especialmente se considerarmos a alta constante de estabilidade aparente (8600 mol/L) estimada previamente para o AM [53]. Recentemente, um estudo realizado por Demicheli *et al.*, verificou que esta relação de estabilidade também é observada em complexos de Sb(V) com a guanosina monosfosfato (GMP), onde o complexo 1:1 é muito mais estável que o 1:2 [54].

Este processo de despolimerização lenta deve provavelmente contribuir no complexo perfil farmacocinético destas drogas [55, 56]. O estado de agregação inicial do SSG parece ser importante do ponto de vista farmacológico. Lotes de SSG que apresentaram alta osmolaridade foram clinicamente ineficientes [49] e cardiopáticos [57]. Por outro lado, complexos dissociados Sb(V)-GLU 1:1 e o próprio antimoniato, evidenciados no soro humano durante tratamentos, são esperados como a forma final do Sb em antimoniais pentavalentes [58].

### **3.3- Caracterização físico-química da formulação estibogluconato de sódio:β-ciclodextrina 1:1 (SSG:β-CD 1:1)**

#### **3.3.1- Análise termogravimétrica da formulação SSG:β-CD 1:1**

Com intuito de avaliar a interação do SSG com a β-CD, realizou-se um estudo termogravimétrico que permitiu comparar a mistura mecânica SSG+β-CD (1+1) e a composição SSG:β-CD 1:1, e estas em relação aos componentes de partida.

O perfil termogravimétrico da mistura mecânica SSG+β-CD (1+1) (Figura 3.9) e da composição SSG:β-CD 1:1 (Figura 3.10) são muito diferentes. Enquanto as curvas TG/DTG/DTA da mistura mecânica SSG+β-CD (1+1) apresentaram perfis semelhantes ao da β-CD (Figura 3.11), as curvas TG/DTG/DTA da composição SSG:β-CD 1:1 apresentaram novos aspectos. Além do estreitamento da banda exotérmica verificada entre 344 e 500 °C, a DTA também apresentou um novo pico em 546 °C que não foi verificado nas curvas DTA do SSG e da β-CD (Figuras 3.2 e 3.11). Estas mudanças sugerem a formação de um complexo entre a β-CD e o SSG.

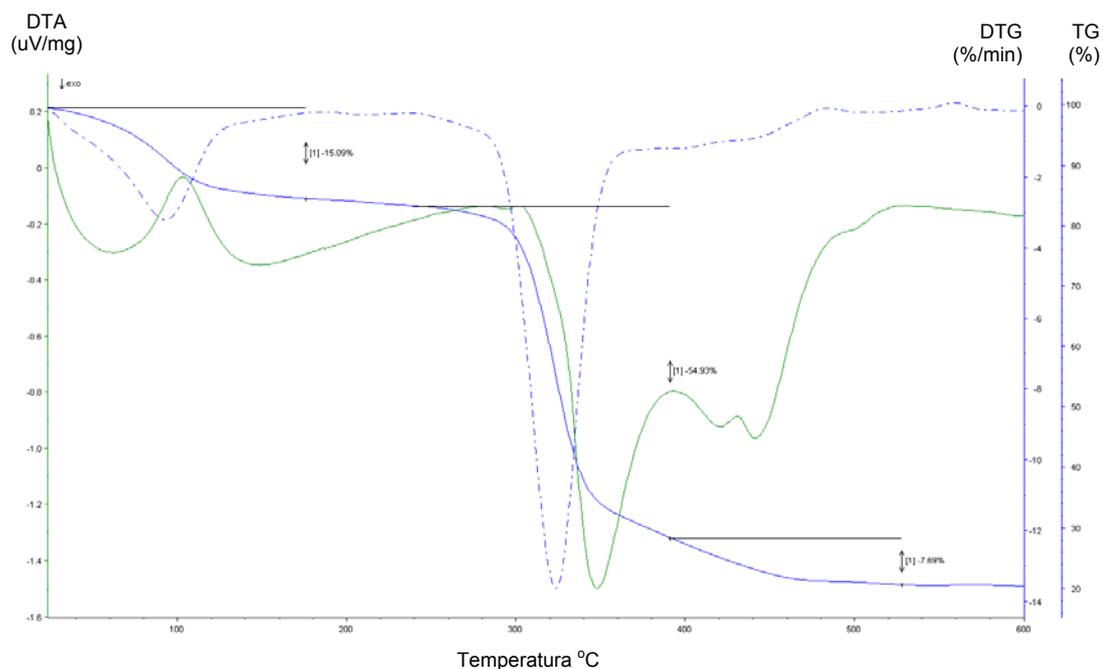


Figura 3.9: Curvas TG, DTG (azul) e DTA (verde) da mistura mecânica SSG+β-CD (1+1).

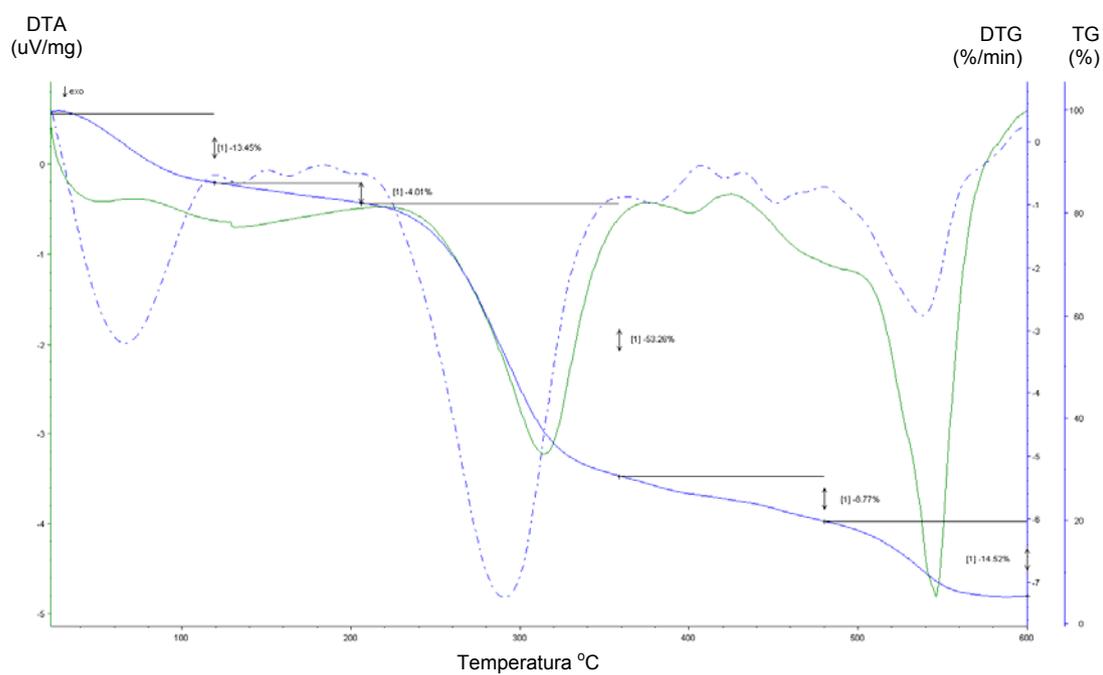


Figura 3.10: Curvas TG, DTG (azul) e DTA (verde) da formulação SSG:β-CD 1:1.

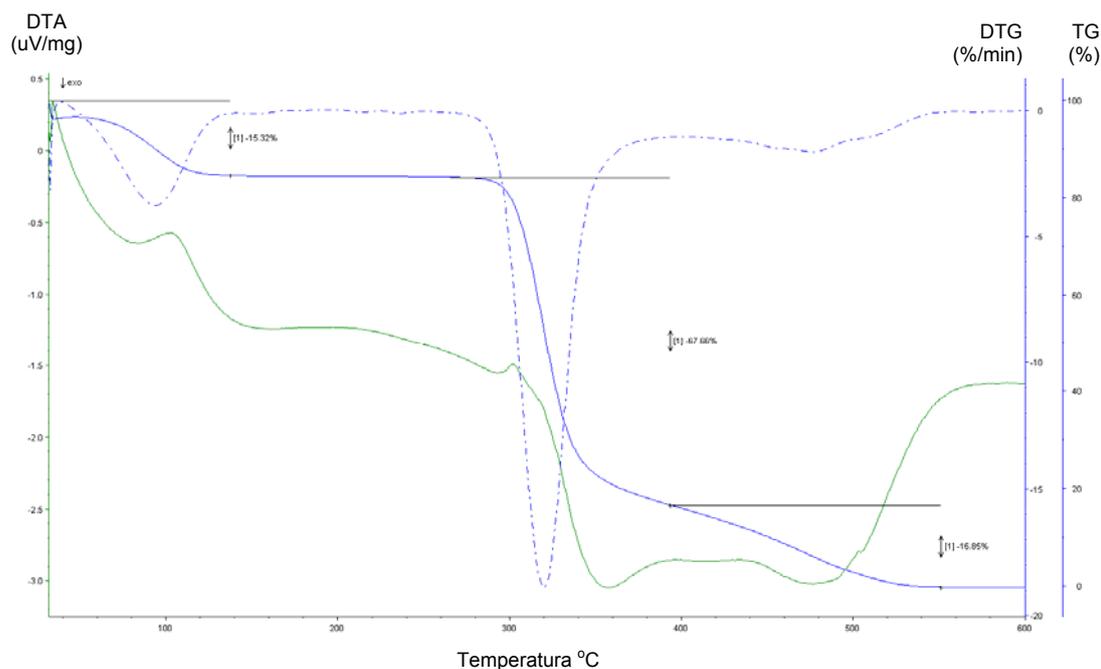


Figura 3.11: Curvas TG, DTG (azul) e DTA (verde) da  $\beta$ -CD.

A análise termogravimétrica (TG/DTG) sugere que as moléculas de água presentes na cavidade hidrofóbica da CD não foram removidas [59], portanto, provavelmente não houve inclusão do SSG na CD, porém, esta droga deve ter interagido com a superfície externa deste nanocarreador. A pequena diferença na porcentagem de água observada entre a  $\beta$ -CD e a formulação SSG: $\beta$ -CD 1:1, 1,8 %, pode estar associada à liofilização utilizada no preparo desta.

### 3.3.2- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho da formulação SSG: $\beta$ -CD 1:1

O espectro no infravermelho da mistura mecânica SSG+ $\beta$ -CD (1+1) é idêntico ao da  $\beta$ -CD. Já o espectro da composição SSG: $\beta$ -CD 1:1 apresenta uma sutil diferença, em  $1592\text{ cm}^{-1}$ , em relação ao espectro da  $\beta$ -CD, atribuída a contribuição de uma banda proveniente do SSG (Figura 3.12).

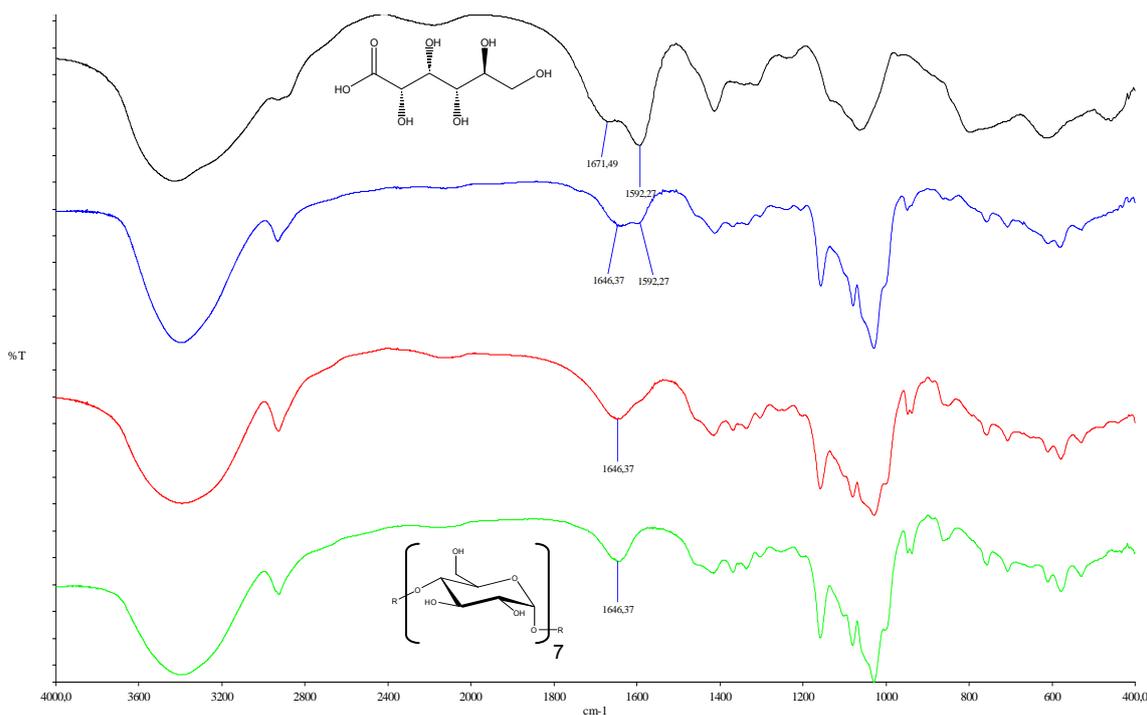


Figura 3.12: Espectro no infravermelho da  $\beta$ -CD (verde), da mistura mecânica SSG+ $\beta$ -CD (1+1) (vermelho), da composição SSG: $\beta$ -CD 1:1 (azul) e do SSG (preto).

### 3.4- Absorção de Sb por via oral em camundongos *Swiss* a partir das formulações preparadas com o SSG

As Figuras 3.13 e 3.14 mostram as concentrações de Sb alcançadas no soro dos camundongos *Swiss* 30 minutos e 1 hora após a administração por via oral de diferentes formulações do SSG. O grupo 1, utilizado como controle, foi tratado com uma solução de SSG (0,06 mol/L de Sb) preparada no momento da administração a partir do composto em pó. O grupo 2 foi tratado com uma solução de SSG (0,06 mol/L de Sb) preparada no momento da administração por diluição de uma solução concentrada (0,65 mol/L de Sb). O grupo 3 foi tratado com uma solução de SSG (0,06 mol/L de Sb) preparada no dia precedente à administração a partir do composto em pó e aquecida por 3 h. Por fim, o grupo 4 foi tratado com uma solução do SSG: $\beta$ -CD 1:1 (0,06 mol/L de Sb) preparada no momento da administração.

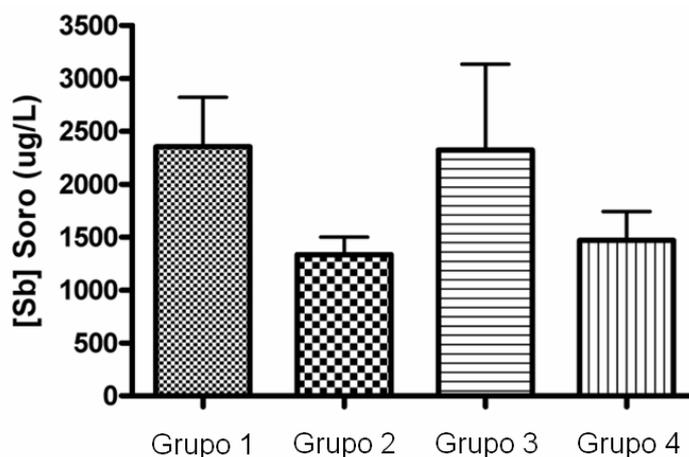


Figura 3.13: Concentrações de Sb no soro de camundongos SWISS, 30 min após a administração oral de diferentes formulações do SSG na dose de 80 mg Sb/Kg (n=3-6).

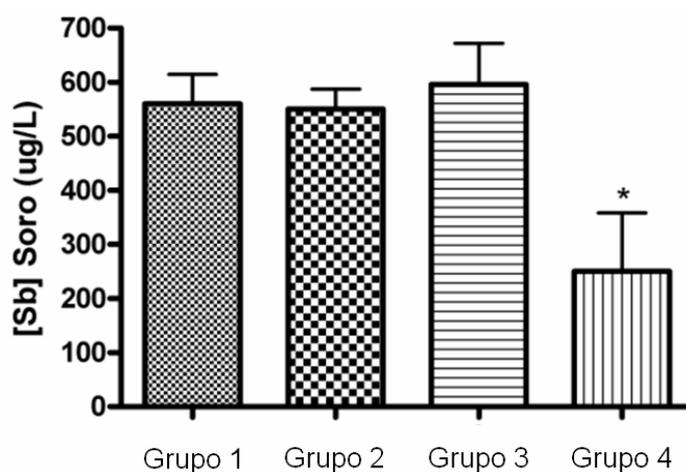


Figura 3.14: Concentrações de Sb no soro de camundongos SWISS, 3 h após a administração oral de diferentes formulações do SSG na dose de 80 mg Sb/Kg (n=3-6).

Após 30 minutos da administração, as maiores concentrações de Sb foram verificadas nos grupos 1 e 3. No entanto, houve grande variabilidade no resultado entre animais do mesmo grupo e o aumento da concentração de Sb no soro não foi estatisticamente significativo (pelo teste One way ANOVA com pós-teste de Dunnett). Podemos sugerir que a solução do SSG diluída no momento da administração e a formulação SSG: $\beta$ -CD 1:1, poderiam estar em estado mais agregado, dificultando ou retardando a absorção do Sb nos grupos

2 e 4. Por outro lado, após 3 horas da administração, uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o grupo tratado com o SSG: $\beta$ -CD 1:1 e os outros grupos. Continuando a hipótese anterior pode-se presumir que o SSG concentrado, diluído no momento da administração, teve mais facilidade em se despolimerizar, e que a formulação SSG: $\beta$ -CD 1:1 continuou em um estado mais polimerizado.

### 3.5- Conclusões

O antimônio pentavalente SSG, avaliado por ESI(+)-MS e ESI(-)-MS, apresentou complexos Sb(V)-ligante 1:1, 1:2, 2:2 e 2:3, assim, novas estruturas foram propostas para esta droga.

O lento aumento da osmolaridade em soluções diluídas de SSG (37°C, meia vida de 20 minutos) sugere que os complexos Sb(V)-ligante 1:1 desempenham um papel farmacológico importante.

Os ensaios *in vivo*, a partir das formulações preparadas com o SSG, demonstraram que o estado de polimerização e a CD permitem modular a absorção de Sb por via oral, entretanto, os resultados obtidos não são promissores para o desenvolvimento de uma formulação para o tratamento das leishmanioses.

## **CAPÍTULO 4- Caracterização da formulação antimoniato de meglumina: $\beta$ -ciclodextrina 7:1 (AM: $\beta$ -CD 7:1) e avaliação da absorção oral de Sb, em cães da raça Beagle e em camundongos *Swiss*, promovida por estas formulações**

### **4.1- Introdução**

As beta-ciclodextrinas ( $\beta$ -CD) são oligossacarídeos cíclicos formados por sete unidades de glicose e podem incluir moléculas apolares, via interações não-covalente, em sua cavidade hidrofóbica [59]. Associações droga-CD têm sido muito avaliadas com intuito de mudar o sítio de absorção, prolongar a absorção e promover a absorção de drogas por via oral [60].

A proposta de associar a  $\beta$ -CD com o leishmanicida antimoniato de meglumina (AM), difere significativamente das estratégias convencionais, pois, planeja interagir uma droga hidrofílica com a superfície polar externa da CD.

No antimonial pentavalente AM, o Sb é o principal responsável pela ação farmacológica desta droga [61]. A composição AM: $\beta$ -CD 1:1, recentemente descrita na literatura, tornou o AM mais ativo por via oral [33]. Este foi o primeiro relato de uma possível atividade oral a partir de um antimonial pentavalente. A formação de complexos ternários meglumina-Sb- $\beta$ -CD depende da ocorrência de múltiplas ligações covalentes e não-covalentes, envolvendo as hidroxilas da CD e levam a formação de nanoagregados [34, 62]. Diferentemente dos convencionais complexos de inclusão [63], a composição AM/ $\beta$ -CD age como sistema de liberação controlada de droga (AM) após diluição em solução aquosa. Esta propriedade foi atribuída à labilidade da ligação Sb-O-( $\beta$ -CD) [62].

Este capítulo apresenta a caracterização físico-química da composição AM: $\beta$ -CD 7:1 obtida e avalia a absorção de Sb, em cães da raça Beagle e em camundongos *Swiss*, promovida após sua administração por via oral. A composição utilizada apresentou grande solubilidade em água, permitindo a administração oral de doses elevadas de Sb em animais de grande porte.

O AM foi sintetizado e caracterizado anteriormente no nosso grupo de pesquisa [14, 47, 52]. Para efeito de comparação com a formulação AM: $\beta$ -CD 7:1, a caracterização do AM também está apresentada.

## 4.2- Caracterização físico-química do antimoniato de meglumina (AM)

### 4.2.1- Análise termogravimétrica do AM

No AM são observadas quatro etapas de decomposição térmica (Figura 4.1). A primeira etapa, entre 25 e 130 °C, corresponde a perda de três moléculas de água de hidratação, já a segunda, entre 130 e 196 °C, está relacionada ao início da decomposição do composto e a perda de matéria orgânica. A terceira (196 e 416 °C) e quarta etapas (416 e 634 °C) também estão relacionadas à decomposição do composto e a perda de matéria orgânica.

Não ocorreu decomposição completa da amostra e o resíduo, 29,7%, trata-se de óxidos de antimônio.

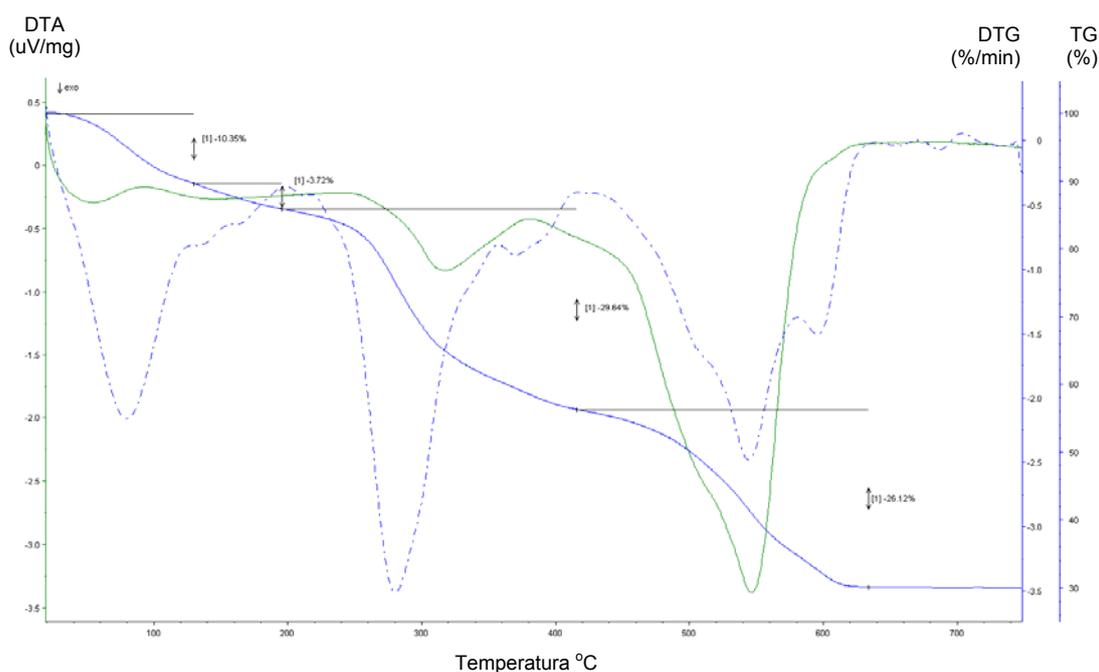


Figura 4.1: Curvas TG, DTG (azul) e DTA (verde) do AM.

#### 4.2.2- Microanálises do AM

Os resultados dos percentuais dos elementos C, H, N e Sb do AM são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Percentuais dos elementos C, H, N e Sb encontrados para o AM.

	Calculado				Experimental			
	C <sub>7</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> NSb.3H <sub>2</sub> O							
	%C	%H	%N	%Sb	%C	%H	%N	%Sb
AM	20,07	5,70	3,58	29,00	20,10	5,72	3,34	29,00

Considerando a presença das moléculas de água indicadas pela análise termogravimétrica, esses dados sugerem a formação de um composto com a fórmula mínima C<sub>7</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>NSb.3H<sub>2</sub>O, de relação molar Sb(V):NMG 1:1, como já demonstrado por Demicheli *et al* [45].

#### 4.2.3- Condutividade do AM

A medida de condutividade elétrica do AM foi feita a partir de uma solução aquosa de concentração 10<sup>-3</sup> mol/L de Sb. Os resultados obtidos foram comparados aos resultados obtidos para eletrólitos padrões de estequiometria 1:1 e 2:1. Os resultados são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Medidas de condutividade elétrica

Composto	(μS/cm)
KCl	161,4
NaCl	126,3
Ba(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	259,7
CaCl <sub>2</sub>	274,4
AM	37,1

Observou-se que a condutividade elétrica do AM é compatível com a ausência de eletrólitos.

#### 4.2.4- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do AM

O espectro de absorção no infravermelho do AM (Figura 4.2) foi semelhante ao encontrado na literatura [52]. Foi observada uma banda larga em  $3419,4\text{ cm}^{-1}$ , relacionada às vibrações de estiramento dos grupos O-H e N-H. Também verificou-se o alargamento das bandas de deformação angular no plano dos grupos O-H ( $1458,8\text{-}1227,8\text{ cm}^{-1}$ ) e C-O ( $1050,2\text{ cm}^{-1}$ ). O aparecimento de uma banda em  $776,4\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída à vibração de estiramento assimétrico Sb-O.

Estes dados indicam a complexação do ligante com o Sb.

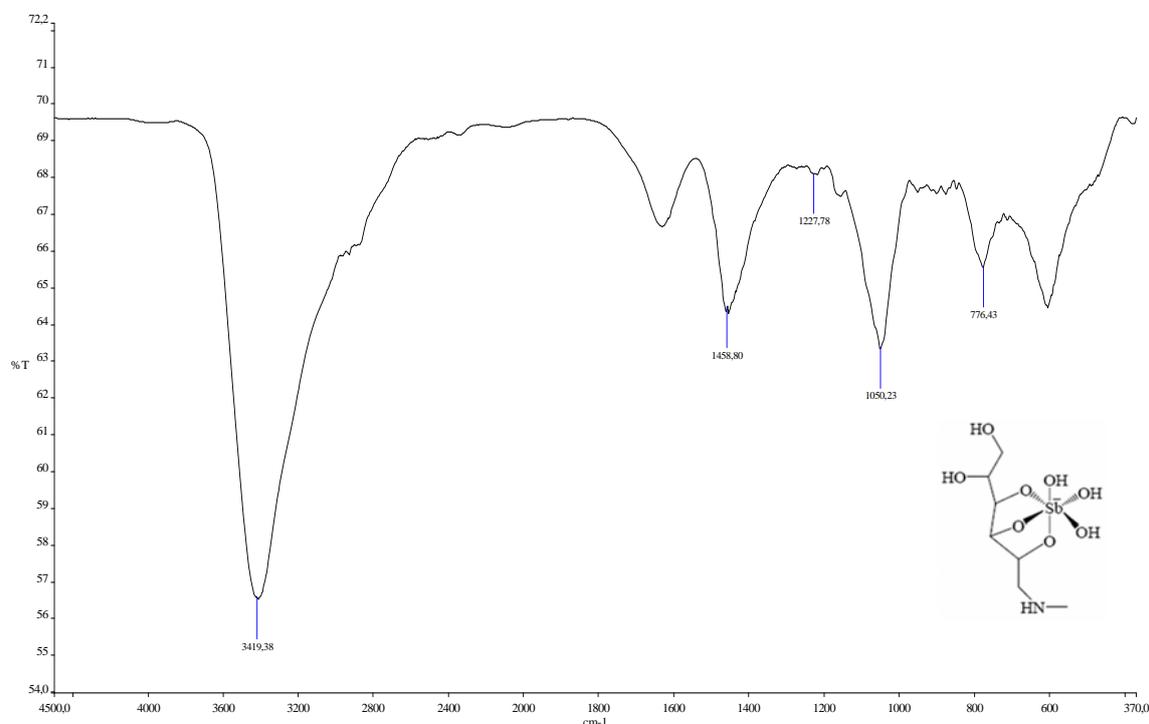


Figura 4.2: Espectro no infravermelho do antimoniato de meglumina (AM).

### 4.3- Caracterização físico-química da formulação antimoniato de meglumina: $\beta$ -ciclodextrina 7:1 (AM: $\beta$ -CD 7:1)

#### 4.3.1- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1

O espectro de absorção no infravermelho da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 não apresentou grandes modificações em relação aos espectros do AM e da  $\beta$ -CD (Figura 4.3). Entretanto, sutis alterações foram verificadas nas bandas relacionadas às deformações angulares no plano dos grupos O-H ( $1298$ - $1335$   $\text{cm}^{-1}$ ) e C-O ( $1101$ - $1157$   $\text{cm}^{-1}$ ) e sugerem complexação do AM com oxigênios das hidroxilas da  $\beta$ -CD.

A banda verificada em  $776,43$   $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída à vibração de estiramento assimétrico Sb-O [52].

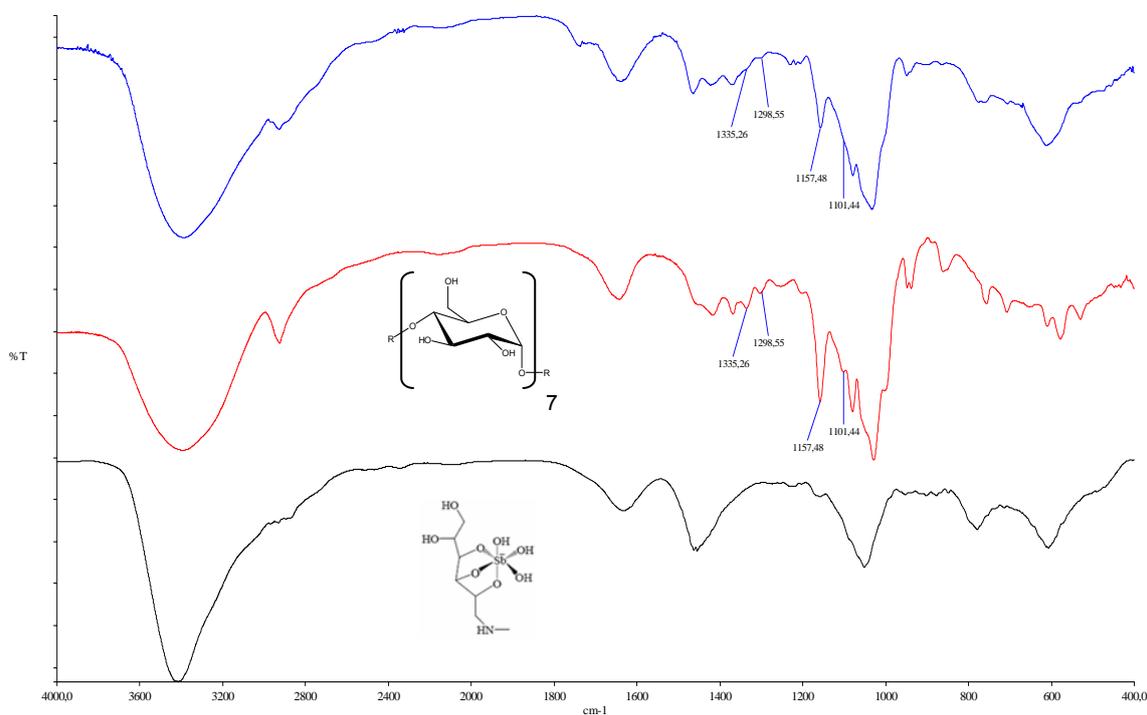


Figura 4.3: Espectro no infravermelho do AM (preto), da  $\beta$ -CD (vermelho) e da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 (azul).

### 4.3.2- Análise termogravimétrica da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1

Com intuito de avaliar a interação do AM com a  $\beta$ -CD, realizou-se um estudo termogravimétrico que permitiu comparar a formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 (Figura 4.4) e a mistura mecânica AM+ $\beta$ -CD (7+1) (Figura 4.5) e, e estas em relação aos componentes de partida (Figuras 4.6 e 4.7).

A análise térmica diferencial (DTA) da mistura mecânica AM+ $\beta$ -CD apresentou um sutil pico endotérmico em 305 °C, muito semelhante àquele observado em 302 °C para a amostra da  $\beta$ -CD (Figura 4.6). Estes picos foram atribuídos à fusão deste nanocarreador e indicam que não houve complexação do AM com a ciclodextrina quando estes foram misturados de maneira simples.

Por outro lado, a curva DTA da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 (Figura 4.4) apresentou um proeminente pico exotérmico em 306 °C não verificado nas curvas DTA dos outros compostos. Como o pico endotérmico relacionado à fusão da ciclodextrina não foi observado, esta técnica sugere que o complexo entre o AM e a  $\beta$ -CD foi obtido com êxito.

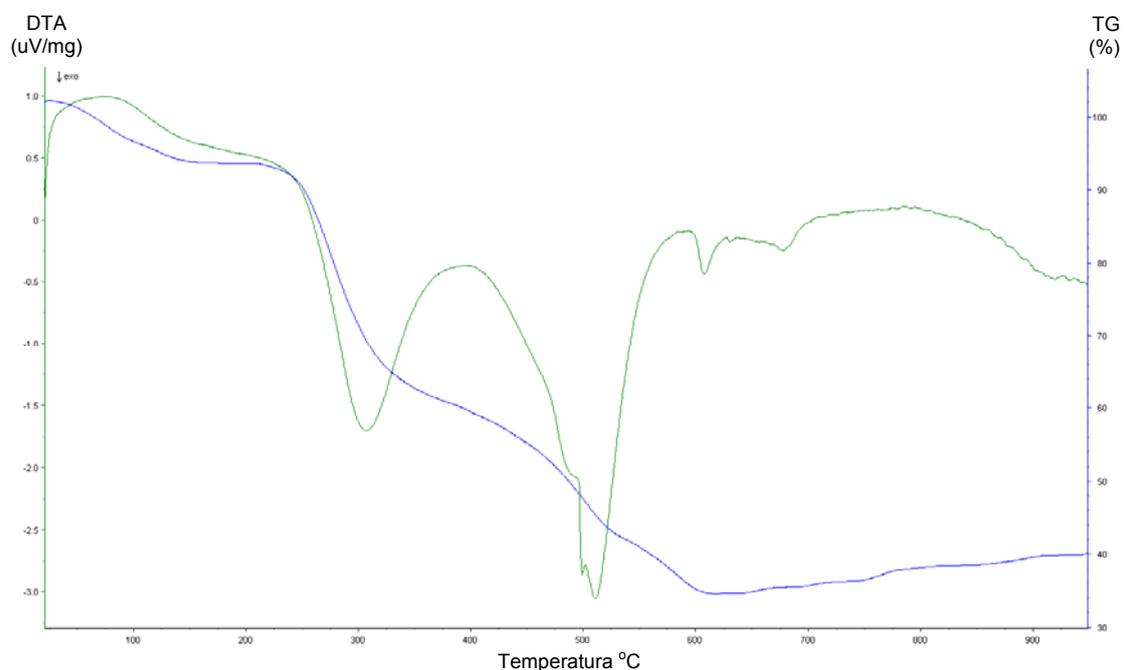


Figura 4.4: Curvas TG (azul) e DTA (verde) da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1.

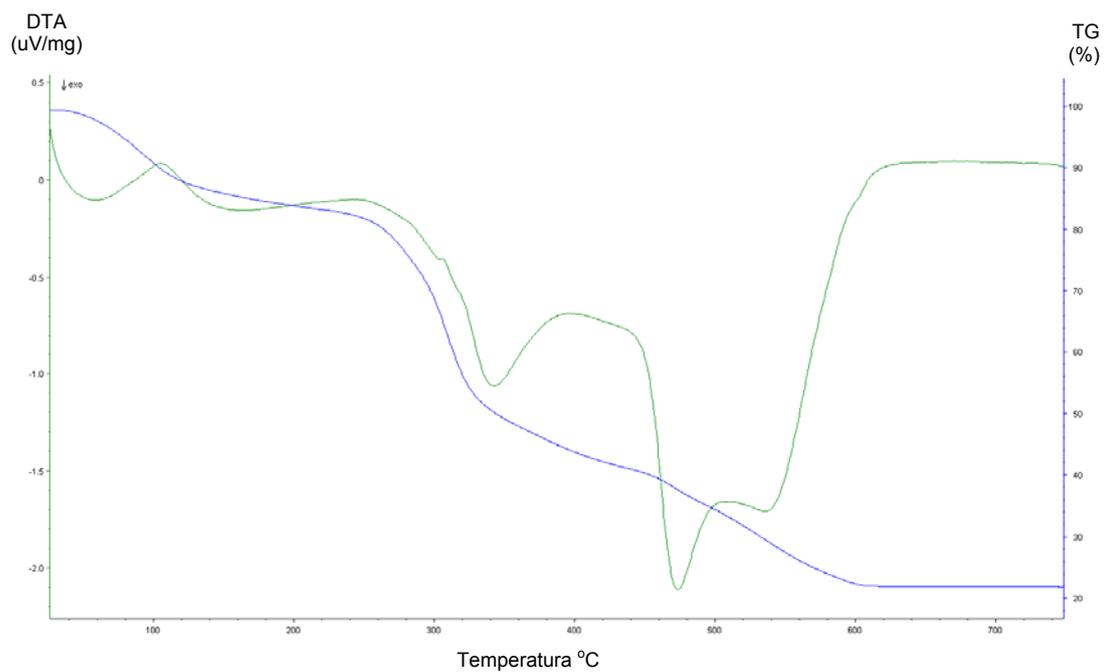


Figura 4.5: Curvas TG (azul) e DTA (verde) da mistura mecânica AM+ $\beta$ -CD (7+1).

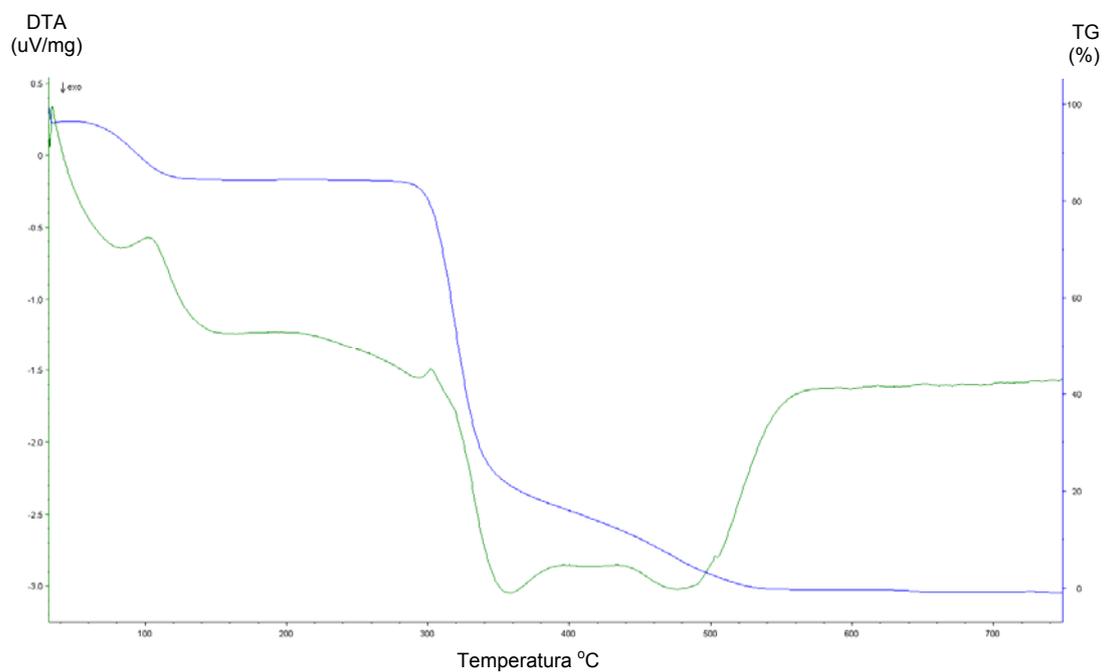


Figura 4.6: Curvas TG (azul) e DTA (verde) da  $\beta$ -CD.

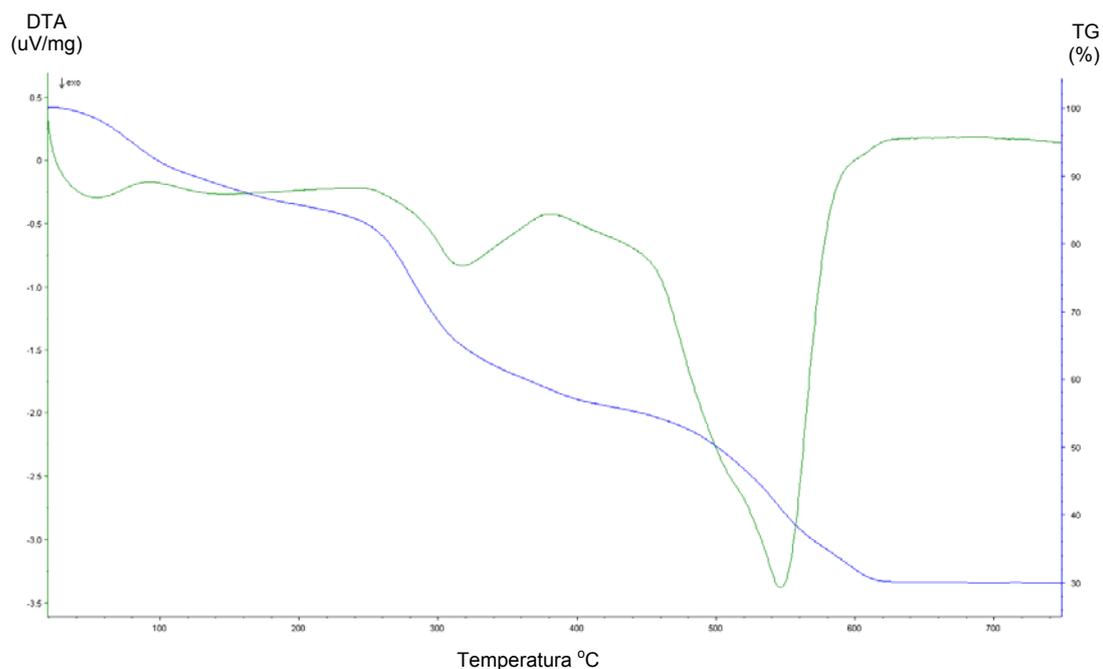


Figura 4.7: Curvas TG (azul) e DTA (verde) do AM.

#### 4.3.3- Estudos de $^1\text{H}$ RMN da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1

A Figura 4.8 compara os espectros de  $^1\text{H}$  RMN obtidos para as formulações AM: $\beta$ -CD 7:1, solução AM+ $\beta$ -CD (7+1) e  $\beta$ -CD livre, na faixa de 3,5-4,5 ppm, dando ênfase na ressonância dos principais hidrogênios da  $\beta$ -CD em  $\text{D}_2\text{O}$ .

A caracterização da  $\beta$ -CD por  $^1\text{H}$  RMN é bem descrita na literatura [57, 58, 61]. A Tabela 4.3 apresenta os deslocamentos químicos dos prótons da  $\beta$ -CD em  $\text{D}_2\text{O}$ , na formulação AM: $\beta$ -CD 7:1, na solução AM +  $\beta$ -CD (7+1) e na  $\beta$ -CD livre.

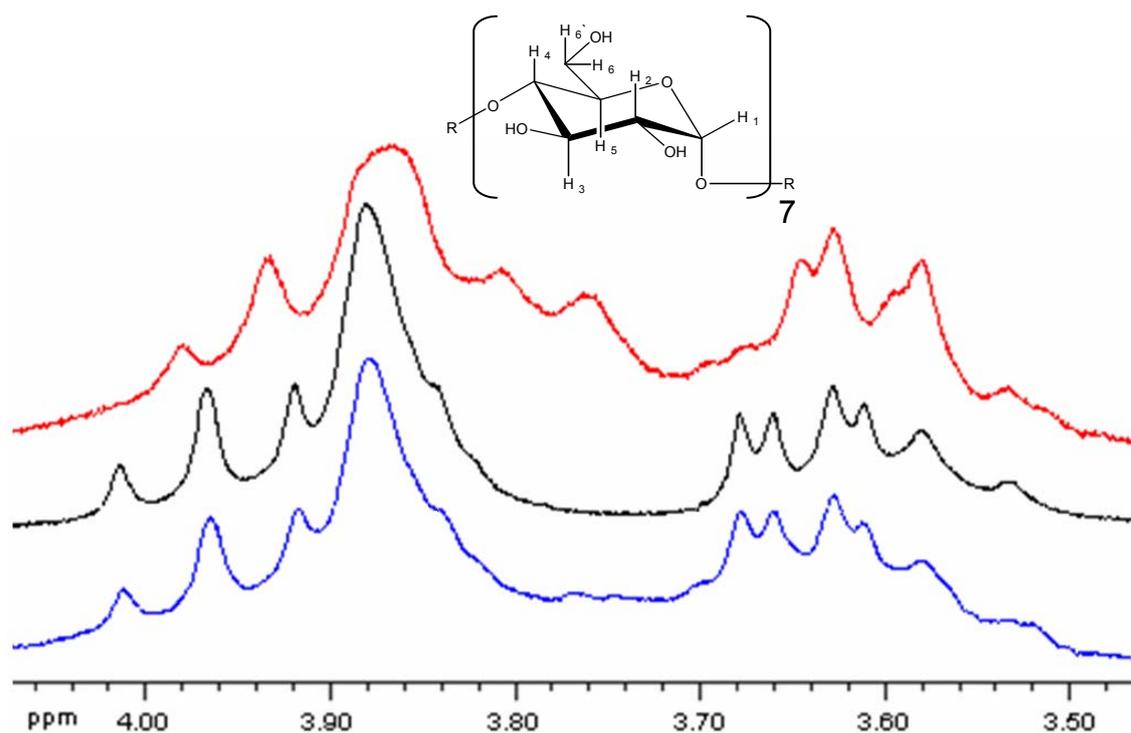


Figura 4.8: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz) em  $\text{D}_2\text{O}$  com ênfase nos sinais dos hidrogênios da  $\beta$ -CD (0,0057 mol/L). Formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 (vermelho), solução AM+ $\beta$ -CD (7+1) (azul),  $\beta$ -CD livre (preto).

Tabela 4.3: Deslocamentos químicos ( $\delta$ ),  $^1\text{H}$  RMN, dos prótons da  $\beta$ -CD em  $\text{D}_2\text{O}$ , na formulação AM: $\beta$ -CD 7:1, na solução AM +  $\beta$ -CD (7+1) e na  $\beta$ -CD livre.

Próton	$\delta$ [ $\beta$ -CD]	$\delta$ [AM+ $\beta$ -CD 7:1]	$\delta$ [AM: $\beta$ -CD 7:1] ( $\Delta \delta$ )*
<b>H1</b>	5,07	5,07	5,07 (-0,00)
<b>H2</b>	3,67	3,67	3,64 (-0,03)
	3,62	3,62	3,59 (-0,03)
<b>H3</b>	3,96	3,97	3,93 (-0,03)
<b>H4</b>	3,58	3,58	3,53 (-0,05)
<b>H5</b>	3,85	3,85	3,81 (-0,04)
<b>H6</b>	3,88	3,88	3,87 (-0,01)

\* entre parênteses,  $\Delta \delta = \delta$  [AM: $\beta$ -CD 7:1] -  $\delta$  [ $\beta$ -CD]

Os mapas de contorno obtidos pelo COSY permitiram confirmar a posição dos hidrogênios ( $\delta$  ppm) da composição AM: $\beta$ -CD 7:1 (Figura 4.9). Foi possível correlacionar os sinais de: H1/H2, H2/H3, H3/H4, H4/H5 e H5/H6.

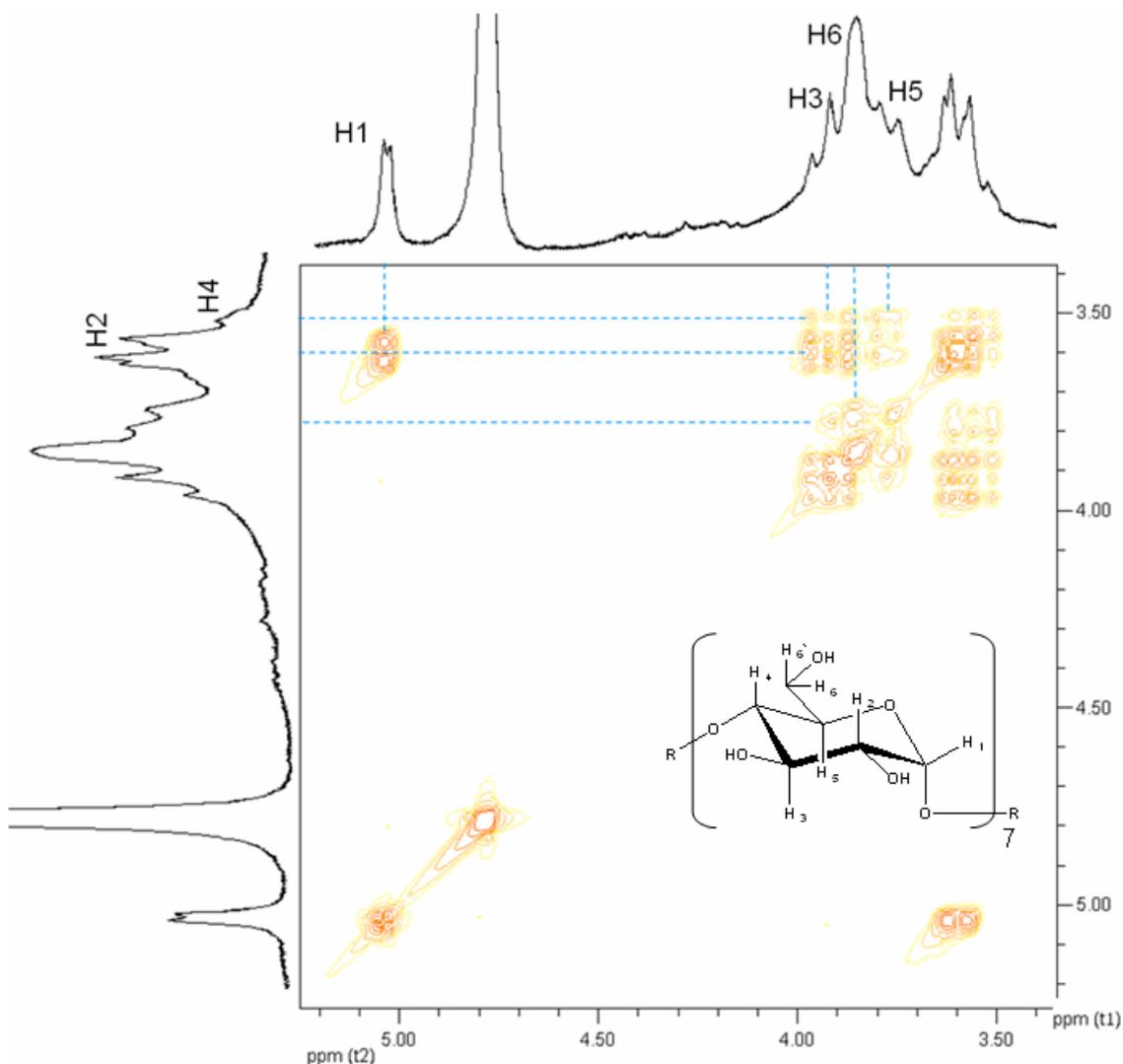


Figura 4.9: COSY (200 MHz) da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 em  $D_2O$ .

Devido à formação da composição AM: $\beta$ -CD 7:1, a ressonância de todos os hidrogênios da  $\beta$ -CD sofreram o mesmo deslocamento químico e, em relação ao espectro da  $\beta$ -CD livre, os sinais dos prótons H-2, H-3, H-4 e H-5 foram os mais afetados. Esses dados estão de acordo com a existência de múltiplos sítios de coordenação da  $\beta$ -CD para interação com o Sb. Também notou-se que a formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 apresentou picos de ressonância mais largos que os outros compostos.

A grande solubilidade da composição AM: $\beta$ -CD 7:1, uma de suas principais vantagens, permite sua aplicação em doses elevadas em animais de grande porte e reduz o risco dos efeitos colaterais relatados para a  $\beta$ -CD. Esta característica pode ser atribuída à interferência do AM com as ligações de hidrogênio responsáveis pela baixa solubilidade da  $\beta$ -CD. Estas ligações de hidrogênio intramoleculares são verificadas entre as hidroxilas presentes nos C-2 e C-3 das unidades de glicopiranosose da  $\beta$ -CD em solução [59].

Teoricamente, dois tipos de interações podem ocorrer entre o AM e a  $\beta$ -CD. O AM poderia fazer interações com a CD por inclusão em sua cavidade hidrofóbica ou fazer interações, do tipo não-inclusão, com sua superfície externa [59, 60]. Como esperado, a interação do AM com a CD aconteceu em sua parte externa, provavelmente através da ligação do Sb aos átomos de oxigênio dos grupos hidroxilos presente na superfície da CD. Os seguintes dados confirmam esta proposta:

- (i) a meglumina, o  $\text{Sb}(\text{OH})_6^-$  e seus complexos são muito hidrofílicos e praticamente insolúveis em solventes apolares, o que desfavorece sua inclusão na cavidade hidrofóbica da CD.
- (ii) a RMN de  $^1\text{H}$  mostrou que a ressonância dos hidrogênios H-2 e H-4, localizados na superfície externa da CD [59, 60], sofreram alterações significativas.
- (iii) a análise termogravimétrica (TG) mostrou que a liberação das moléculas de água presentes na cavidade hidrofóbica da CD [59], que geralmente ocorre quando uma droga é incluída neste nanocarreador, não foi observada nesta composição.
- (iv) a formação do complexo ternário (meglumina-Sb- $\beta$ -CD)  $m/z$  1446, identificado por ESI(+)-MS, somente pode ser atribuído a desprotonação das hidroxilas da CD devido a complexação destas com o Sb [62].

Considerando estas evidências, presume-se que o complexo AM: $\beta$ -CD 7:1 foi formado. Os dados de  $^1\text{H}$  RMN condizem com sua formação, pois, revelam um único sinal para cada hidrogênio da  $\beta$ -CD. Além do mais, espécies de grande peso molecular meglumina-Sb- $\beta$ -CD 2:2:1 já foram identificadas por ESI-MS [62]. Entretanto, a dificuldade de revelar a presença de complexos grandes, como o AM: $\beta$ -CD 7:1, pode estar relacionada a labilidade do complexo ao ser submetido ao processo de ESI.

#### 4.3.4- Estudo do tamanho das partículas na formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 por espectroscopia de correlação de fótons

A presença de nanoagregados em uma solução de AM: $\beta$ -CD 7:1 foi avaliada por espectroscopia de correlação de fótons. A composição AM: $\beta$ -CD 7:1 foi dissolvida em água (0,04 mol/L de Sb) e apresentou três populações diferentes de partículas com diâmetro hidrodinâmico médio >300 nm (~60%), entre 100-170 nm (~10%) e entre 28-60 nm (~30%) (Figura 4.10). Por outro lado, nas mesmas condições de concentração e temperatura, uma solução AM+ $\beta$ -CD (7+1) apresentou mais que 95% de partículas com diâmetro hidrodinâmico médio entre 27-30 nm e o AM sozinho mostrou mais que 97% de partículas com diâmetro hidrodinâmico médio entre 26-28 nm. Neste contexto, as populações que apresentaram partículas com diâmetro médio maior que 100 nm podem ser atribuídas a nanoagregados AM: $\beta$ -CD.

A avaliação do tamanho das partículas da composição AM: $\beta$ -CD 7:1 (0,04 mol/L Sb) também foi realizada em diferentes intervalos de tempo (Figura 4.10). Após 3,6 horas da dissolução da amostra, observou-se uma redução no tamanho das partículas como resultado da transformação de nanopartículas maiores em nanopartículas menores. Porém, a natureza físico-química destes nanoagregados ainda não foi esclarecida. Dois diferentes tipos de interações provavelmente estabilizam estas nanoestruturas, são elas: múltiplas ligações covalentes entre o Sb(V) e os ligantes ( $\beta$ -CD e meglumina) e/ou múltiplas ligações de hidrogênio envolvendo as várias hidroxilas da  $\beta$ -CD, meglumina e o Sb(V). Entretanto, a grande estabilidade do complexo Sb-meglumina [54] contrasta com a baixa estabilidade do complexo ternário meglumina-Sb- $\beta$ -CD [34] e indica que após a diluição da composição AM: $\beta$ -CD 7:1, o Sb (V) deve ser liberado primariamente na forma de complexos Sb-meglumina de baixo peso molecular.

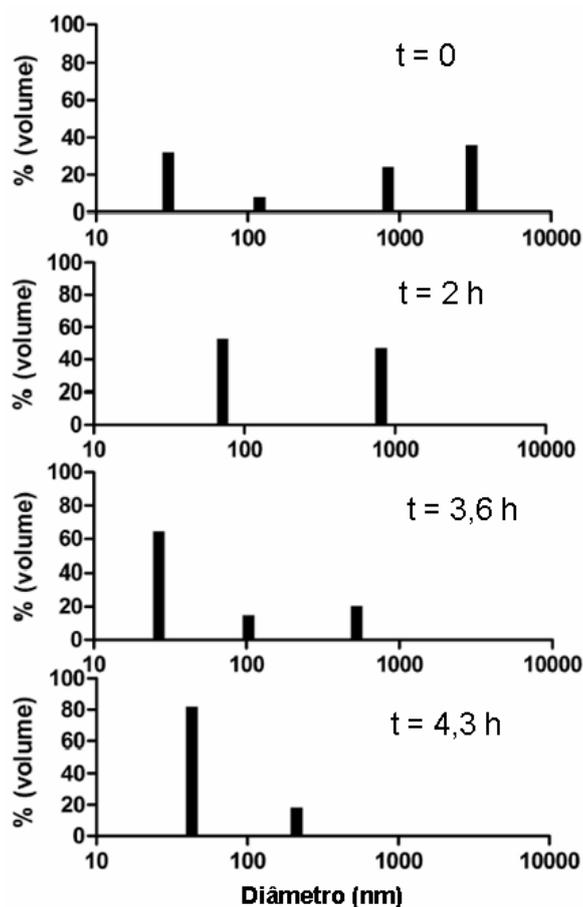


Figura 4.10: Distribuição das partículas da composição AM: $\beta$ -CD 7:1 por tamanho, em diferentes intervalos de tempo, após dissolução do pó liofilizado em água (0,04 mol/L Sb) e incubação a 25°C. Os dados representam diferentes populações de partículas, identificadas pelo nanosizer através de uma análise multi-modal de distribuição de tamanho. Cada população foi caracterizada pelo volume hidrodinâmico médio e pela porcentagem (em volume) de toda população.

#### 4.4- Avaliação da absorção oral de Sb em cães da raça Beagle a partir das formulações AM e AM: $\beta$ -CD 7:1

Com intuito de avaliar o impacto da composição AM: $\beta$ -CD 7:1 em promover a absorção de Sb por via oral, um estudo farmacocinético foi realizado em cães da raça Beagle. Após serem completamente dissolvidas em água, as composições AM: $\beta$ -CD 7:1 (0,7 mol/L de Sb) e AM (0,7 mol/L de Sb)

foram administradas nos cães por via intragástrica, na dose de 100 mg Sb/Kg. Em seguida, amostras de sangue foram coletadas em diferentes intervalos de tempo para determinação da concentração de Sb no soro e no sangue por GFAAS. A Figura 4.11 mostra os resultados da farmacocinética do Sb no soro dos cães após a administração oral das composições AM: $\beta$ -CD 7:1 e AM.

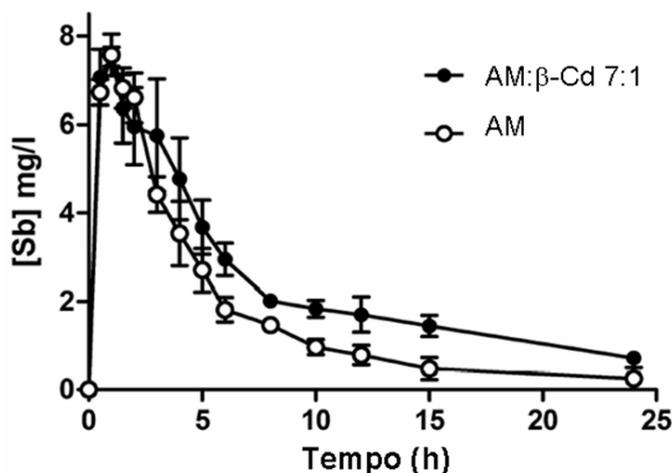


Figura 4.11: Farmacocinética do Sb no soro de cães da raça Beagle, após administração das composições do AM e do AM: $\beta$ -CD 7:1 por via oral (100 mg Sb/Kg). Os dados mostrados são a média  $\pm$  S.E.M (n = 3).

A comparação entre os dados do AM e do AM: $\beta$ -CD 7:1, utilizando Two-way ANOVA ( $P < 0,0001$ ), mostrou diferença significativa. As formulações apresentaram picos similares para o teor de Sb encontrado no soro. Porém, a partir de 3 horas do início do estudo as concentrações médias de Sb foram consistentemente maior para a formulação AM: $\beta$ -CD 7:1.

Estes dados revelam uma absorção prolongada de Sb quando o AM está complexado com a  $\beta$ -CD, confirmando a hipótese de que a formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 pode atuar como sistema de liberação sustentada da droga AM, e assim, prolongar o tempo de absorção de Sb.

A presença de agregados supramoleculares, identificados na formulação AM: $\beta$ -CD 7:1, provavelmente contribuíram na elaboração de um sistema de liberação prolongada e na promoção de uma melhor absorção oral do AM. A redução do tamanho das partículas ocorre concomitantemente à liberação da droga, sugerindo que o Sb é absorvido como resultado da transformação de

nanopartículas maiores em nanopartículas menores. Assim, supõe-se que a liberação do AM pode ser controlada pela labilidade da ligação Sb-O-( $\beta$ -CD).

Esta idéia é consistente com a observação prévia de que complexos Sb-meglumina de alto peso molecular e complexos Sb-(ribonucleoside)<sub>2</sub> dissociam lentamente após serem diluídos em água, como resultado da labilidade da ligação covalente Sb-O-C [54]. Este mecanismo também se apóia na observação de que soluções diluídas de AM tendem a despolimerizar a complexos Sb-meglumina 1:1 [14] e que estes complexos promovem níveis mais elevados de Sb no soro após sua administração oral em camundongos [34].

Um outro estudo mostrou que uma preparação do AM polimerizado apresentou baixa absorção oral de Sb quando comparada a uma preparação do AM despolimerizado ( $5,3 \pm 1,4$  vs.  $7,5 \pm 0,6$  mg/L) [62]. Os complexos Sb-meglumina 1:1 de baixo peso molecular provavelmente atravessam o epitélio gastrointestinal por difusão simples e a  $\beta$ -CD migra pelo intestino e cólon, onde será degradada enzimaticamente [31].

#### **4.5- Avaliação da absorção oral de Sb em camundongos Swiss a partir das formulações AM e AM: $\beta$ -CD 7:1**

Neste estudo, as concentrações sérica de Sb foram determinadas por GFAAS, após 1 e 3 horas da administração oral das composições do AM (0,7 mol Sb/L) e do AM: $\beta$ -CD 7:1 (0,7 mol Sb/L) em camundongos Swiss, na dose de 300 mg Sb/Kg.

Este experimento apresentou resultados semelhantes aqueles observados nos cães, ou seja, níveis comparáveis de Sb após 1 hora da administração destes compostos e níveis de Sb duas vezes maior na composição AM: $\beta$ -CD 7:1 após 3 horas da administração (Figura 4.12 e 4.13). O teste estatístico one-way ANOVA ( $P < 0,05$ ) confirmou que, no tempo de 3 horas, a composição AM: $\beta$ -CD 7:1 promoveu níveis de Sb significativamente maiores que a composição do AM.

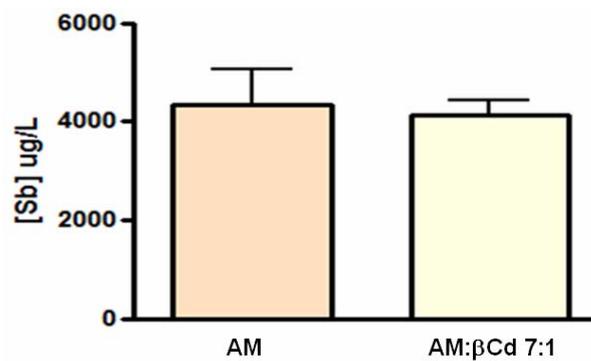


Figura 4.12: Concentração de Sb no soro de camundongos *Swiss* após 1 h da administração oral das composições do AM e do AM:β-CD 7:1 (300 mg Sb/Kg).

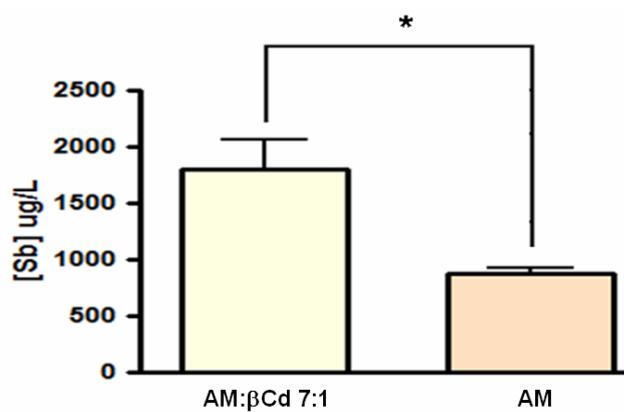


Figura 4.13: Concentração de Sb no soro de camundongos *Swiss* após 3 h da administração oral das composições do AM e do AM:β-CD 7:1 (300 mg Sb/Kg).

#### 4.6- Conclusões

A formulação não convencional AM: $\beta$ -CD 7:1 obtida apresentou alta solubilidade em água e não envolveu interações desta droga com a cavidade hidrofóbica da CD.

Os dados de  $^1\text{H}$  RMN condizem com esta proposta, pois, revelam um único sinal para cada um dos hidrogênios da  $\beta$ -CD. Considerando estas evidências, presume-se que o complexo AM: $\beta$ -CD 7:1 foi formado.

A espectroscopia de correlação de fótons da formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 demonstrou a formação de agregados supramoleculares que se dissociam lentamente.

Além de promover uma maior absorção oral de Sb em cães da raça Beagle em camundongos *Swiss*, a formulação AM: $\beta$ -CD 7:1 atuou como sistema de liberação sustentada, e conseguiu prolongar a absorção de Sb em relação ao AM.

Há muitos relatos na literatura do emprego da  $\beta$ -CD para liberação imediata ou planejada. Entretanto, este trabalho apresenta uma nova modalidade de liberação, baseada na interação Sb-O-( $\beta$ -CD).

## **CAPÍTULO 5: Caracterização físico-química dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG) e avaliação da capacidade destes novos complexos em promover a absorção de Sb em camundongos por via oral**

### **5.1- Introdução**

O Brasil é um dos países mais acometido pelas leishmanioses [2, 9]. Em nosso país, o tratamento desta patologia é realizado através da administração intravenosa ou intramuscular do fármaco hidrofílico antimoniato de meglumina (AM). Além de tóxico, o tratamento dificulta a adesão dos pacientes, pois requer internação por um longo período. Outro fator limitante na terapêutica dessa doença no Brasil é sua grande ocorrência em zonas rurais com pouca assistência médica. Nesse contexto, desistências do tratamento são freqüentes, o que tende a aumentar os reservatórios da doença e o aparecimento de formas resistentes do parasito [12, 17, 26].

Como a *Leishmania* tem localização intracelular [5], ao se planejar novos fármacos leishmanicidas deve-se considerar que eles tenham a capacidade de atravessar barreiras biológicas, pouco permeáveis a drogas hidrofílicas. Sabe-se que a principal vantagem dos fármacos lipofílicos é sua grande facilidade em atravessar barreiras, tais como: membrana plasmática, epitélio do trato gastrointestinal e pele. Entretanto, compostos muito apolares tendem a ficarem retidos na camada lipídica dessas barreiras, o que dificulta sua absorção e restringe sua utilização. Assim, a utilização de fármacos ou sistemas anfifílicos é mais apropriada e racional. Drogas lipofílicas também apresentam a possibilidade de serem administradas oralmente [27] e/ou em aplicação tópica e podem formar sistemas coloidais, que ajudarão a direcionar sua captação por células fagocitárias [9, 29].

A humanidade ainda não dispõe de um tratamento tópico eficaz que possa substituir a terapia convencional no tratamento da leishmaniose cutânea. Cabe lembrar que formulações tópicas do antimonial hidrofílico Pentostam® não mostraram ação terapêutica satisfatória, provavelmente devida a baixa absorção do Sb na forma complexada com o gluconato [25]. Em face dessas limitações, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a pesquisa de

novos fármacos e formulações, bem como de vias de administração mais simples e seguras, como as vias oral e tópica [44].

Este capítulo apresenta a caracterização físico-química dos novos compostos anfifílicos de Sb(V) obtidos com as alquilmetilglucamidas [28], octanoil N-metil-glucamida (LA8), decanoil N-metil-glucamida (LA10) e dodecanoil N-metil-glucamida (LA12), e avalia a capacidade destes complexos em promover a absorção oral de Sb em camundongos *Swiss*.

## 5.2- Caracterização físico-química dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG)

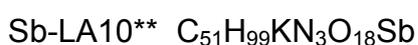
### 5.2.1- Microanálises dos complexos Sb-AMG

Os resultados dos percentuais dos elementos C, H, N, K e Sb dos novos complexos Sb-AMG são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Percentuais dos elementos C, H, N, Sb e K encontrados para os complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio.

Proposta	Calculado					Experimental				
	%C	%H	%N	%Sb	%K	%C	%H	%N	%Sb	%K
Sb-LA8* (C <sub>45</sub> H <sub>87</sub> KN <sub>3</sub> O <sub>18</sub> Sb)	48,30	7,84	3,76	10,88	3,5	47,28	7,85	3,75	10,69	3,6
Sb-LA10** (C <sub>51</sub> H <sub>99</sub> KN <sub>3</sub> O <sub>18</sub> Sb)	50,91	8,29	3,49	10,12	3,2	49,48	8,19	3,62	10,24	3,3
Sb-LA12*** (C <sub>57</sub> H <sub>111</sub> KN <sub>3</sub> O <sub>18</sub> Sb)	53,18	8,69	3,26	9,46	3,0	51,89	8,68	3,40	9,25	2,9

Esses dados sugerem a formação de complexos Sb(V):ligante com estequiometria 1:3 e com as seguintes fórmulas mínimas:



### 5.2.2- Condutividade dos complexos Sb-AMG

As medidas de condutividade elétrica dos complexos Sb-AMG foram feitas com uma solução aquosa de concentração  $10^{-3}$  mol/L. Os resultados obtidos foram comparados aos resultados obtidos para eletrólitos padrões de estequiometria 1:1 e 2:1. Os resultados são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Medidas de condutividade elétrica

<b>Composto</b>	<b>(<math>\mu\text{S/cm}</math>)</b>
KCl	161,4
NaCl	126,3
Ba(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	259,7
CaCl <sub>2</sub>	274,4
Sb-LA8	105,79
Sb-LA10	99,46
Sb-LA12	93,06

Observou-se que a condutividade elétrica dos novos antimoniais anfífilos é compatível com a presença de eletrólitos de estequiometria 1:1. Esse resultado indica que esses complexos possuem uma carga negativa e um contra íon K<sup>+</sup>.

### 5.2.3- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho dos complexos Sb-AMG

Os espectros de absorção no infravermelho dos complexos Sb-AMG são muito semelhantes entre si (Figura 5.1), porém, em relação aos respectivos ligantes anfífilos eles apresentaram algumas alterações (Figuras 5.2, 5.3 e 5.4).

A banda forte em  $1625\text{ cm}^{-1}$ , característica do grupo C=O de amidas alifáticas terciárias, não deslocou, portanto, o Sb não se coordenou neste sítio. Foram observadas mudanças significativas na região das bandas de deformação angular no plano dos grupos O-H ( $1493\text{-}1205\text{ cm}^{-1}$ ) e C-O ( $1105\text{-}$

1031  $\text{cm}^{-1}$ ), indicando que o Sb reagiu com as hidroxilas dos ligantes anfifílicos. Também verificou-se alargamento na banda relacionada às vibrações de estiramento dos grupos O-H, em 3338-3346  $\text{cm}^{-1}$  [51].

As bandas em 2916-2924  $\text{cm}^{-1}$  e 2847-2851  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes às deformações axiais C-H alifático, mostram que a cadeia carbônica não sofreu modificações.

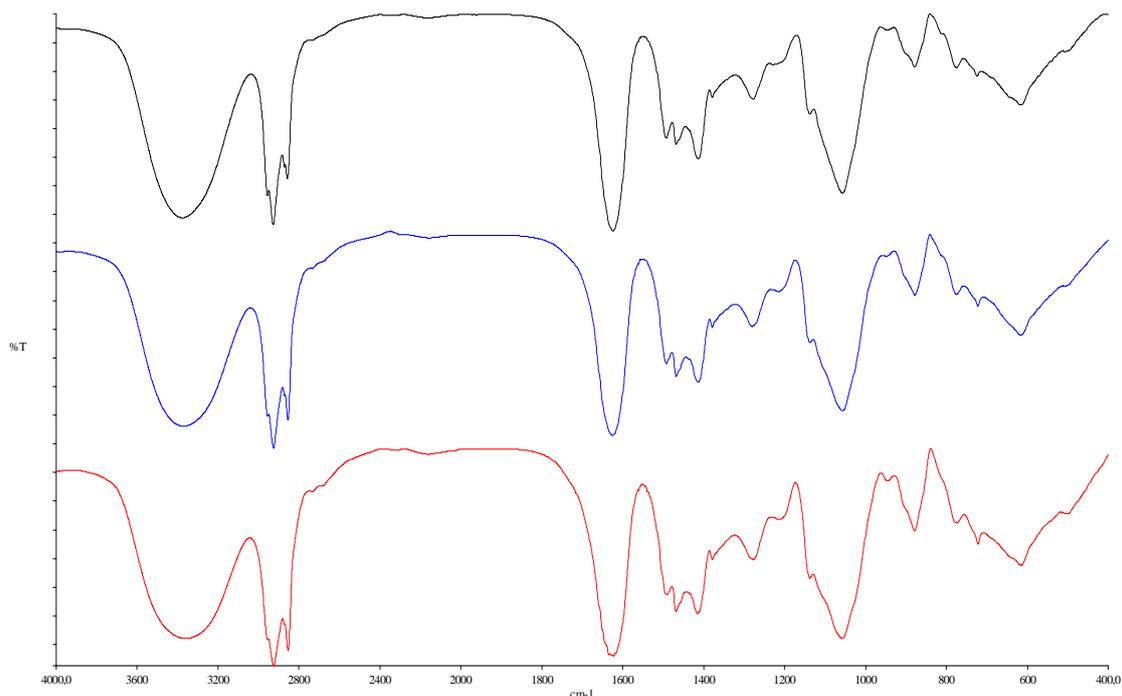


Figura 5.1: Espectro no infravermelho dos complexos Sb-LA8 (Preto), Sb-LA10 (Azul) e Sb-LA12 (Vermelho).

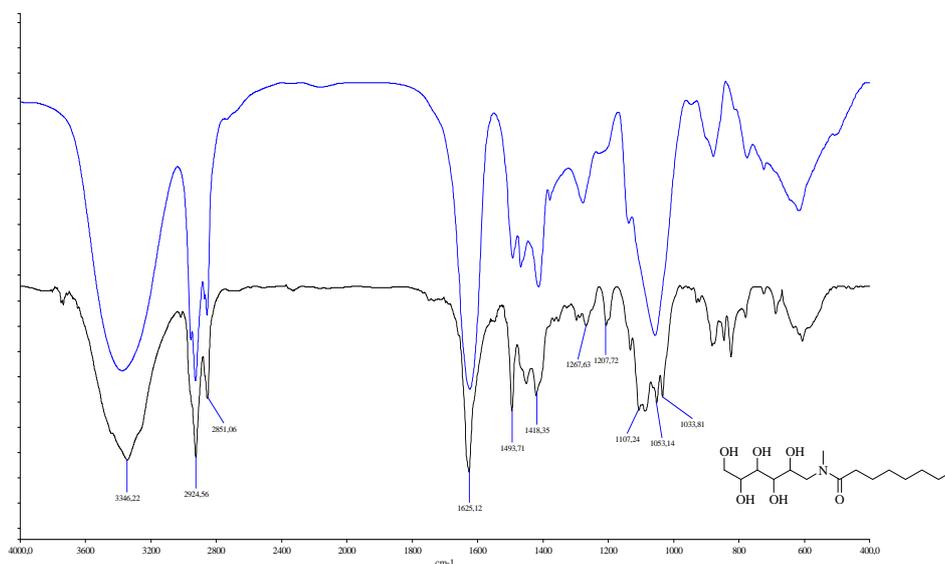


Figura 5.2: Espectro no infravermelho do LA8 e do complexo Sb-LA8 (Azul).

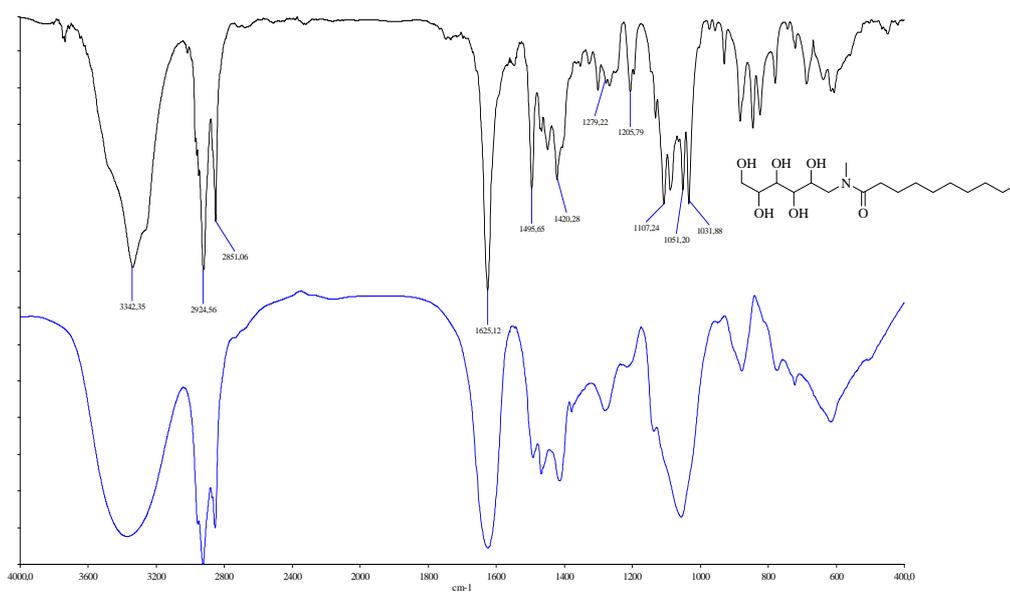


Figura 5.3: Espectro no infravermelho do LA10 e do complexo Sb-LA10 (Azul).

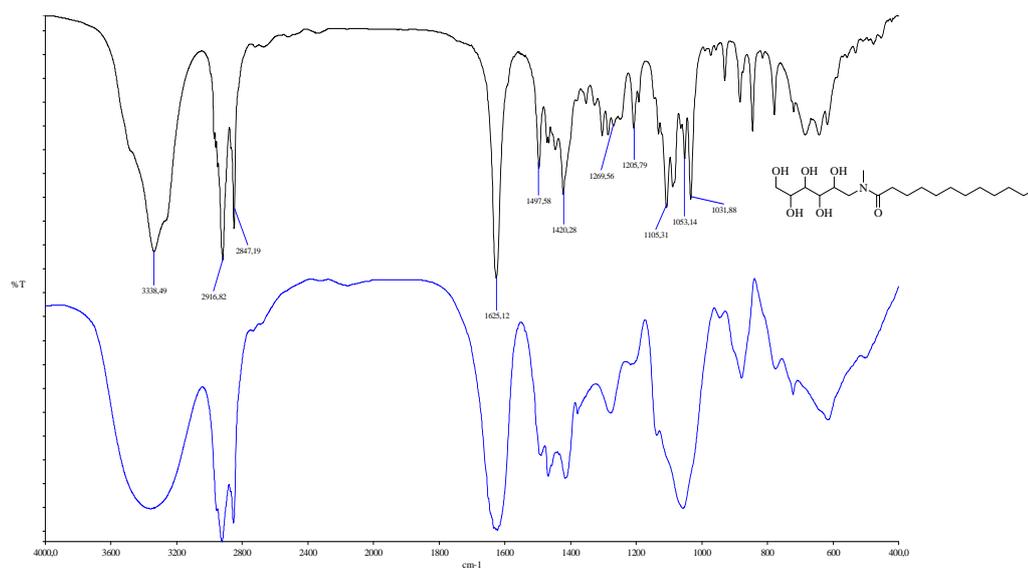


Figura 5.4: Espectro no infravermelho do LA12 e do complexo Sb-LA12 (Azul).

### 5.2.4- Estudos de RMN do ligante anfílico octanoil-N-metil-glucamida (LA8) e do complexo Sb-LA8

Como os sítios de ligação para o Sb são idênticos em todos os ligantes utilizados, os estudos de RMN foram realizados somente para os complexos obtidos através da reação do  $\text{Sb}(\text{OH})_6^-$  com o octanoil-N-metil-glucamida (Sb-LA8). Devida a menor extensão da cadeia carbônica, este ligante apresenta menor tendência em formar micelas [28] e, portanto, seu espectro possui uma resolução melhor que os dos complexos LA10 e LA12.

A Figura 5.5 mostra o espectro de  $^1\text{H}$  RMN do octanoil-N-metil-glucamida, em  $\text{CDCl}_3$  e a Tabela 5.3 apresenta os principais deslocamentos químicos e as integrais para seus hidrogênios [51, 64]. Estudos com as técnicas COSY e HMQC auxiliaram na atribuição dos sinais.

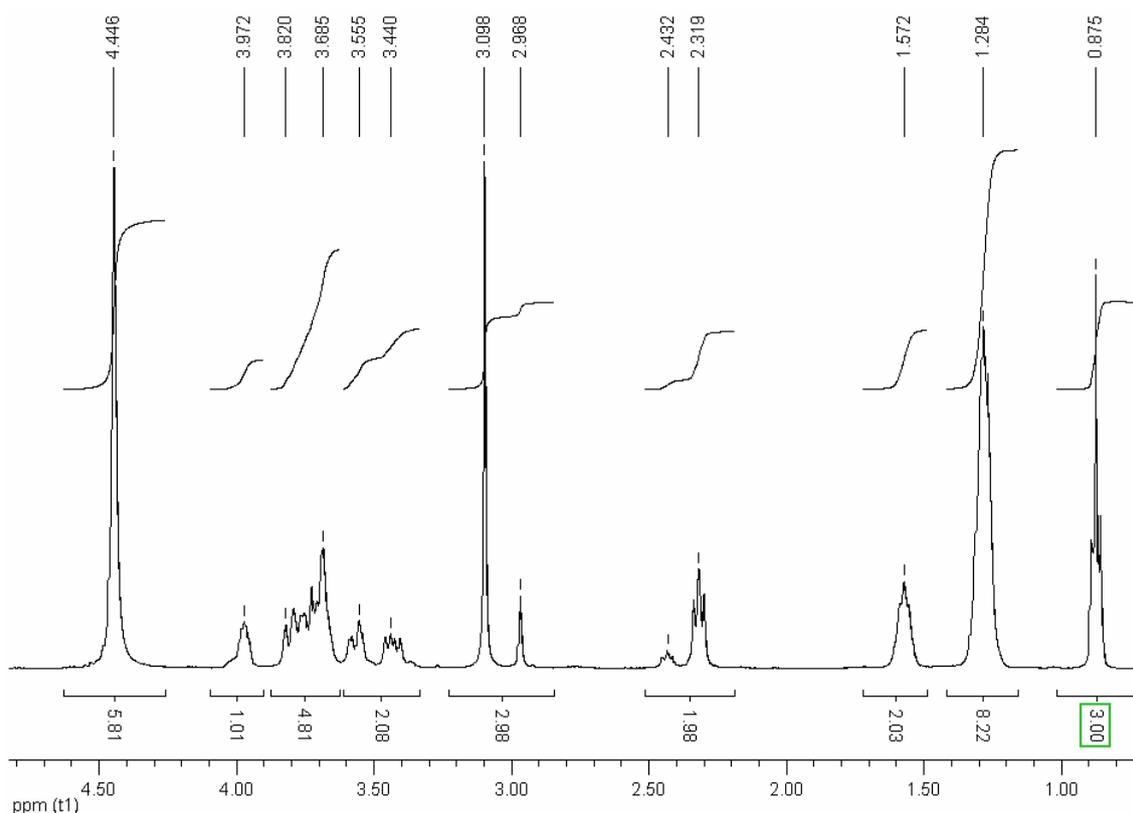
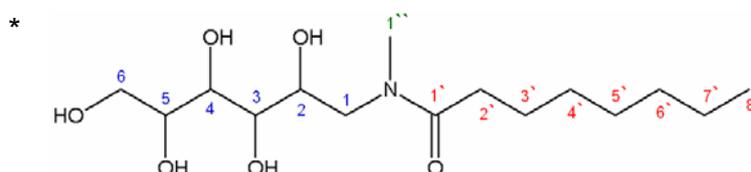


Figura 5.5: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) do LA8 em  $\text{CDCl}_3$ .

Tabela 5.3: Atribuição dos principais deslocamentos químicos de hidrogênios (ppm) encontrados para o ligante anfifílico octanoil-N-metil-glucamida\* em  $\text{CDCl}_3$ .

H	Deslocamento químico (ppm)	Integral	
		Encontrado	Esperado
2`	2,32 e 2,43	1,98	2
3`	1,57	2,03	2
4` ao 7`	1,28	8,22	8
8`	0,87	3,00	3
1``	2,97 e 3,10	2,98	3
1	3,44 e 3,55	2,08	2
2	3,97	1,01	1
3	3,68	4,81	5
4 ou 5	3,73		
4 ou 5	3,75		
6	3,82		



Os mapas de contorno obtidos pelo COSY (Figura 5.6) permitiram confirmar os sinais de  $^1\text{H}$  RMN da parte apolar do ligante através das correlações:  $\text{H}2'/\text{H}3'$ ,  $\text{H}3'/\text{H}4'$ ,  $\text{H}7'/\text{H}8'$ . Esta técnica também mostrou a correlação do  $\text{H}1$ , identificado por HMQC (Figura 5.7 e 5.8), ao  $\text{H}2$  e deste com o  $\text{H}3$ . O HMQC confirmou a posição do  $\text{H}6$ .

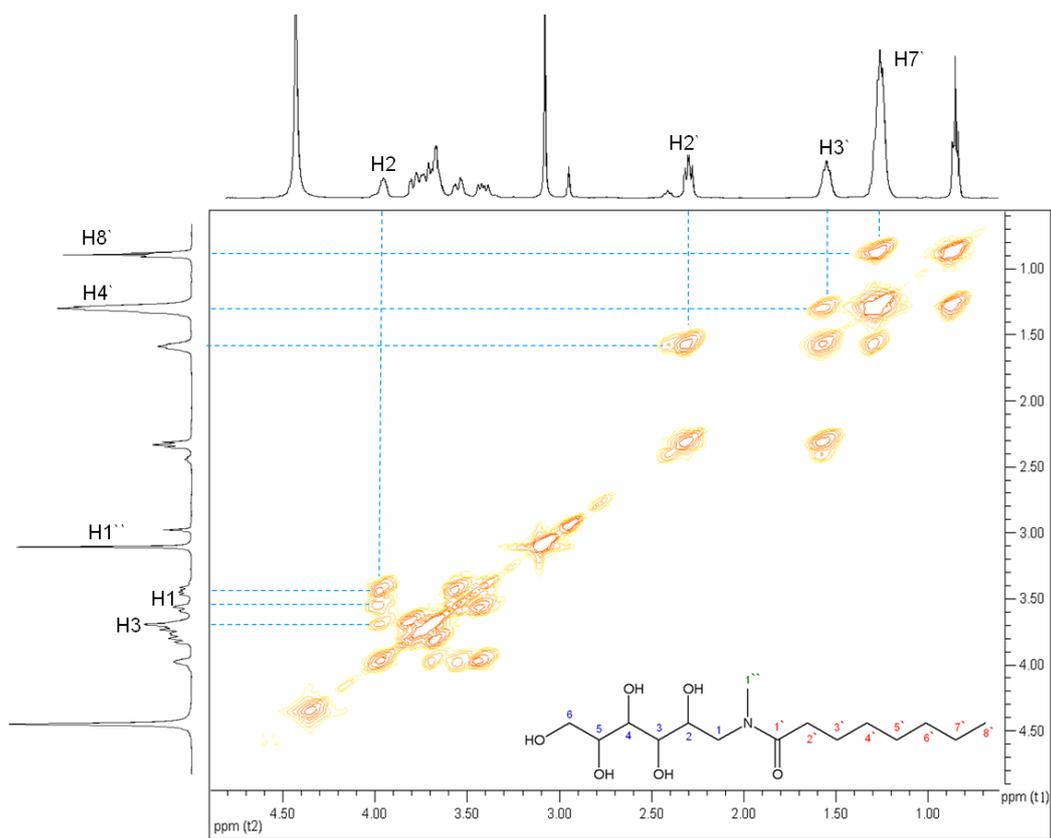


Figura 5.6: COSY (400 MHz) do LA8 em CDCl<sub>3</sub>.

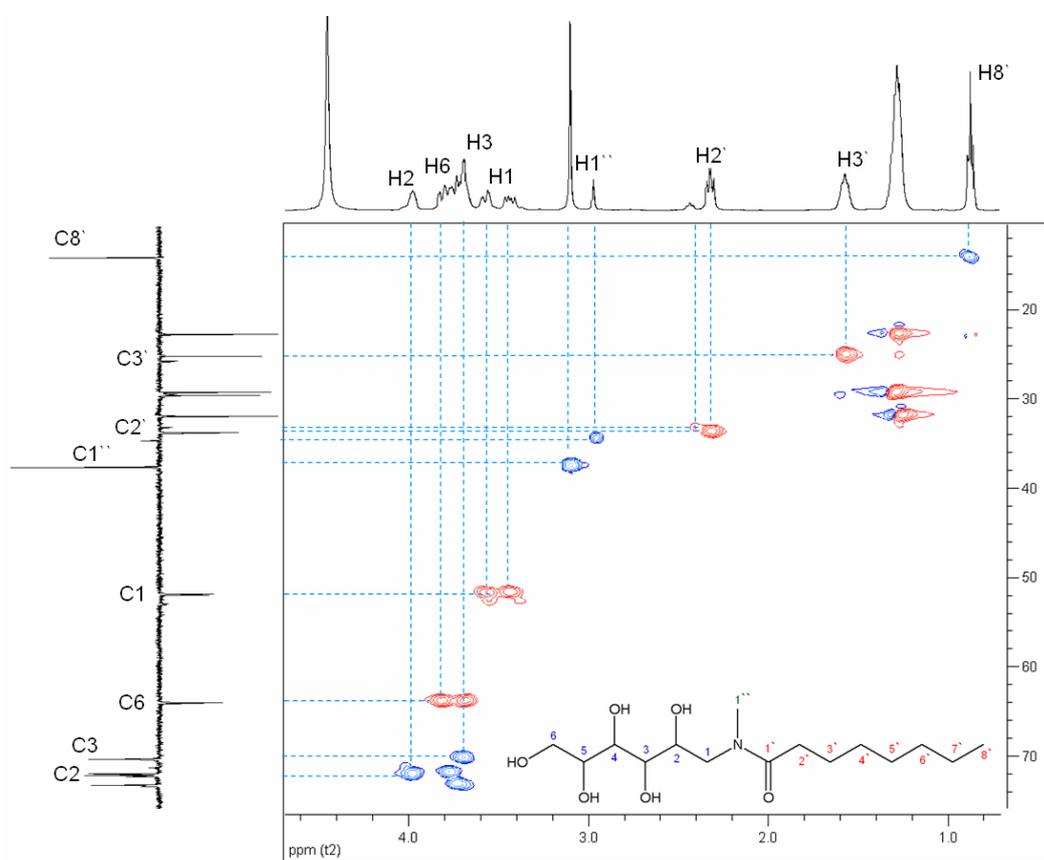


Figura 5.7: HMQC (400 MHz) do LA8 em CDCl<sub>3</sub>.

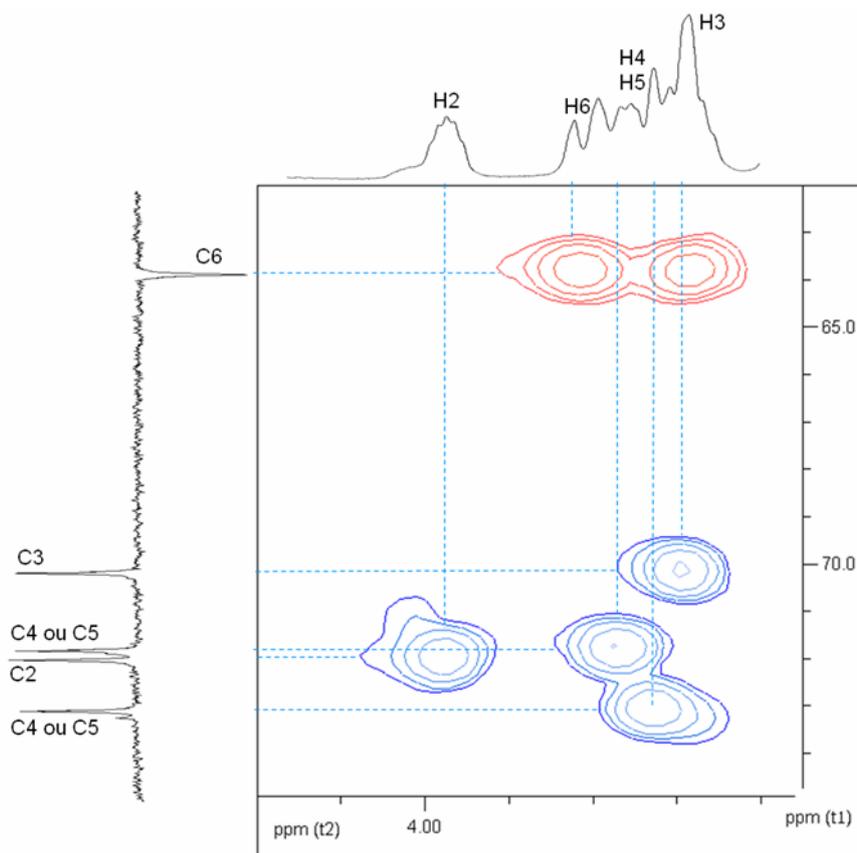


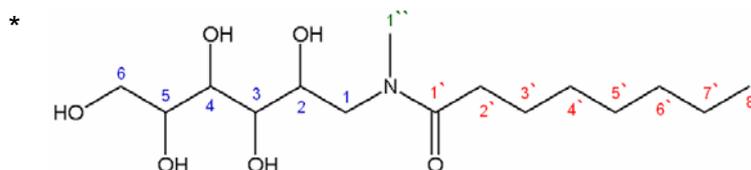
Figura 5.8: Expansão do HMQC (400 MHz) do LA8 ( $\text{CDCl}_3$ ) entre 3,8 - 4,4 ppm

A identificação dos sinais dos hidrogênios (ppm) presentes no espectro do ligante LA8 facilitou a atribuição dos principais deslocamentos químicos de carbono (ppm) (Tabela 5.4) verificados no mapa de contorno HMQC (Figura 5.7). As correlações verificadas foram: H1/C1, H2/C2, H3/C3, H6/C6, H2'/C2', H3'/C3', H8'/C8' e H1''/C1''. Entretanto, a atribuição de sinais, não foi possível para os carbonos C4 e C5 e seus respectivos hidrogênios, H4 e H5.

Não existe na literatura a caracterização deste ligante por técnicas de RMN, portanto, este estudo foi essencial na caracterização do complexo Sb-LA8 obtido.

Tabela 5.4: Atribuição dos principais deslocamentos químicos de carbonos (ppm) encontrados para o ligante anfifílico octanoil-N-metil-glucamida\* em  $\text{CDCl}_3$ .

C	Deslocamento químico (ppm)
2'	33,08 e 33,66
3'	25,05 e 25,66
4' ao 7'	22,65; 29,12; 29,44 e 31,79
8'	14,09
1''	34,57 e 37,55
1	51,74 e 52,82
2	72,05
3	70,21
4 ou 5	71,85
4 ou 5	73,13
6	63,89



As Figuras 5.9 e 5.10 apresentam os espectros de  $^1\text{H}$  RMN e DEPT do complexo Sb-LA8 em  $\text{CDCl}_3$  e a Tabela 5.5 apresenta os principais deslocamentos químicos para os hidrogênios e carbonos. Como os estudos pelas técnicas COSY e HMQC não apresentaram resolução apropriada, quando necessário, a atribuição dos sinais seguiu aquela já estabelecida para o ligante.

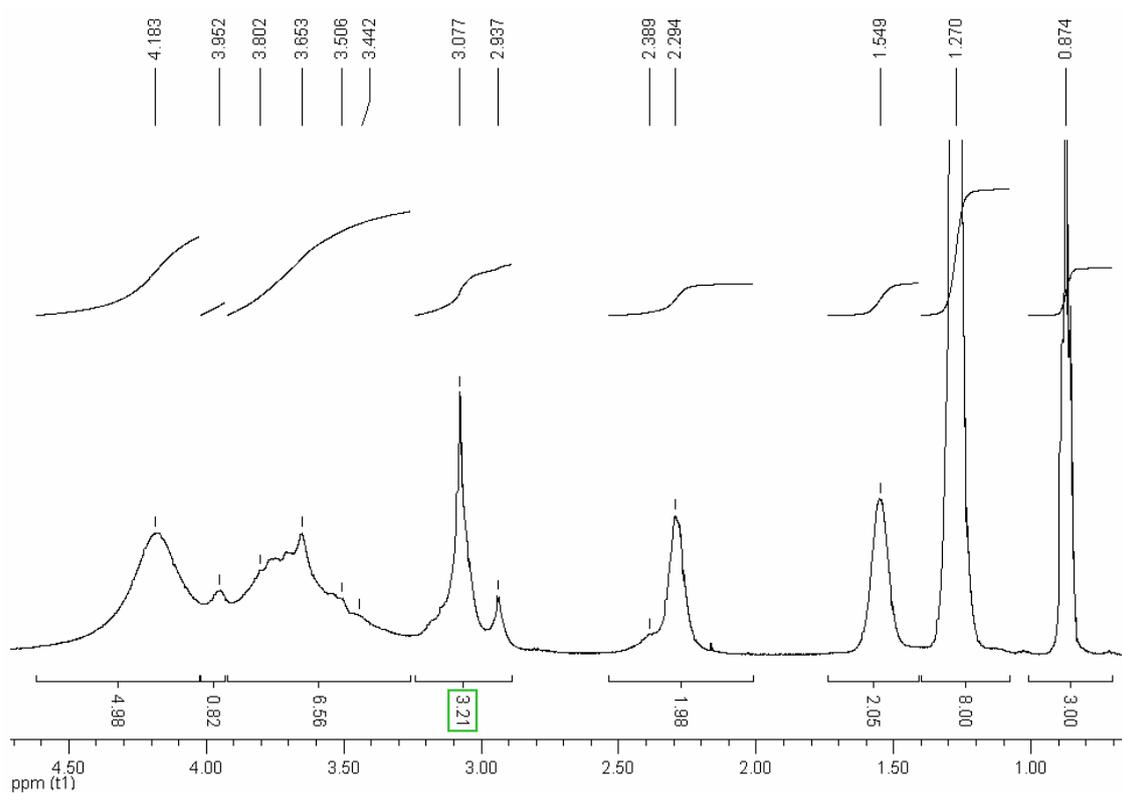


Figura 5.9:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) do complexo Sb-LA8 em  $\text{CDCl}_3$ .

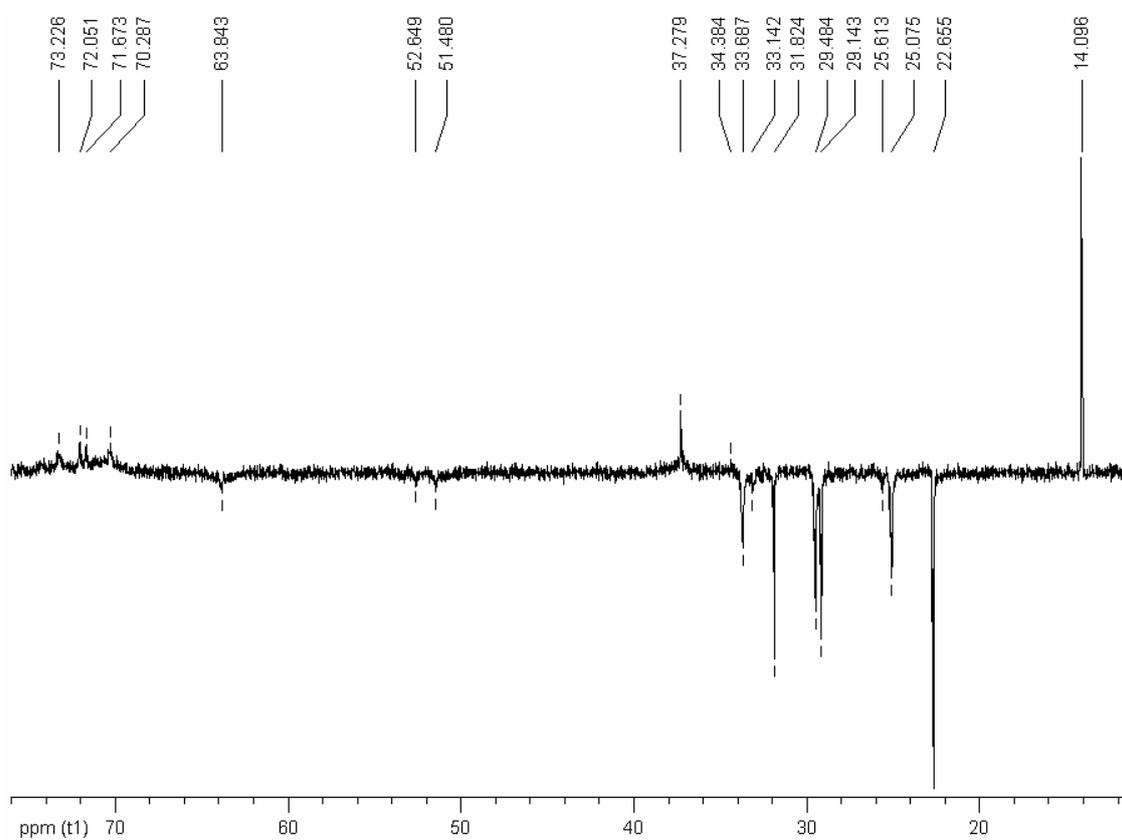
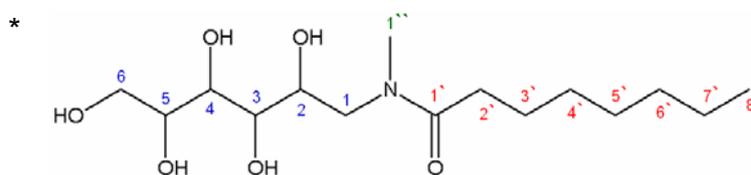


Figura 5.10: DEPT (400 MHz) do complexo Sb-LA8 em  $\text{CDCl}_3$ .

Tabela 5.5: Atribuição dos principais deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos (ppm) encontrados para o complexo Sb-LA8 em  $\text{CDCl}_3$  (LA8\*).

H / C	Deslocamento químico C (ppm)	Deslocamento químico H (ppm)	Integral H	
			Encontrado	Esperado
2`	33,14 e 33,69	2,29 e 2,39	1,98	2
3`	25,08 e 25,61	1,55	2,05	2
4` ao 7`	22,66; 29,14; 29,49 e 31,82	1,27	8	8
8`	14,09	0,87	3,00	3
1``	34,38 e 37,28	2,94 e 3,08	3,21	3
2	72,05	3,95	0,82	1
1	51,48 e 52,65	3,44 e 3,50	6,56	7
3	70,29	3,65		
4 ou 5	71,67	3,71		
4 ou 5	73,23	3,75		
6	63,84	3,80		



Ao se comparar os espectros de RMN do octanoil-N-metil-glucamida (Figura 5.6 e 5.7) e do complexo Sb-LA8 (Figura 5.9 e 5.10), mudanças importantes são observadas na região onde se espera a ressonância dos prótons e carbonos da parte polar do ligante, indicando complexação do Sb nesta região.

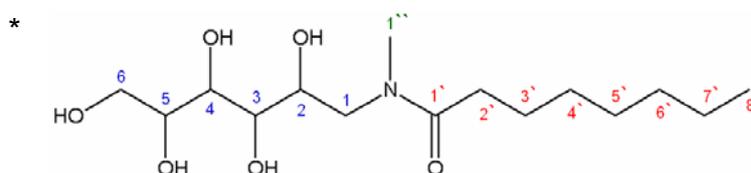
As maiores variações nos deslocamentos químicos foram verificadas nos sinais dos carbono C1 e C1``, entretanto, por não terem hidroxilas, não se espera coordenação do Sb com estes sítios. Dos carbonos hidroxilados, C4 e C5 foram os que apresentaram maior variação nos deslocamentos químicos, assim, supõe-se que o Sb coordenou com as hidroxilas destes carbonos. Em

relação ao deslocamento químico, os sinais dos hidrogênios não apresentaram mudanças significativas (Tabela 5.6).

Tabela 5.6: Variações dos deslocamentos químicos ( $\Delta \delta$ ) de hidrogênios e carbonos encontrados entre o octanoil N-metil-glucamida\* e o complexo Sb-LA8.

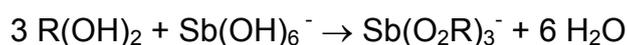
H ou C	$\Delta \delta$ (ppm) H	$\Delta \delta$ (ppm) C
2'	0,03 e 0,04	-0,06 e -0,03
3'	0,02	-0,03 e 0,05
4' ao 7'	0,01	-0,01; -0,02; -0,05; -0,03
8'	0	0
1''	0,03 e 0,02	0,19 e 0,27
1	0 e 0,05	0,26 e 0,17
2	0,02	0
3	0,03	- 0,08
4 ou 5	0,02	0,18
4 ou 5	0	- 0,1
6	0,02	0,05

$$\Delta \delta = \delta [\text{octanoil-N-metil-glucamida}] - \delta [\text{Sb-LA8}]$$



Com intuito de avaliar os cinco hidrogênios presentes nas hidroxilas desses compostos, um outro estudo de  $^1\text{H}$  RMN foi realizado em DMSO, pois, neste solvente não se observa troca entre os prótons. No espectro do octanoil-N-metil-glucamida os sinais verificados entre 5,0 e 4,0 ppm foram atribuídos a estes hidrogênios e a soma de suas integrais é igual a 4,9 (Figura 5.11). Já no espectro do Sb-LA8 (Figura 5.12), os sinais verificados entre 5,0 e 4,0 ppm

também foram atribuídos a estes hidrogênios e a soma de suas integrais é igual a 2,5. A diferença de 2,4 hidrogênios entre o complexo e o ligante pode ser atribuída à coordenação de pelo menos duas hidroxilas de cada ligante ao ligante ao  $\text{Sb(OH)}_6^-$ . Apoiados pelos resultados das microanálises (C, H, N, Sb), os dados de RMN confirmam a formação de complexos  $\text{Sb(V)}:\text{ligante}$  anfifílico 1:3 (Equação 5.1 ) e permitem propor a seguinte fórmula estrutural para o complexo  $\text{Sb-LA8}$  (Figura 5.13).



Equação 5.1: Estequiometria de formação do complexo  $\text{Sb-LA8}$ .

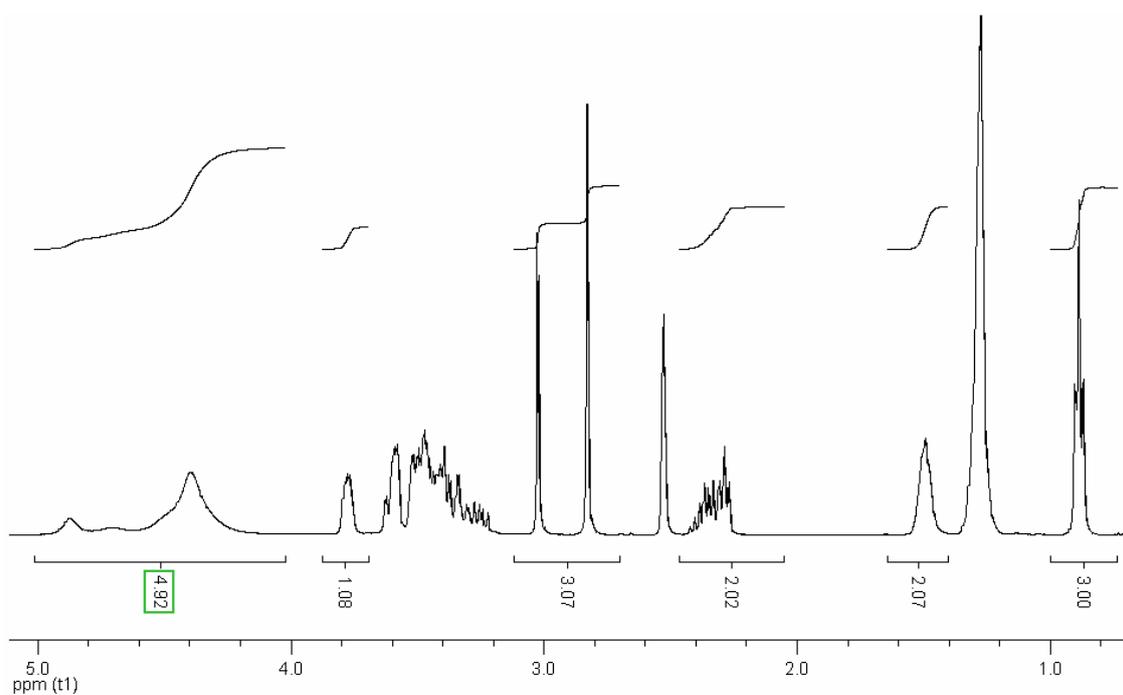


Figura 5.11: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) do LA8 em  $\text{DMSO-d}_6$ .

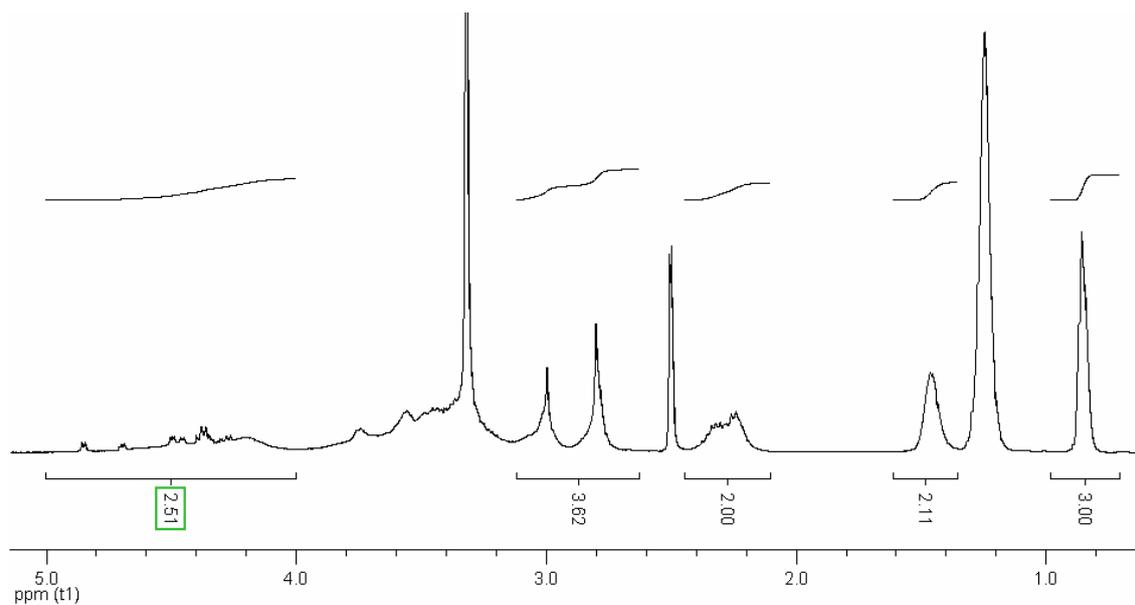


Figura 5.12: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) do complexo Sb-LA8 em  $\text{DMSO-}d_6$ .

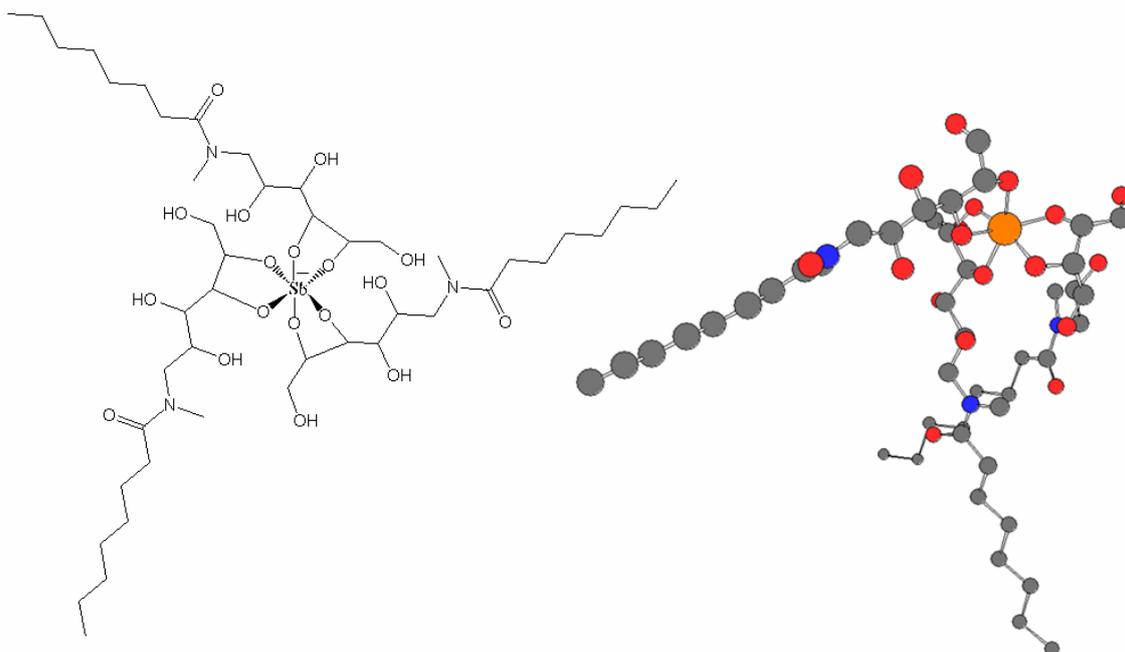


Figura 5.13: Estrutura proposta para o complexo Sb-LA8.

### 5.2.5- Avaliação dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG) por espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray (ESI-MS)

A ESI-MS contribuiu significativamente na caracterização molecular dos produtos obtidos a partir da reação do  $\text{KSb}(\text{OH})_6$  com as alquilmetilglucamidas LA8, LA10 e LA12. Esta técnica é empregada com grande sucesso na análise estrutural detalhada de várias classes de espécies metalo-orgânicas e complexos inorgânicos [46, 65]. Os espectros ESI(-)-MS dos novos complexos anfifílicos de Sb(V) apresentaram uma distribuição isotópica característica para espécies que contém a proporção  $^{121}\text{Sb}(57\%):^{123}\text{Sb}(43\%)$ .

O principal sinal encontrado no espectro do complexo Sb-LA8 (Figura 5.14),  $m/z$  1078,87, corresponde ao complexo Sb-LA8 1:3. Os íons  $m/z$  757,63, 775,67 e 793,64 correspondem a complexos Sb-LA8 1:2. Já os íons  $m/z$  918,28 (Figura 5.15) e  $m/z$  1874,88 foram atribuídos a complexos Sb-LA8 2:5.

Os experimentos ESI(-)MS/MS para o íon  $m/z$  1078,60, complexo Sb-LA8 1:3 (Figura 5.16), demonstram que a perda de uma molécula do ligante origina o fragmento  $m/z$  757,49 (Sb-LA8 1:2). A Tabela 5.7 apresenta a razão massa/carga ( $m/z$ ) das principais espécies observadas no espectro e a respectiva fórmula molecular proposta.

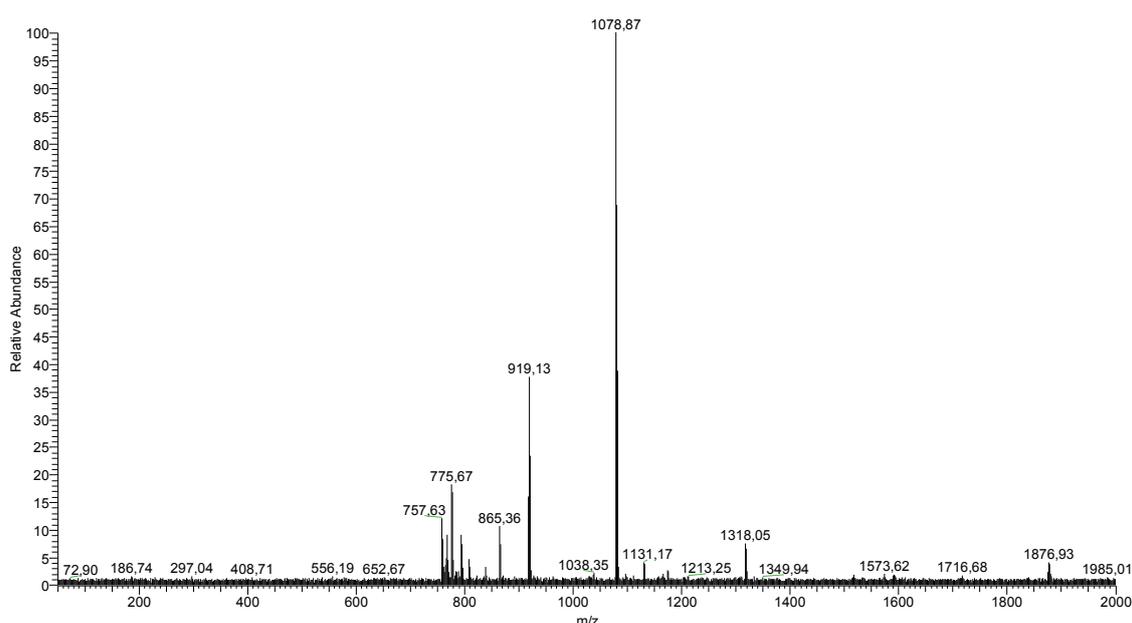


Figura 5.14: Espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA8 em água.

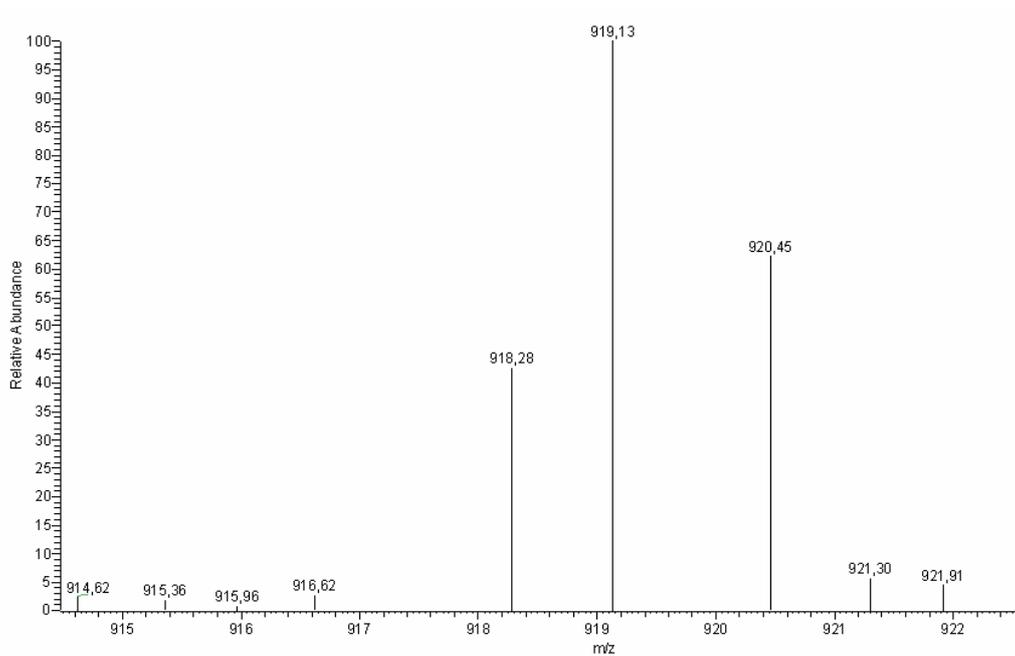


Figura 5.15: Expansão do espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA8 obtido em água.

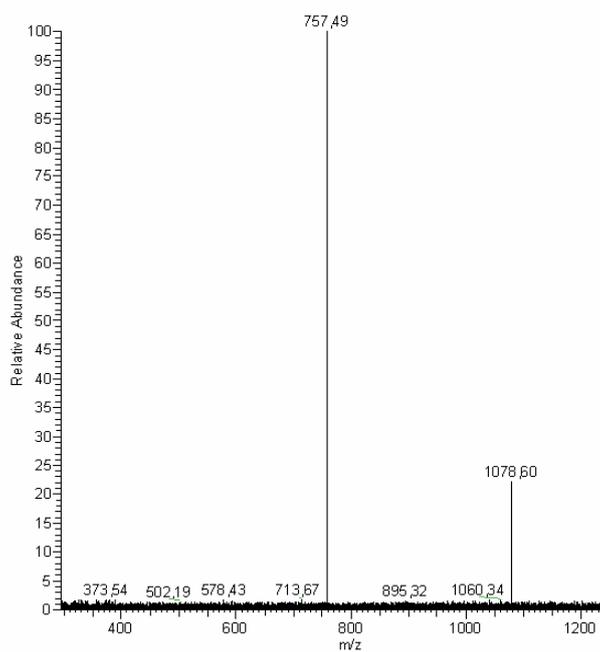


Figura 5.16: Espectro MS/MS para o íon de  $m/z$  igual a 1078,60.

Tabela 5.7: Espécies iônicas identificadas no espectro de ESI(-)-MS do complexo Sb-LA8 em água <sup>a</sup>.

Espécies Aniônicas	<i>m/z</i>
$[(2\text{LA}8-6\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}]^{-}$	757,3
757,3 + H <sub>2</sub> O ou $[(2\text{LA}8-4\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})]^{-}$	775,3
$[(2\text{LA}8-4\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_2]^{-}$	793,3
$[(5\text{LA}8-12\text{H})(\text{Sb}^{\text{V}})_2]^{-2}$	917,9
$[(3\text{LA}8-6\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}]^{-}$	1078,5
$[(5\text{LA}8-12\text{H}+\text{K})(\text{Sb}^{\text{V}})_2]^{-}$	1874,75

<sup>a</sup> proposta para os íons que mostraram os picos mais intensos.

O principal sinal encontrado no espectro do complexo Sb-LA10 (Figura 5.17), *m/z* 1163,4, corresponde ao complexo Sb-LA10 1:3. Os íons *m/z* 813,77, 831,90, 845,82 e 877,8 correspondem a complexos Sb-LA10 1:2. Já o íon *m/z* 988,45 foi atribuído a formação do complexo Sb-LA10 2:5 (Figura 5.18).

Os experimentos ESI-MS/MS para o íon *m/z* 1162,81, complexo Sb-LA10 1:3 (Figura 5.19), demonstram que a perda de uma molécula do ligante origina o fragmento *m/z* 813,59 (Sb-LA10 1:2). A Tabela 5.8 apresenta a razão *massa/carga* (*m/z*) das principais espécies observadas no espectro e a respectiva fórmula molecular proposta.

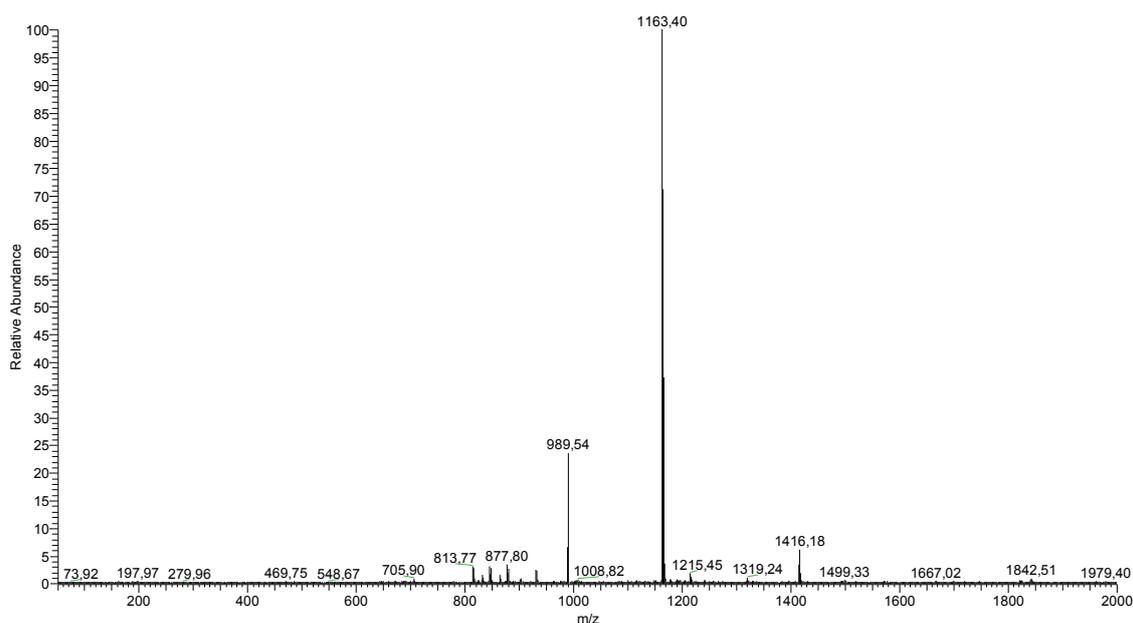


Figura 5.17: Espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA10 em água.

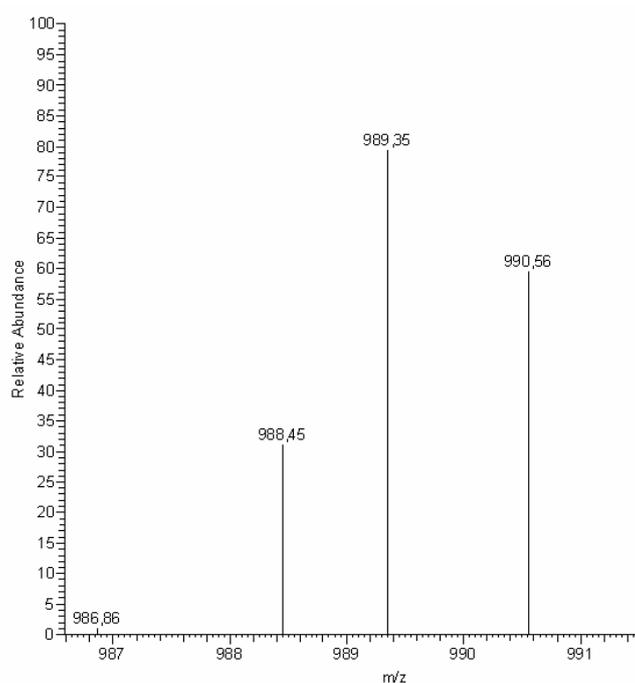


Figura 5.18: Expansão do espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA10 obtido em água.

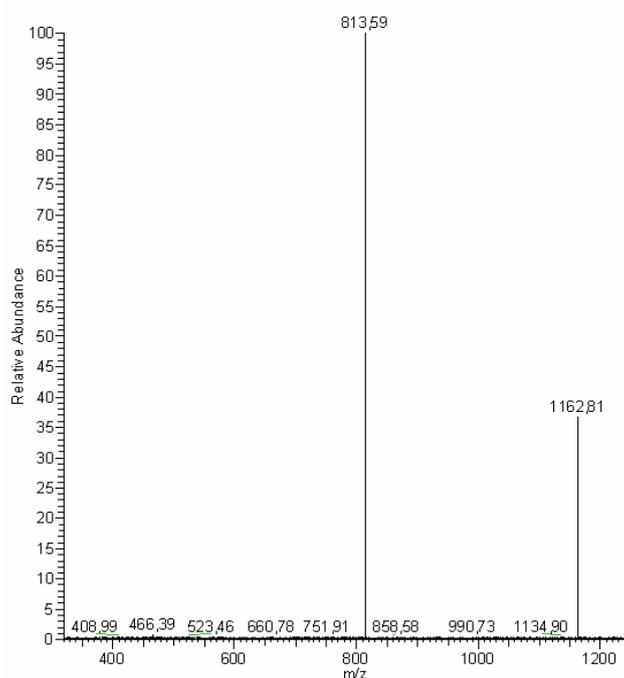


Figura 5.19: Espectro MS/MS para o íon de  $m/z$  igual a 1162,81.

Tabela 5.8: Espécies iônicas identificadas no espectro de ESI(-)-MS do complexo Sb-LA10 em água <sup>a</sup>.

Espécies Aniônicas	<i>m/z</i>
$[(2\text{LA}10-6\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}]^{-}$	813,35
813,35 + H <sub>2</sub> O ou $[(2\text{LA}10-4\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})]^{-}$	831,90
$[(2\text{LA}10-4\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{OH})_2]^{-}$	845,82
$[(2\text{LA}10-6\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})_2]^{-}$	877,3
$[(5\text{LA}10-12\text{H})(\text{Sb}^{\text{V}})_2]^{-2}$	988,00
$[(3\text{LA}10-6\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}]^{-}$	1162,60

<sup>a</sup> proposta para os íons que mostraram os picos mais intensos.

O principal sinal encontrado no espectro do complexo Sb-LA12 (Figura 5.20), *m/z* 1247,44, corresponde ao complexo Sb-LA12 1:3. Os íons *m/z* 869,81, 887,95 e 919,73 correspondem a complexos Sb-LA12 1:2. Já o íon *m/z* 1058,49 foi atribuído ao complexo Sb-LA12 2:5 (Figura 5.21).

Os experimentos ESI-MS/MS para o íon *m/z* 1246,91, complexo Sb-LA12 1:3 (Figura 5.22), demonstram que a perda de uma molécula do ligante origina o fragmento *m/z* 869,62 (Sb-LA12 1:2). A Tabela 5.9 apresenta a razão *massa/carga* (*m/z*) das principais espécies observadas no espectro e a respectiva fórmula molecular proposta.

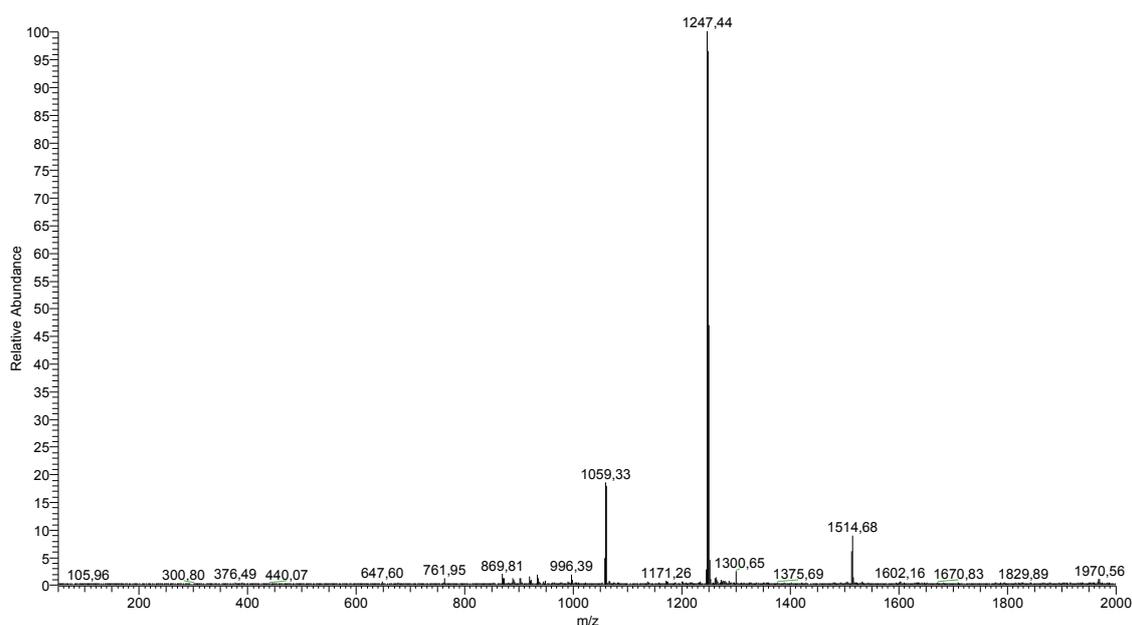


Figura 5.20: Espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA12 em água.

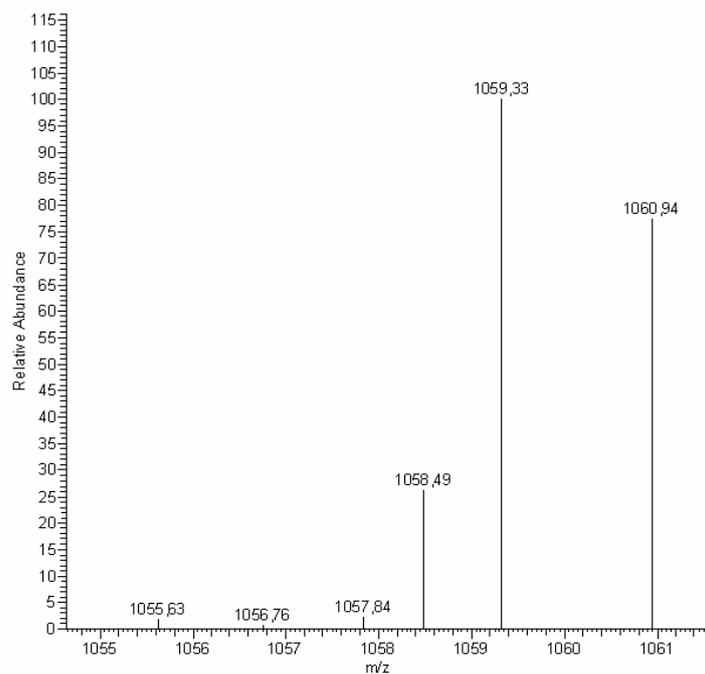


Figura 5.21: Expansão do espectro de massas ESI(-) do complexo Sb-LA12 obtido em água.

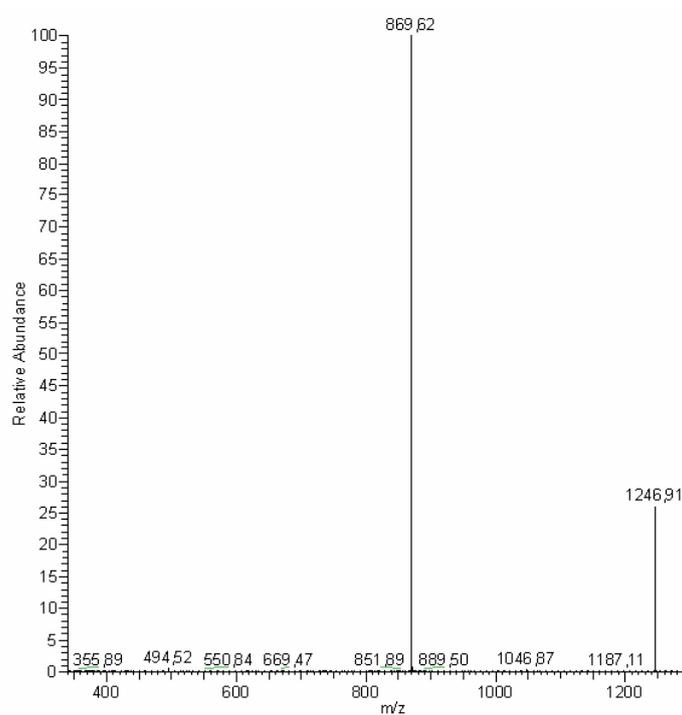


Figura 5.22: Espectro MS/MS para o íon de  $m/z$  igual a 1246,91.

Tabela 5.9: Espécies iônicas identificadas no espectro de ESI(-)-MS do complexo Sb-LA12 em água<sup>a</sup>.

<b>Espécies Aniônicas</b>	<b><i>m/z</i></b>
$[(2\text{LA}12-6\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}]^{-}$	869,41
869,41+ H <sub>2</sub> O ou $[(2\text{LA}12-4\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})]^{-}$	887,41
$[(2\text{LA}12-6\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}(\text{O})_2]^{-} + \text{H}_2\text{O}$	919,41
$[(5\text{LA}12-12\text{H})(\text{Sb}^{\text{V}})_2]^{-2}$	1058,05
$[(3\text{LA}12-6\text{H})\text{Sb}^{\text{V}}]^{-}$	1246,7

<sup>a</sup> proposta para os íons que mostraram os picos mais intensos.

### 5.2.6- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG)

Na MEV do complexo Sb-LA10 foram encontradas estruturas esféricas variando entre 50 e 700 nm de diâmetro (Figura 5.23). As imagens foram adquiridas a partir do composto seco em clorofórmio.

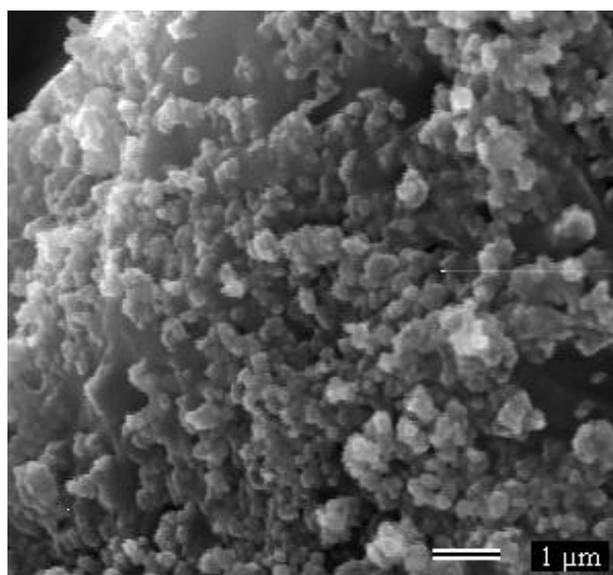


Figura 5.23: Microscopia Eletrônica de Varredura do Sb-LA10 (aumento de 10.000 vezes).

As amostras avaliadas por MET foram diluídas em água, depositadas sobre películas de formvar e coradas com acetato de uranila 5%.

Na MET do Sb-LA8 foram encontradas estruturas esféricas variando entre 20 e 180 nm de diâmetro (Figura 5.27).

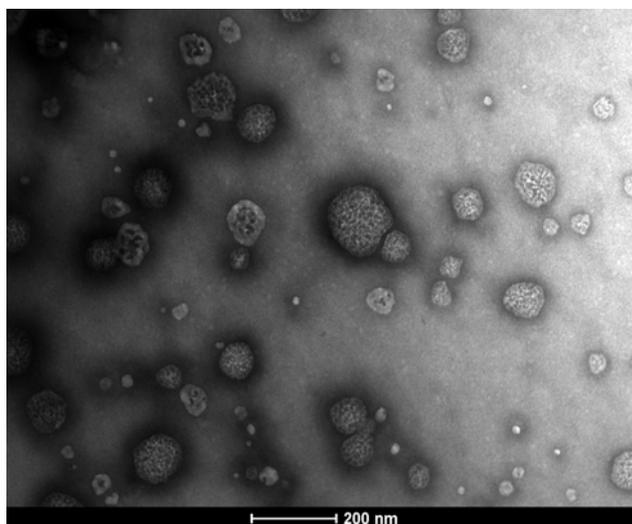


Figura 5.24: Microscopia Eletrônica de Transmissão do Sb-LA8 (aumento de 50.000 vezes).

Na MET do Sb-LA12 foram encontradas estruturas esféricas variando entre 20 e 100 nm de diâmetro (Figura 5.28).

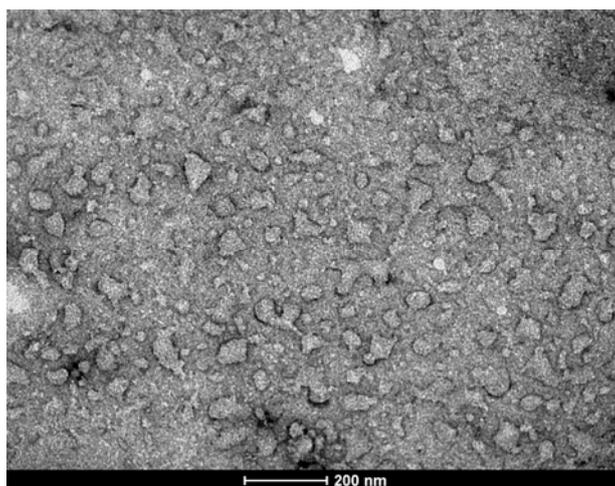


Figura 5.25: Microscopia Eletrônica de Transmissão do Sb-LA12 (aumento de 50.000 vezes).

Os resultados obtidos pela MET indicam que, quando diluídos em água (0,001 mol/L Sb), os complexos Sb-AMG podem formar nanoagregados de diâmetro médio entre 20 e 200 nm. Partículas deste diâmetro podem ser utilizadas para administração endovenosa sem o risco de formar trombos nos microcapilares sanguíneos.

### **5.2.7- Avaliação dos nanoagregados formados pelo complexo Sb-LA8 por dicroísmo circular (DC)**

Estudos de dicroísmo circular (DC) foram utilizados para avaliar a dissociação dos nanoagregados formados pelo complexo Sb-LA8, a 25 °C e a 60 °C, e sua cinética de formação a 60 °C.

#### **5.2.7.1- Estudo da dissociação dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 a 25 °C por DC**

Para avaliar a dissociação dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 a 25 °C, uma solução deste foi preparada em água na concentração 2,5 mmol/L de Sb e os espectros de DC obtidos, entre 190 e 280 nm, nos tempos: 0 min, 15 min e 30 min. Uma solução preparada a partir da mistura do  $\text{KSb(OH)}_6$  (2,5 mmol/L de Sb) e do LA8 (7,5 mmol/L) foi utilizada como modelo de complexo dissociado. O ligante LA8 (7,5 mmol/L) também foi avaliado na ausência de Sb. Por não ter cromóforo e ser altamente simétrico, o  $\text{KSb(OH)}_6$  não apresenta sinal por DC, portanto, somente o ligante e o antimônio complexado contribuíram nos espectros obtidos.

O espectro de DC do ligante apresentou uma banda em 194 nm ( $\Delta\epsilon = -2,1 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) e dois pequenos ombros em 203 e 205 nm, sendo bastante diferente do espectro verificado para o complexo Sb-LA8, que apresentou uma banda bem definida em 205 nm ( $\Delta\epsilon = -2,75 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). O espectro de DC do ligante também foi muito diferente do observado para o modelo de complexo dissociado, porém, o espectro deste último foi semelhante ao do Sb-LA8, indicando que em soluções diluídas (25 °C) o antimônio já estabelece interação com o LA8 (Figura 5.26).

A análise do Sb-LA8 em diferentes intervalos de tempo não revelou alterações na posição da banda verificada em 205 nm e a intensidade variou apenas  $0,15 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (Figura 5.26). Em relação ao espectro de DC do modelo de complexo dissociado, também não se verificou alterações relacionadas à posição da banda, entretanto, sua intensidade foi bem menor ( $\Delta\varepsilon = -1,55 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Esses dados sugerem que, após diluição, os nanoagregados formados pelo complexo Sb-LA8 se dissociam lentamente.

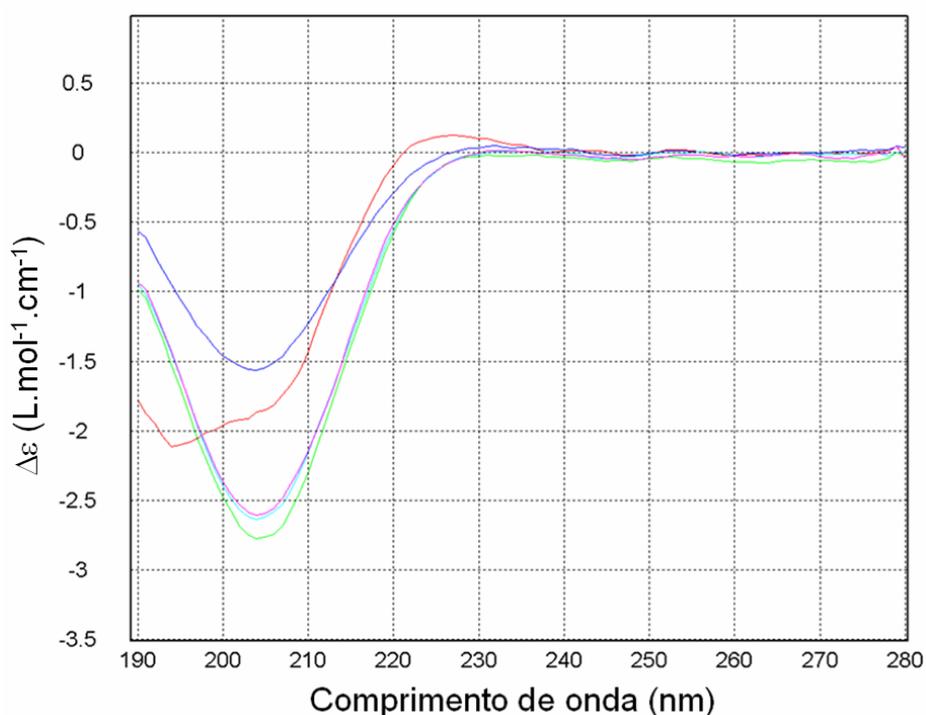


Figura 5.26: Espectros de DC (25 °C) do Sb-LA8 em diferentes intervalos de tempo (0 min= verde, 15 min= azul claro e 30 min= rosa), do modelo de complexo dissociado (azul) e do ligante LA8 (vermelho).

### 5.2.7.2- Estudo da dissociação dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 a 60 °C por DC

Para avaliar o comportamento dos nanoagregados do complexo Sb-LA8 após seu aquecimento a 60 °C, uma solução deste foi preparada na concentração 2,5 mmol/L de Sb e os espectros de DC obtidos, entre 190 e 280 nm, nos tempos: 0 min (25 °C), 15 min e 30 min, após aquecimento a 60 °C. O ligante LA8 (7,5 mmol/L) também foi avaliado na ausência de Sb.

As análises do Sb-LA8 a 25 °C e a 60 °C não revelaram mudanças na posição da banda verificada em 205 nm, porém, sua intensidade sofreu grande alteração a partir de 15 minutos de aquecimento, passando de  $-2,4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  para  $-1,5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (Figura 5.27). Após 30 minutos de aquecimento o Sb-LA8 não apresentou outras mudanças significativas em seu espectro de DC ( $\Delta\epsilon = -1,45 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Os espectros de DC do Sb-LA8 obtidos após seu aquecimento (60 °C) são muito semelhantes ao do modelo de complexo dissociado visto anteriormente. Esta evidência demonstra que os nanoagregados formados pelo complexo Sb-LA8 são instáveis após diluição e aquecimento a 60 °C, entretanto, a significativa diferença destes espectros em relação ao espectro do ligante revela que ainda existem interações entre o antimônio e o LA8 (Figura 5.27). Esses dados também sugerem que o aquecimento utilizado na rota sintética (60 °C) desfavorece a formação das nanoestruturas observadas.

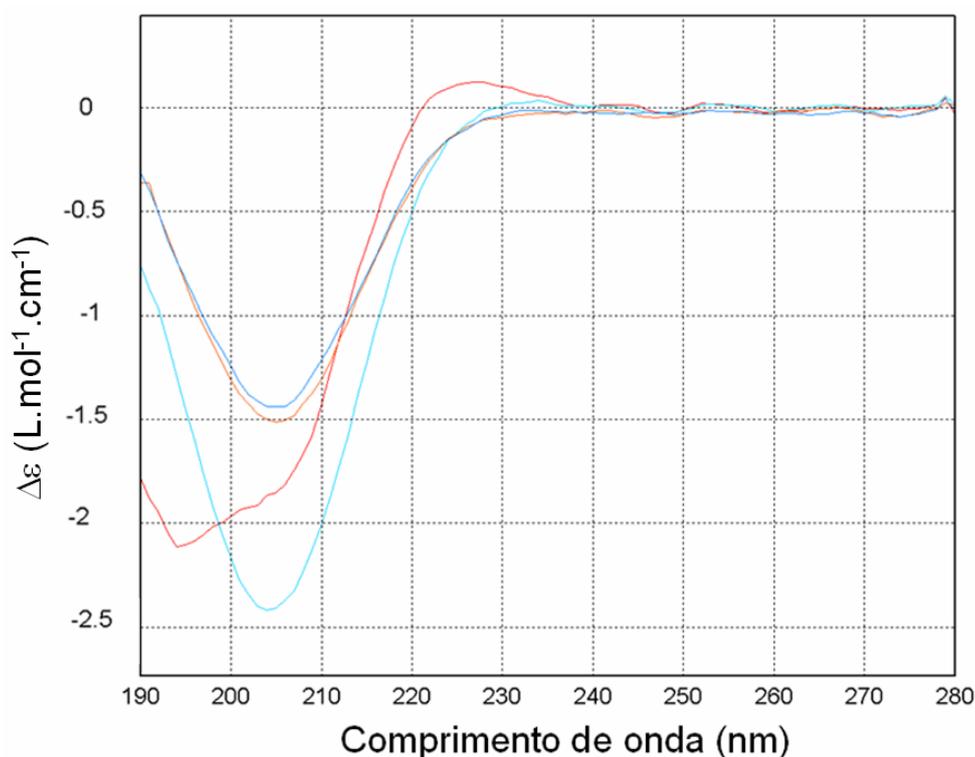


Figura 5.27: Espectros de DC do Sb-LA8 a 25 °C (0 min= azul claro) e após aquecimento a 60 °C (15 min= laranja e 30 min= azul). O ligante LA8 também foi avaliado a 25 °C (vermelho).

### 5.2.7.3- Estudo da cinética de formação do complexo Sb-LA8 e seus nanoagregados a 60 °C por DC

Para avaliar a formação do complexo Sb-LA8 e de seus nanoagregados, foi preparada uma solução concentrada a partir da mistura do  $\text{KSb(OH)}_6$  (50 mmol/L de Sb) e do LA8 (150 mmol/L) e seus espectros de DC obtidos, entre 190 e 280 nm, nos tempos: 0 min (25 °C), 30 min, 60 min e 120 min, após aquecimento a 60 °C. Antes de cada leitura a amostra era diluída 20 vezes. O ligante LA8 (7,5 mmol/L de Sb) também foi avaliado na ausência de Sb.

O espectro de DC obtido após a mistura das soluções do  $\text{KSb(OH)}_6$  e do LA8 (25 °C) é muito distinto daquele observado para o ligante LA8, porém, sua semelhança ao espectro do complexo Sb-LA8 (25 °C) indica que o antimônio já está interagindo com o ligante (Figura 5.28).

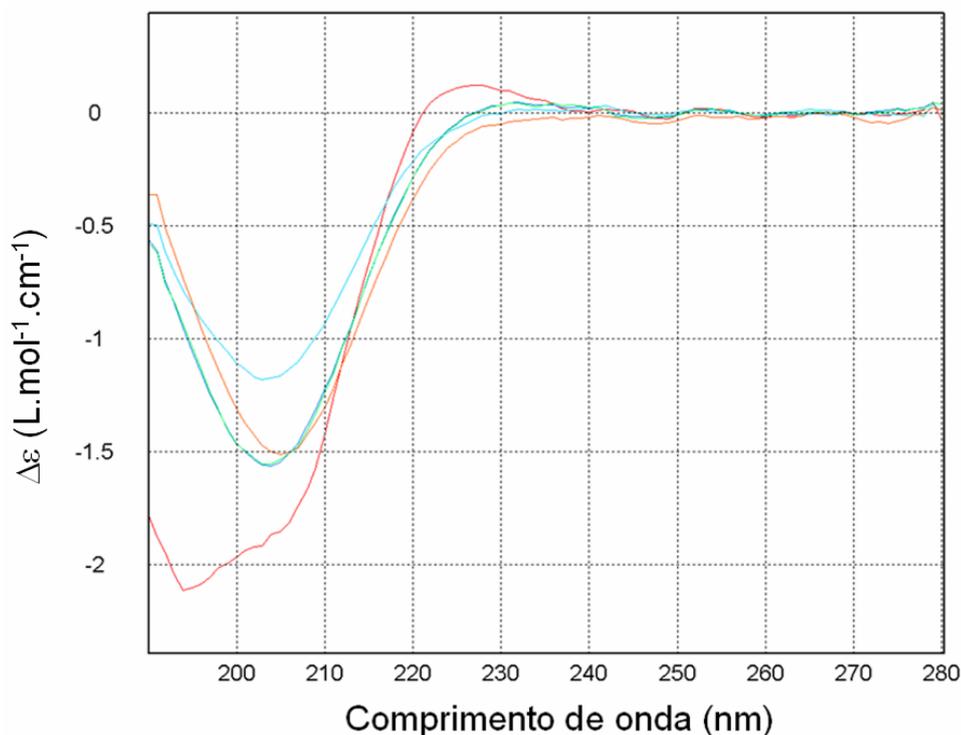


Figura 5.28: Espectros de DC da mistura do  $\text{KSb(OH)}_6$  com o LA8 a 25 °C (0 min= azul claro) e após aquecimento a 60 °C (30 min= laranja, 60 min= verde e 120 min= azul). O ligante LA8 também foi avaliado a 25 °C (vermelho).

Após o aquecimento (60 °C) desta solução por 30 minutos, não observou-se alteração significativa na posição da banda verificada em 205 nm,

porém, seu  $\Delta\varepsilon$  passou de  $-1,2 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  para  $-1,5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , e não sofreu alterações importantes após aquecimento por 60 e 120 minutos (Figura 5.28). Apesar desses resultados demonstrarem interação entre o antimônio e o ligante, os nanoagregados do complexo Sb-LA8 não foram formados, pois, a intensidade da banda verificada em 205 nm ( $\Delta\varepsilon = -1,55$ ) difere bastante daquela verificada para os nanoagregados ( $\Delta\varepsilon = -2,75 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) (Figura 5.26). Esses dados sugerem que a etapa de secagem realizada durante a síntese do Sb-LA8 é fundamental para formação dos nanoagregados. Portanto, pode-se supor que o aquecimento utilizado na rota sintética ( $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) não é capaz de formar estas nanoestruturas observadas.

### 5.2.8- Coeficiente de partição óleo/água do Sb a partir dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG)

O coeficiente de partição entre o n-octanol e a água  $[P]$  é frequentemente usado para determinar o balanço hidrofóbico/hidrofílico de fármacos. Compostos hidrofóbicos possuem alto valor de  $[P]$ , enquanto compostos hidrofílicos possuem baixo valor de  $[P]$ .

A Figura 5.29 mostra os coeficientes de partição do Sb a partir dos complexos anfífilicos de Sb(V). Estes resultados permitem concluir que o  $[P]$  aumentou com o aumento da cadeia carbônica.

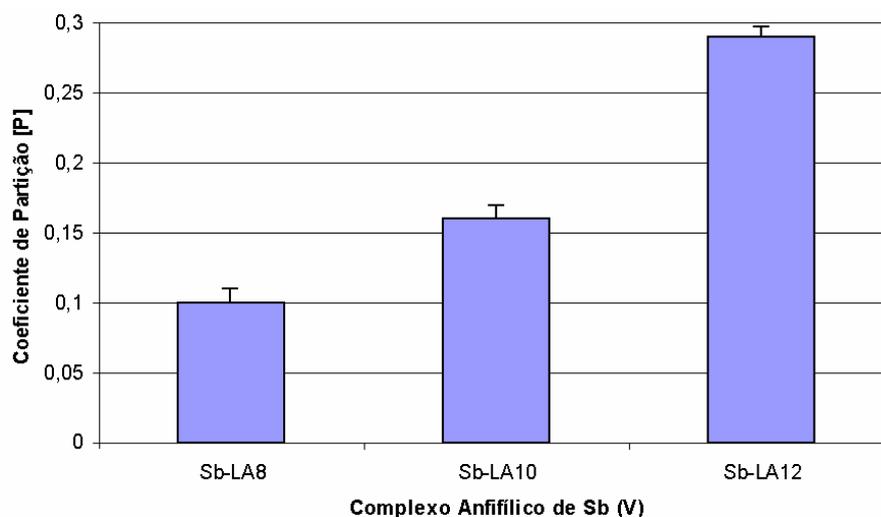


Figura 5.29: Coeficientes de partição óleo/água do Sb a partir dos complexos anfífilicos de Sb(V). Os dados representam as médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=2$ ).

Apesar de ser extremamente sensível, a metodologia utilizada no doseamento de Sb (GFAAS) não detectou a presença deste metal na fase n-octanólica dos controles hidrofílicos  $\text{KSb(OH)}_6$  e do AM, portanto, os complexos anfifílicos de Sb(V) são mais lipofílicos que estes, e devem atravessar membranas e tecidos biológicos com maior facilidade.

### **5.3- Avaliação da capacidade dos complexos de alquilmetilglucamidas com antimônio (Sb-AMG) em promover a absorção oral de Sb em camundongos Swiss**

Neste ensaio os camundongos *Swiss* (n=4) receberam por gavagem os complexos anfifílicos Sb-LA8, Sb-LA10 e Sb-LA12 na dose de 100 mg Sb/Kg. Os animais foram sacrificados nos tempos de 1 e 3 horas e o sangue coletado por punção cardíaca. Depois o soro era isolado e congelado (-20°C) para doseamento posterior do Sb. O AM foi utilizado como controle e foi administrado na mesma dose de Sb.

Como sugerido pelos coeficientes de partição óleo/água, os novos complexos anfifílicos de Sb(V) melhoraram significativamente (One way ANOVA com pos-teste de Dunnett e  $p < 0,0001$ ) a absorção de Sb por via oral. Após 1 hora da administração, estes complexos aumentaram em até nove vezes os níveis plasmáticos de Sb em relação ao AM (Figura 5.30). Entretanto, no tempo de 3 horas houve uma grande diminuição nos níveis plasmáticos de Sb e não se observou diferenças significativas (One way ANOVA com pos-teste de Dunnett e  $p < 0,0001$ ) entre os complexos anfifílicos de Sb(V) e o AM (Figura 5.31).

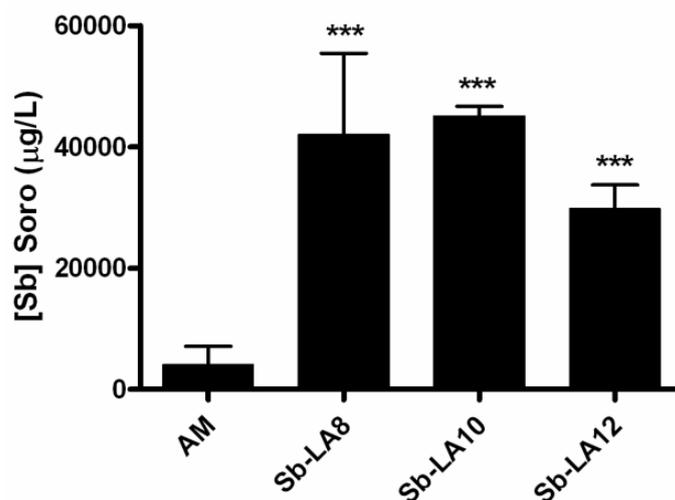


Figura 5.30: Concentração de Sb no soro de camundongos *Swiss* após 1 h da administração oral dos complexos anfifílicos de Sb(V) e do AM (100 mg Sb/Kg).

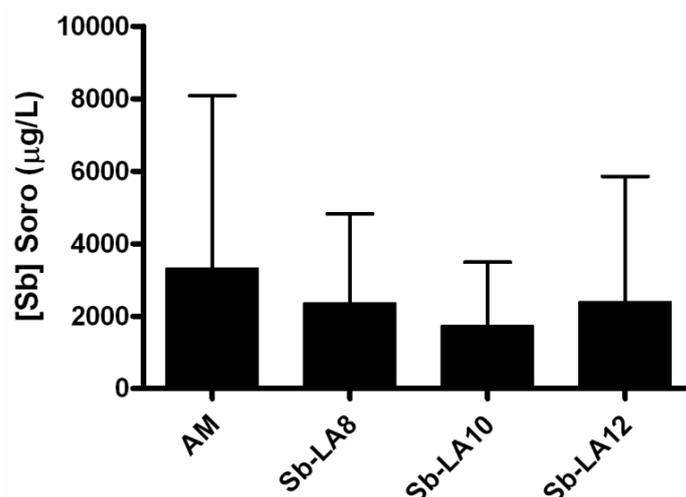


Figura 5.31: Concentração de Sb no soro de camundongos *Swiss* após 3 h da administração oral dos complexos anfifílicos de Sb(V) e do AM (100 mg Sb/Kg).

Sabe-se que o AM é removido rapidamente da circulação por filtração renal, por outro lado, espera-se que após 3 horas da administração dos novos compostos antimoniais, a rápida diminuição dos níveis plasmáticos de Sb esteja relacionada ao seu caráter anfifílico. Além de facilitar sua passagem pelo epitélio gastrointestinal, esta característica também pode promover a captura desses compostos por células especializadas e conseqüente acumulação em tecidos específicos. Novos estudos foram planejados por nosso grupo de pesquisa para elucidar esta questão.

## 5.4- Conclusões

Os antimoniais pentavalentes anfílicos foram obtidos com sucesso e apresentaram alta solubilidade em água e em solventes orgânicos, tais como, clorofórmio, metanol, etanol, n-octanol e éter.

Quando avaliados por ESI(-)-MS, esses novos antimoniais apresentaram complexos Sb(V)-ligante 1:3, 1:2 e 2:5. Entretanto, os dados fornecidos pela espectrometria de massas em conjunto com os dados de RMN e das microanálises permitiram propor que as espécies 1:3 são predominantes nos compostos obtidos.

Os ensaios preliminares realizados a partir destes novos antimoniais, visando modular a absorção de Sb por via oral em camundongos *Swiss*, apresentaram resultados muito promissores para o desenvolvimento de uma formulação para o tratamento oral das leishmanioses e foram extremamente melhores que aqueles verificados para a formulação AM: $\beta$ -CD 7:1.

Os estudos de microscopia ajudarão a compreender a química supramolecular dos nanossistemas formados pelos novos complexos anfílicos de Sb(V). A possibilidade de se planejar o diâmetro de nanopartículas é algo muito interessante e tem papel fundamental na vetorização de nanossistemas carreadores de fármacos.

A característica anfílica destes novos antimoniais também permite propor formulações para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea.

Nosso grupo está dando continuidade a esse estudo que abre várias frentes de pesquisa aplicadas ao tratamento das leishmanioses e de outras enfermidades. Esses estudos ajudarão a responder questões relativas à toxicidade e atividade dos novos antimoniais obtidos.

## CAPÍTULO 6- Referências Bibliográficas

1. ARIAS, J.R., MONTEIRO, P.S., ZICKEN, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.2(2), p.1145-1146, 1996.
2. LEISHMANIASIS. In: UNDP/WORD BANK/WHO SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH & TRAINING IN TROPICAL DISEASES (TDR). **Tropical Disease Research Programme Report, 13**; progress 1995-96. Geneva: World Health Organization, cap 8, p.100-111, 1997.
3. WIKIPÉDIA – A Enciclopédia Livre. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Leishmania\\_major\\_promastigotes.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Leishmania_major_promastigotes.jpg)>. Acesso em: 15/01/2010.
4. WIKIPÉDIA – A Enciclopédia Livre. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Phlebotomus\\_sp.\\_6274\\_lores.jpg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Phlebotomus_sp._6274_lores.jpg)>. Acesso em: 15/01/2010.
5. LEISHMANIASIS. In: UNDP/WORD BANK/WHO SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH & TRAINING IN TROPICAL DISEASES (TDR). **Tropical Disease Research Programme Report, 11**; progress 1991-92. Geneva: World Health Organization, p.77, 1993.
6. FCFRP (USP) - Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo). Disponível em: <[http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero\\_Leishmania.htm](http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Leishmania.htm)>. Acesso em: 15/01/2010.
7. AKHTAR, MASOUD. **Geographical distribution and epidemiology of visceral leishmaniasis**. Disponível em: <[www.homepages.uel.ac.uk/dp.humber/akhter/geo.htm](http://www.homepages.uel.ac.uk/dp.humber/akhter/geo.htm)>, 2002. Acesso em: 23/07/2006.
8. OMS- Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)>, 1998. Acesso em: 15/01/2010.

9. HASHIM, F. A., KHALIL, E.A., ISMAIL, A., EL HASSAM, A.M. Apparently successful treatment of two cases of post Kala-azar dermal leishmaniasis with liposomal amphotericin B. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.89(4), p.440, 1995.
10. ALVAR, J., AMELA, C., MOLINA, R. El perro como reservorio de la leishmaniosis. **Méd. Vet.**, v. 12, p. 7-8, 1995.
11. LEISHMANIASIS and Leishmania/HIV co-infection. In: **WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infection Diseases**. S.1., who, 2000. cap. 10 (WHP/CDS/CSR/ISR/2000.1). Disponível em: <[www.who.int/enc/surveill/index.html](http://www.who.int/enc/surveill/index.html)>, 2000. Acesso em: 23/08/2006.
12. MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drug for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, p. 187-198, 1985.
13. BERMAN, J. D. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16(5), p. 397-401, 2003.
14. FRÉZARD F., MARTINS P.S., BARBOSA M.C.M., PIMENTA A.M.C., FERREIRA W.A., DE MELO JE, MANGRUM JB, DEMICHELI C. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. **J. Inorg. Biochem.**, v. 102, p. 656–665, 2008.
15. HEADLEY, J. V., YONG, M. S., BROOKS, P. W., PHILLIPS, A. Fast-atom bombardment mass spectrometry of the organometallic parasiticide, meglumine antimonite. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, v.9, p.372-376, 1995.
16. ROBERTS, W. L., MCMURRAY, W.J., RAINEY, P.M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). **Antimicrob Agents Chemother.**, v.42, n.5, p.1076-1082, 1998.

17. PAPAPOPOULOU, B., ROY, G., DEY, S., ROSEN, B. P., OUELLETTE, M. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene Ltpgp A oxidation resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 269(16), p. 11980-11986, 1994.
18. GEBEL, T. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. **Chem.-Biol. Interact.**, v.107, p. 131-144, 1997.
19. BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **Rev. Infect. Dis.** v. 10(3), p. 560-586, 1998.
20. DEMICHELLI, C., FRÉZARD, F. LECOUEY, M., GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.1570, p. 192-198, 2002.
21. FRÉZARD, F., DEMICHELI, C., FERREIRA, C. S., COSTA, M. A. Glutathione Induced Conversion of Pentavalent Antimony to Trivalent Antimony in Meglumine Antimonate. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v.45(3), p. 913-916, 2001.
22. GOOWIN, 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.
23. 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 antimonate. **Trace Elem. Med.**, v.10, p. 66-70. 1993.
24. PETIT DE PENA, Y., GALLIGNANI, M. BURGUERA, M., BURGUERA, J., ANEZ, N., LUGO, A. Selective determination of antimony (V) in blood serum and urine by hydride generation and atomic absorption spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.1, p. 72-75, 1990.

25. COSTA, J. M., BARRIOS, L. A., NETO, E. M., MARSDEN, P. D. Topical pentostam in an attempt to produce more rapid healing of skin ulcers due to *leishmania braziliensis braziliensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.19(3), p.199-200, 1986.
26. BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in last 10 years. **Clin. Infec. Dis.**, v.24, p. 684-703, 1997.
27. SUNDAR, S., JHA, T. K., THAUKUR, C. P., ENGEL, J., SENDERMANN, H., FISCHER, C., JUNKE, K., BRYCESON, A., BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian Visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v.347, p. 1739, 2002.
28. WALTER, A., SUCHY, S. E., VINSON P. K. Solubility properties of the alkylmethylglucamide surfactants. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1029, p. 67-74, 1990.
29. FRÉZARD, F., SCHETTINI, D. A., ROCHA, O. G. F., DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quím. Nova**, v.28(3), p. 511-518, 2005.
30. UEKAMA K, HIRAYAMA F, IRIE T. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 36, p.125-141, 1999.
31. FERNANDES, C. M., VEIGA, F. J. P. As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica. **Rev. Cien. Farmac.**, v.20(2), p.335-351, 1999.
32. WIKIMEDIA COMMONS. Disponível em: <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:AlphaCyclodextrin\\_structure.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:AlphaCyclodextrin_structure.png)>. Acesso em: 10/01/2010.
33. DEMICHELI, C., OCHOA, R., SILVA, J. B. B., FALCÃO, C. A. B., ROSSI-BERGMANN, B., MELO, A. L., SINISTERRA, R. D., FRÉZARD, F. Oral delivery of meglumine antimonate- $\beta$ -cyclodextrin complex for treatment of

- leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48(1), p. 100-103, 2004.
34. MARTINS, P.S., Ochoa, R., PIMENTA, A.M.C., FERREIRA, L.A.M., MELO, A.L., SILVA, J.B.B., SINISTERRA, R.D., DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Mode of action of beta-cyclodextrin as an absorption enhancer of the water-soluble drug meglumine antimoniate. **Int. J. Pharm.**, v. 325, p. 39-47, 2006.
35. SCOTT, J.A., DAVIDSON, R. N., MOODY, A. H., GRANT, H. R., FELMINGHAN, D., SCOTT, G. M., OLLIARO, P., BRYCESON, A. D. Aminosidine (paramomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**, v. 86(6), p. 617-619, 1992.
36. 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.
37. RXLIST – The Internet Drug Index. Disponível em: <<http://www.rxlist.com/ambisome-drug.htm>>. Acesso em: 11/11/2009.
38. ALVING, C. R., STECK, E. A., CHAPMAN, W. L., WAITS, J. V. B., HENDRICKS, L. D., SWARTZ, G. M. J., HANSON W. L. Therapy of leishmaniasis: Superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.75, p. 2959-2963, 1978.
39. ALVING, C. R. Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria. **Parasitol. Today.**, v.2, p.101-107, 1986.
40. SCHETTINI, D. A., RIBEIRO, R. R., DEMICHELI, C., ROCHA O. G. F., MELO M. N., MICHALICK 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.]

41. SILVA, H. Complexos de platina com diaminas N-alquiladas de cadeia longa: síntese, inclusão em lipossomas, atividade citotóxica, antitumoral e estudos farmacocinéticos. Tese de doutorado em Química. Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química. 2009.
42. VACCARO, M., DEL LITTO, R., MANGIPIA, G., CARNERUP, A. M., D'ERRICO, G., RUFFO, FRANCESCO., PADUANO, L. Lipid based nanovectors containing ruthenium complexes: a potential route in cancer therapy. **Chem. Commun.**, p. 1404-1406, 2009.
43. XIA, Z., RENXI, Z., ZHENGRONG, L., WUYANG, L. Synthesis, characterization and relaxivity of amphiphilic chelates of DTPA derivatives with  $Gd^{III}$ ,  $Yb^{III}$  and  $Mn^{II}$ . **Polyhedron.**, v.16(16), p. 2755-2759, 1997.
44. RIDLEY, R. G. The need for new approaches to tropical disease: drug discovery and development for improved control strategies. In Drug against Parasitic Diseases; Failamb, A. H.; Ridley, R. G.; Vial, H. J., eds.; UNDP/World Bank/WHO **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)**: Genève, p.13-21, 2003.
45. DEMICHELI, C.; OCHOA, R.; LULA, I.S.; GOZZO, F.C.; EBERLIN, M.; FRÉZARD, F. Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimonate. **Applied Organomet. Chem.**, v. 17, p. 226-231, 2003.
46. DEMICHELI, C.; SANTOS, L.S.; FERREIRA, C.S.; BOUCHEMAL, N.; HANTZ, E.; EBERLIN, M.N.; FRÉZARD, F. Synthesis and characterization of Sb(V)-adenosine and Sb(V)-guanosine complexes in aqueous solution. **Inorganica Chim. Acta**, v. 359, p. 159-167, 2006.
47. DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Novo processo para preparação de derivados de antimônio. *Brazil Patent Pending PI 0106305-7*, 2001.

48. YAN, S.; JIN, L.; SUN, H. The Use of Metals in Medicine. Em: *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents*; Gielen, M., Tiekink, E.R.T. Eds.; John Wiley & Sons: New York, vol. 10, p. 441-461, 2005.
49. BERMAN, J. D., GROGL, M. Leishmania mexicana: chemistry and biochemistry of sodium stibogluconate (Pentostam). **Exp Parasitol.**, v. 67 p. 96-103, 1988.
50. CROFT, S. L., SUNDAR, S., FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clin. Microb. Rev.**, v. 19 p. 111-126, 2006.
51. SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed. LTC, Rio de Janeiro, 490 p, 2007.
52. DEMICHELI, C., FIGUEIREDO, T. L., CARVALHO, S., SINISTERRA, R. D., LOPES, J. C. D., FRÉZARD, F. Physico-chemical characterization of meglumine antoniato. **BioMetals**, v. 12, p. 63-66, 1999.
53. DZAMITIKA, S. A., FALCÃO, C. A., OLIVEIRA, F. B., MARBEUF, C., GARNIER-SUILLEROT, A., DEMICHELI, C., ROSSI-BERGMANN, B., FRÉZARD, F. Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance. **Chem. Biol. Int.**, v. 160 p. 217-224, 2006.
54. FERREIRA, C, S., PIMENTA, AMC., DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Characterization of reactions of antimoniate and meglumine antimoniate with a guanine ribonucleoside at different pH. **Biomaterials.**, v. 19, p. 573–581, 2006.
55. CHULAY, J. D., L. FLECKENSTEIN, AND D. H. SMITH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 69-72, 1988.

56. VALLADARES, J. E., ALBEROLA, J., ESTEBAN, M., ARBOIX, M. Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. **Vet. Rec.**, v. 138, p. 181-183, 1996.
57. SUNDAR, S., SINHA, P. R., AGRAWAL, N. K., SRIVASTAVA, R., RAINEY, P. M., BERMAN, J. D., MURRAY, H. W., SINGH, V. P. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, v. 59, p. 139-143, 1998.
58. MIEKELEY, N.; MORTARI, S. R.; SCHUBACH, A. O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 372, p. 495-502, 2002.
59. SZEJTLI J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 1743-1754, 1998.
60. UEKAMA, K., HIRAYAMA, F., IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 2045–2076, 1998.
61. FRÉZARD, F., DEMICHELI, C., RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules.**, v. 14, p. 2317-2336, 2009.
62. FRÉZARD, F., MARTINS, P. S., BAHIA, A. P. C. O., LE MOYEC, L., MELO, A. L., PIMENTA, A. M. C., SALERNO, M., SILVA, J. B. B., DEMICHELI C. Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/ $\beta$ -cyclodextrin nanoassemblies. **Int. J. Pharm.**, v. 347, p. 102-108, 2008.
63. JIANG, H., SUN, H., ZHANG, S., HUA, R., XU, Y., JIN, S., GONG H., LI, L. RMN Investigations of inclusion complexes between *b*-Cyclodextrin and naphthalene/anthraquinone derivatives. **J. Incl. Phenom. Macro.**, v. 58, p. 133-138, 2007.

64. GIL, V. M. S., GERALDES, C. F. G. C. Ressonância Magnética Nuclear - Fundamentos, Métodos e Aplicações. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Coimbra, p. 501-508, 1987.
65. AGNES, G. R., HORLICK, G. Electrospray mass spectrometry as a technique for elemental analysis: preliminary results. **Appl. Spectrosc.**, v. 46, p. 401, 1992.