



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**BIODISTRIBUIÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA EM
ANIMAIS SADIOS E INFECTADOS COM
LEISHIMANIA (L.) CHAGASI**

SAMANTA ETEL TREIGEL BORBOREMA

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Profa. Dra. Nanci do Nascimento

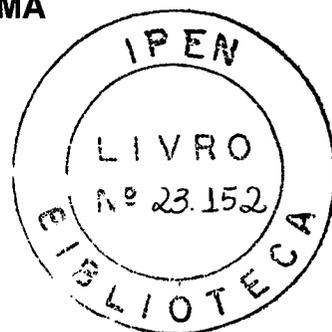
São Paulo
2005

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares *ipen*

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**BIODISTRIBUIÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA EM ANIMAIS SADIOS
E INFECTADOS COM *LEISHMANIA (L.) CHAGASI***

SAMANTA ETEL TREIGER BORBOREMA



Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:

Dra. Nanci do Nascimento

São Paulo

2005

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares *ipen*

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**BIODISTRIBUIÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA EM ANIMAIS SADIOS
E INFECTADOS COM *LEISHMANIA (L.) CHAGASI***

SAMANTA ETEL TREIGER BORBOREMA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:

Dra. Nanci do Nascimento

São Paulo

2005

AGRADECIMENTOS

A Dra. Nanci do Nascimento, minha orientadora, pela confiança em todos os momentos de meu trabalho, pela sua orientação constante e flexível, pela sua amizade e apoio.

Ao Prof^o. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr (IMTSP), meu “co-orientador”, pela paciência, confiança e incentivo em todos os momentos de minha formação científica.

Ao Dr. João Alberto Osso Jr (IPEN), que me acolheu gentilmente em seu laboratório, pela colaboração e ensinamentos durante todo o trabalho.

A Dra. Emiko Muramoto (IPEN), pelo auxílio e pelas proveitosas discussões durante o trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia (IMTSP), Andrés, Ana Paula, Cláudia, Dona Francisca, Felipe, Franco, Leandro, Luciana, Luciano, Maria, Miriam, Perez, Rose, Silvia, Solange, Vinícius, pela amizade e apoio durante todos os anos.

Ao amigo André G. Tempone (Adolfo Lutz) pelas discussões científicas e amizade.

Aos amigos do Biotério (IPEN), em especial à Neide pela ajuda e colaboração durante toda a realização dos experimentos.

As amigas do Centro de Radiofarmácia (IPEN), Bárbara, Carla, Giovana, Vanessa, pela amizade e apoio durante o trabalho.

Ao CNPq e ao LIM-49 (IMTSP), pelo apoio financeiro durante todo o período de meu trabalho, provendo todos os recursos necessários para a realização deste trabalho.

Meu eterno agradecimento aos meus pais, José Luis e Márcia, que sem medir esforços em suas vidas, me transmitiram todo o carinho, amor incondicional, sustento, incentivo, apoio e equilíbrio para o meu crescimento. Sem vocês o meu trabalho não seria realizável...

As minhas irmãs, Beatriz e Brana, pelas idéias, incentivo, carinho e dedicação durante toda a minha vida.

Ao meu namorado, Ademar, pela paciência, carinho e atenção durante a elaboração deste trabalho.

A todos aqueles que me apoiaram neste projeto e que porventura não tenha lembrado no momento.

BIODISTRIBUIÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA EM ANIMAIS SADIOS E INFECTADOS COM *LEISHMANIA (L.) CHAGASI*

Samanta Etel Treiger Borborema

RESUMO

Antimoniais pentavalentes, como antimoníato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®), são considerados o principal tratamento para leishmanioses, um complexo de doenças infecciosas zoonóticas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Apesar do seu uso por mais de 60 anos, existem importantes lacunas no conhecimento da ação, toxicidade e farmacocinética. A determinação de antimônio em sistemas biológicos é complexa e de baixa sensibilidade. Estudos utilizando radiotraçadores representam um papel fundamental no desenvolvimento farmacológico. Assim, objetivou-se a obtenção de radiotraçador, pela irradiação do antimonial em reator nuclear, com propriedades físicas e biológicas suficientes para determinação da sua biodistribuição. O antimoníato de meglumina (Glucantime®, Aventis, SP, Brasil) foi irradiado no Reator Nuclear IEA-R1 (IPEN-CNEN-SP), produzindo dois radioisótopos, ^{122}Sb e ^{124}Sb , com alta pureza radionuclídica e boa atividade específica. Esse composto apresentou-se equivalente ao fármaco nativo tanto no tratamento *in vitro* como no *in vivo*. O estudo de biodistribuição, em camundongos sadios e infectados, mostrou que o fígado é o órgão de maior captação e a eliminação é preferencialmente pela via hepática, por excreção biliar, com pequena e rápida eliminação renal. Já o antimônio pentavalente livre apresentou eliminação bastante rápida predominantemente pela via renal, com grande participação da via biliar. A curva de decaimento sérico é biexponencial, com dois compartimentos, referente a um compartimento central de distribuição e outro de equilíbrio e eliminação da droga. O uso de radiotraçadores por irradiação com nêutrons poderia ser uma ferramenta interessante para elucidar questões da farmacologia dos antimoniais.

MEGLUMINE ANTIMONIATE BIODISTRIBUTION IN HEALTHY AND *L. (L.) CHAGASI* INFECTED BALB/C MICE

Samanta Etel Treiger Borborema

ABSTRACT

Pentavalent antimony, as meglumine antimoniate (Glucantime®) or sodium stibogluconate (Pentostam®), is the main treatment for leishmaniasis, a complex of diseases caused by protozoan parasite *Leishmania*, an endemic and neglected threat in Brazil. Despite over half a century of clinical use of these antileishmanial agents, their mechanism of action, toxicity and pharmacokinetics data remain mostly unknown. The analytical methods for determination of the amount of antimony in biological systems remain complex and with low sensitivity. Radiotracer studies performed on animals have the potential to play a major role in pharmaceutical development. The aim of this study was to obtain a radiotracer, by neutron irradiation of antimony, with suitable physics and biological properties, allowing easy determination of its biodistribution. Meglumine antimoniate (Glucantime®, Aventis, S. Paulo, Brazil) was neutron irradiated inside the IEA-R1 nuclear reactor, producing two radioisotopes ^{122}Sb and ^{124}Sb , with high radionuclidic purity and good specific activity. This compound presented the same antileishmanial activity as the native compound; either *in vitro* and in *in vivo* treatment. In its biodistribution studies, it was found higher uptake in the liver of healthy or infected mice and elimination is mostly by biliary excretion with a small and fast proportion of the drug excreted by kidney. Free pentavalent antimony showed fast elimination predominant by kidney and great proportion of the drug is excreted by biliary route. The serum kinetic curve is bi-exponential, showing two compartments, a distribution in the central compartment and other associated to drug equilibrium and excretion. The use of the radiotracers, easily created by neutron irradiation, could be an interesting tool to solve important questions in antimonials pharmacology.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	15
2. ESTADO DA ARTE	18
2.1. Leishmanioses	18
2.1.1. Aspectos clínicos	18
2.1.2. Epidemiologia	19
2.1.3. Ciclo do parasito	21
2.1.4. Classificação	22
2.1.5. Diagnóstico	22
2.1.6. Controle	23
2.1.7. Tratamento	23
2.2. Estudos farmacológicos com auxílio de um traçador radioativo	30
2.2.1. Farmacocinética e Análise Compartmental	31
2.3. Radioisótopos de antimônio	33
3. OBJETIVOS	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Drogas	38
4.2. Animais de Laboratório	38
4.3. Células	39
4.4. Infecção pelo parasita	39
4.5. Produção do radiotraçador	39
4.6. Avaliação da pureza radionuclídica e determinação da atividade	40
4.7. Avaliação química do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons	40
4.7.1. Espectroscopia ultravioleta-visível	41
4.7.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	41
4.8. Avaliação da atividade biológica <i>in vitro</i> do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons	42
4.8.1. Determinação da Concentração Efetiva 50 % em formas	42

promastigotas	
4.8.2. Determinação da citotoxicidade em células RAW 264.7	43
4.8.3. Determinação da Concentração Efetiva 50 % em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. (L.) chagasi</i>	43
4.9. Avaliação <i>in vivo</i> do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons	44
4.10. Estudos de imagem	45
4.11. Estudos biológicos em camundongos	45
4.11.1. Estudos de biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons	46
4.11.2. Estudos de biodistribuição do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado por nêutrons	46
4.12. Análise estatística	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
5.1. Produção e análise do radiotraçador	48
5.2. Avaliação química do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons	49
5.2.1. Espectroscopia ultravioleta-visível	49
5.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	54
5.3. Avaliação da atividade biológica <i>in vitro</i> do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons	64
5.3.1. Determinação da Concentração Efetiva 50 % em formas promastigotas	64
5.3.2. Determinação da citotoxicidade em células RAW 264.7	66
5.3.3. Determinação da Concentração Efetiva 50 % em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. (L.) chagasi</i>	68
5.4. Avaliação <i>in vivo</i> do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons	71
5.5. Estudos de imagem	72
5.6. Estudos de biodistribuição	73
5.6.1. Estudos de biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons	74
5.6.2. Estudos de biodistribuição do hexahidroxiantimoniato de potássio	91

irradiado por nêutrons

6. CONCLUSÕES	103
APÊNDICES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

LISTA DE TABELAS

	Página
01. Estrutura química dos antimoniais trivalentes empregados na terapêutica da Leishmaniose	25
02. Estrutura química dos antimoniais pentavalentes empregados na terapêutica da Leishmaniose	26
03. Outros fármacos empregados na terapêutica da Leishmaniose	29
04. Energias gama dos radioisótopos ^{122}Sb e ^{124}Sb	34
05. Características dos isótopos	35
06. Parâmetros experimentais otimizados para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	41
07. Espectros de raios gama do ^{122}Sb e ^{124}Sb , determinados por meio de espectrometria- γ , utilizando um detector de Ge hiper puro	49
08. Cromatograma de CLAE do antimoniato de meglumina monitorado em 250 nm	59
09. Cromatograma de CLAE do antimoniato de meglumina monitorado em 330 nm	59
10. Contagem da amostra de antimônio trivalente irradiado durante 07 minutos ($81 \mu\text{g Sb}^{3+}$), após CLAE	61
11. Contagem da amostra de antimônio pentavalente irradiado durante 07 minutos ($3,24 \mu\text{g Sb}^{5+}$), após CLAE	62
12. Avaliação da atividade dos compostos em formas promastigotas de <i>L.(L.) chagasi</i>	65
13. Citotoxicidade dos compostos em células RAW 264.7	67
14. Efetividade do antimoniato de meglumina em promastigotas de <i>L.(L.) chagasi</i> , em macrófagos infectados com amastigotas de <i>L.(L.) chagasi</i> e em células de mamíferos	70
15. Efetividade do antimoniato de meglumina em camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.) chagasi</i> , tratados após 07 dias de infecção, 50 mg	72

Sb⁵⁺/Kg, 4 dias

16. Porcentagem da dose administrada no sangue total de camundongo BALB/c fêmea sadia e infectada com *L.(L.) chagasi*, de injeção intraperitoneal do antimoniato de meglumina irradiado, (média±desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05) 90
17. Porcentagem da dose administrada no sangue de camundongo BALB/c sadio, de injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado, (média±desvio-padrão, n=5) 100

LISTA DE FIGURAS

	Página
01. Mapa mundial da distribuição geográfica da Leishmaniose	20
02. Representação dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil, no período de 1980-99	21
03. Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> spp. em seus hospedeiros	22
04. Esquema simplificado de decaimento ^{122}Sb	36
05. Esquema simplificado de decaimento ^{124}Sb	36
06. Espectro UV-visível do AMN (162 μg Sb/mL), (referência: água bidestilada)	50
07. Espectro UV-visível do AMI durante 15 minutos (162 μg Sb/mL), (referência: água bidestilada)	51
08. Espectro UV-visível do AMI durante 15 minutos (162 μg Sb/mL), (referência: AMN)	51
09. Espectro UV-visível do AMN (40,5 μg Sb/mL), (referência: água bidestilada)	52
10. Espectro UV-visível do AMI irradiado durante 07 minutos (162 μg Sb/mL), (referência: água bidestilada)	53
11. Espectro UV-visível do AMI irradiado durante 07 minutos (162 μg Sb/mL), (referência: AMN)	53
12. Cromatograma de CLAE do AMN (1,62 μg Sb), monitorado em 250 nm durante 10 minutos.	55
13. Cromatograma de CLAE do AMI irradiado durante 07 minutos (1,62 μg Sb), monitorado em 250 nm durante 10 minutos.	56
14. Cromatograma de CLAE do AMI irradiado durante 15 minutos (1,62 μg Sb), monitorado em 250 nm durante 10 minutos.	56
15. Cromatograma de CLAE do AMN (1,62 μg Sb), monitorado em 330 nm durante 20 minutos	57
16. Cromatograma de CLAE do AMI irradiado durante 07 minutos (1,62	57

µg Sb), monitorado em 330 nm durante 20 minutos.	
17. Cromatograma de CLAE do AMI irradiado durante 15 minutos (1,62 µg Sb), monitorado em 330 nm durante 20 minutos.	58
18. Contagem da amostra de antimônio trivalente irradiado durante 07 minutos (81 µg Sb ³⁺), após CLAE.	61
19. Contagem da amostra de antimônio pentavalente irradiado durante 07 minutos (3,24 µg Sb ⁵⁺), após CLAE.	62
20. Determinação da CE ₅₀ em promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i>	65
21. Determinação da CE ₅₀ em células macrofágicas murinas (RAW 264.7)	67
22. Determinação da CE ₅₀ em macrófagos peritoneais infectados com <i>L.(L.) chagasi</i> e tratados por um período de 96 horas	68
23. Imagem dinâmica em uma gama câmara, de um hamster sadio, após 2 horas da administração via intramuscular do antimoníato de meglumina irradiado	73
24. Biodistribuição do antimoníato de meglumina irradiado em BALB/c fêmea sadio, % da dose administrada/órgão total (desvio-padrão, n=6).	75
25. Biodistribuição do antimoníato de meglumina irradiado em BALB/c fêmea infectada com <i>L. (L.) chagasi</i> , % da dose administrada/órgão total (desvio-padrão, n=6)	75
26. Biodistribuição do antimoníato de meglumina irradiado em BALB/c fêmea sadia (linha azul) e infectada com <i>L. (L.) chagasi</i> (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05)	76
27. Biodistribuição do antimoníato de meglumina irradiado em BALB/c fêmea sadia (linha azul) e infectada com <i>L. (L.) chagasi</i> (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05)	77
28. Biodistribuição do antimoníato de meglumina irradiado na musculatura esquelética total de camundongo BALB/c fêmea sadia (linha azul) e infectada com <i>L. (L.) chagasi</i> (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05).	78

29. Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado no fígado de camundongo BALB/c fêmea sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05) 79
30. Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado no baço de camundongo BALB/c fêmea sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05). 80
31. Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em BALB/c fêmea sadia, % dose administrada/órgão total, (desvio-padrão, n=6). 82
32. Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em BALB/c fêmea infectada com *L. (L.) chagasi*, % dose administrada/órgão total, (desvio-padrão, n=6). 82
33. Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado nos rins de camundongo BALB/c fêmea sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05). 84
34. Órgãos onde existem as maiores diferenças na porcentagem de dose na biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado camundongo BALB/c fêmea sadia (barra preta) e infectada com *L. (L.) chagasi* (barra vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05). 85
35. Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em camundongo BALB/c fêmea sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05). 87
36. Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em camundongo BALB/c fêmea sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.)* 88

chagasi (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05).

37. Decaimento sérico total da dose administrada do antimoniato de meglumina irradiado em camundongo BALB/c fêmea sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05). 89
38. Porcentagem da dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio em camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5). 92
39. Porcentagem da dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio, no cérebro e coração de camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5). 92
40. Porcentagem da dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio, no pulmão e útero e ovário de camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5). 93
41. Porcentagem da dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio, na musculatura esquelética de camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5). 94
42. Porcentagem da dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio, no baço de camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5). 94
43. Porcentagem da dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio em camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5). 96
44. Porcentagem da dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio, nos rins de camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5). 97
45. Porcentagem da dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio, na urina e fezes de camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5). 98
46. Clareamento sanguíneo da dose administrada após injeção 99

intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio em camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5).

47. Clareamento sanguíneo da dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio em de camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5).

101

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas zoonóticas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por flebotomíneos. A leishmaniose humana é distribuída por todo o mundo, mas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, com incidência de 12 milhões de casos ao ano, ocasionando um espectro de doenças que provocam desde lesão cutânea única e simples com cura espontânea até formas viscerais fatais (Croft & Coombs, 2003). A maior incidência de leishmaniose visceral no mundo e a co-infecção com HIV a tornaram uma prioridade da Organização Mundial de Saúde (Guerin *et al.*, 2002).

Os principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®), considerados como primeira escolha (Murray, 2001). As alternativas existentes como a anfotericina B e a pentamidina, apresentam alta toxicidade e necessidade de monitoramento em hospital, o que gera um elevado custo, inviabilizando seu uso em países subdesenvolvidos, onde há alta incidência de leishmaniose e precária infraestrutura médica (Singh & Sivakumar, 2004).

Cabe ressaltar que existem poucos fármacos novos no mercado mundial e, tratando-se de doenças tropicais sabe-se que das 1393 substâncias químicas terapêuticas introduzidas e comercializadas no mundo inteiro entre 1975 e 1999, 31 % são realmente inovações terapêuticas e menos de 1 % destas inovações foram destinadas às doenças tropicais que incluem dentre outras doenças a própria leishmaniose (Trouiller *et al.*, 2002).

O melhor tratamento recomendado para todos os casos de leishmaniose é baseado na administração sistêmica de antimoniais pentavalentes (Helpburn, 2003; Al Jasser *et al.*, 1995). Porém, apesar de seu uso por mais de 60 anos, existem importantes lacunas no conhecimento de sua ação, toxicidade e farmacocinética (Roberts *et al.*, 1998). São poucos os trabalhos apresentando estudos farmacocinéticos e de biodistribuição do antimoniato de meglumina em

leishmaniose visceral (Valladares *et al.*, 2001; Chulay *et al.*, 1988; Lugo de Yuarbuh *et al.*, 1994). Desta forma, um melhor conhecimento da sua farmacologia propiciaria a atualização da terapia, determinando a menor dose antileishmania, reduzindo casos de resistência, relapsos e efeitos colaterais.

Em uma revisão de farmacocinética de drogas antiprotozoárias, confirmou-se que a compreensão dos dados farmacocinéticos pode permitir modificações no regime de terapia em pacientes que apresentem deficiências renais e cardíacas. Entretanto, a falta de histórico na terapia antiparasitária dificulta justificar alguns de seus detalhes e também impede a otimização da terapia, baseando-se na farmacocinética (Berman & Fleckenstein, 1991).

Os dados descritos na literatura apresentam-se conflitantes e, considerando-se as falhas apresentadas nos tratamentos disponíveis para a leishmaniose, a busca de novas terapias que sejam mais eficazes no combate à doença é de grande importância. Porém, não há somente a necessidade urgente de se encontrar novas drogas, o mais importante é melhorar a cinética e a especificidade dos fármacos já utilizados, e assim reduzir os efeitos colaterais mais sérios das drogas que estão em uso. Assim, o estudo mais aprimorado dos dados de biodistribuição e do modo de ação de drogas que têm sido utilizadas no tratamento da leishmaniose contribuiria sobremaneira para esta busca, pelo que se acredita que o melhoramento do uso dos antimoniais possa ser uma solução altamente viável.

Para a determinação da biodistribuição do antimoniato de meglumina em um sistema *in vivo*, é necessária a utilização de métodos de determinação de antimônio em sistemas biológicos. A metodologia analítica descrita na literatura para a determinação de antimônio baseia-se, principalmente, nas técnicas hifenadas e em métodos volumétricos e/ou potenciométricos. As técnicas hifenadas permitem simultaneamente separar e quantificar as espécies de Sb^{5+} , Sb^{3+} e organoantimoniais, diminuindo assim a introdução de erros provenientes da determinação indireta. Entre as técnicas hifenadas se destacam a eletroforese capilar com espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (CE-ICP-MS), cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HPLC-HG-AFS) e a cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de absorção atômica e geração de hidretos (HPLC-HG-AAS). Embora esses métodos sejam

promissores, eles são inviáveis para o estudo de um grande número de amostras, são demorados e de elevado custo (Rath *et al.* 2003). Além disso, os métodos analíticos utilizados para determinação da concentração de antimônio em sistema biológicos são complexos e de baixa sensibilidade (Rath *et al.*, 2003). Estes métodos também apresentam desvantagens, visto a necessidade da preparação das amostras, realizando o tratamento com diversos reagentes ácidos ou processos de digestão, já que primeiramente tem que se digerir todo o material biológico, para posterior determinação de antimônio, tornando o método bastante dispendioso.

Existem vários registros na literatura da determinação de antimônio em diferentes matrizes como urina, sangue e tecidos biológicos de animais e indivíduos tratados com antimoniato de meglumina, onde estas amostras foram tratadas através dos procedimentos analíticos (Petit de Peña *et al.*, 2001), entretanto, não há descrição na literatura relacionadas com a utilização de radiotraçadores de antimônio para o estudo de biodistribuição do antimoniato de meglumina. A utilização de radiotraçadores, em estudos realizados em animais, tem mostrado um papel potencial no desenvolvimento farmacológico, auxiliando na pesquisa e na determinação da farmacocinética de muitas drogas (Meikle *et al.*, 2001). Esta metodologia apresenta diversas vantagens representadas principalmente por ser de fácil realização, rápida e tem um custo reduzido. Além de permitir a determinação da biodistribuição e das taxas de metabolismo do radiotraçador nos tecidos e órgãos do interesse, permite a determinação de locais de ação e da eficiência de terapias, bem como o estudo dos processos bioquímicos de doenças em vários modelos animais e também possibilita o desenvolvimento de metodologias para verificar os efeitos da progressão e do tratamento da doença (Meikle *et al.*, 2001). Desta forma, a construção de isótopos radioativos de antimônio, pela irradiação com nêutrons do antimonial, em reator nuclear produzindo traçadores com propriedades biológicas para determinação de sua biodistribuição parece ser uma ferramenta ideal para a realização deste estudo.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, da ordem *Kinetoplastida* e da família *Trypanosomatidae* (Balaña-Fouce *et al.*, 1998), parasitas humanos heteroxênicos transmitidos por insetos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Jones *et al.*, 1998).

2.1.1. Aspectos Clínicos

As diferentes manifestações clínicas da doença dependem de um complexo de interações entre a capacidade de invasão do parasito, o tropismo e a patogenicidade relacionada à imunogenicidade do hospedeiro (Garnhan, 1987). Outros fatores, como a distribuição geográfica, também estão relacionados aos aspectos clínicos da leishmaniose (Magill, 2000).

De modo geral, a doença pode apresentar diferentes manifestações clínicas que estão relacionadas com a espécie de *Leishmania* envolvida durante o processo de infecção: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea.

Leishmaniose visceral: é o mais grave de todos os tipos de leishmaniose sendo frequentemente fatal quando não é tratada; atualmente está diretamente associada com doenças imunossupressoras, como a AIDS, aparecendo assim como uma doença oportunista. É caracterizada clinicamente por: febre, fraqueza, pancitopenia, hepatoesplenomegalia e hipergamaglobulinemia (Berman, 1997).

Leishmaniose cutânea: resulta da multiplicação da *Leishmania* em fagócitos da pele, é a forma mais comum da doença, as lesões de pele podem caracterizar a forma localizada (única ou múltipla), a forma disseminada (lesões muito numerosas em várias áreas do corpo) e a forma difusa. Na maioria das vezes a doença apresenta-se como uma lesão ulcerada única (Herwaldt, 1999). Em geral, as úlceras são indolores. As formas localizada e disseminada

costumam responder bem à terapêutica tradicional. Na forma difusa, rara, as lesões são papulosas ou nodulares, deformantes e muito graves, distribuindo-se amplamente na superfície corporal. Evolui mal por não responder adequadamente à terapêutica (Helpburn, 2003).

Leishmaniose mucocutânea: a apresentação mucosa da LTA é na maioria das vezes secundária às lesões cutâneas, surgindo geralmente meses ou anos após a resolução das lesões de pele. São mais freqüentemente acometidas as cavidades nasais, seguidas da faringe, laringe e cavidade oral. Portanto, as queixas mais comuns no acometimento nasal são obstruções, epistaxes, rinorréia e crostas; da faringe, odinofagia; da laringe, rouquidão e tosse; da cavidade oral, ferida na boca. As lesões podem ser discretas com poucos sintomas, daí a necessidade de sempre se buscar a identificação de doença em mucosas. Poderá ocorrer destruição parcial ou total da pirâmide nasal e outras estruturas acometidas na boca (Balaña-Fouce *et al.*, 1998)

2.1.2. Epidemiologia

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (2002) a prevalência da doença é de 12 milhões de pessoas afetadas pelas várias formas de leishmaniose no mundo, apresentando mais de 2 milhões de casos novos por ano, sendo que 1,5 milhões dos casos são de leishmaniose cutânea e 500 mil, de leishmaniose visceral. Acredita-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas à infecção por esta doença (WHO, 2003) que ocorre em cerca de 88 países, sendo 16 países desenvolvidos e 72, em desenvolvimento (Desjeux, 1996). Devido a esses fatores, a Organização Mundial de Saúde resolveu incluir a leishmaniose dentre as seis endemias de maior importância de seu programa de pesquisa (Guerin *et al.*, 2002).

A leishmaniose está distribuída por todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. A doença é endêmica por toda África, Índia, Oriente Médio, sul da Europa e América Central e do Sul. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 90 % de todos os casos de leishmaniose visceral ocorrem em países como o Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão; 90 % de todos os casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem no Brasil, na Bolívia e no Peru e 90 % de todos os casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Brasil, Afeganistão, Algéria, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (FIG. 01).

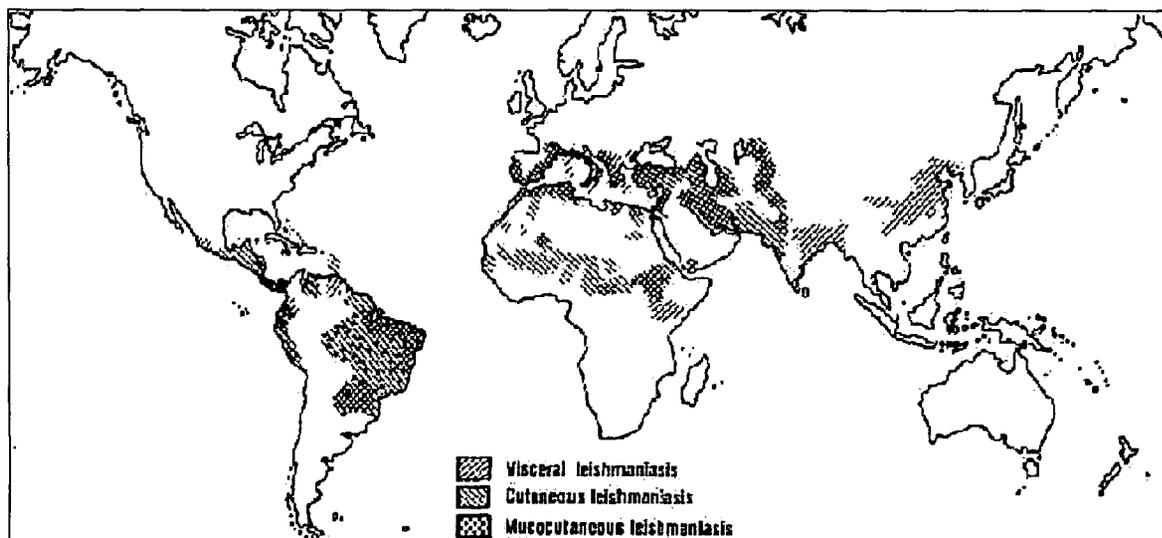


FIGURA 01 - Mapa mundial da distribuição geográfica da Leishmaniose (WHO, 2003).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) geralmente afeta as pessoas que moram ou trabalham em áreas rurais na América Latina; geralmente homens adultos são os mais comumente infectados em consequência das próprias atividades que realizam. Nos últimos 20 anos, tem aumentado a incidência da LTA em praticamente todos os Estados Brasileiros e mudanças na epidemiologia têm surgido na região nordeste do Brasil, onde a doença está ocorrendo na interface da área rural e periurbana, entre pessoas de todas as idades e ambos os sexos (Oliveira *et al.*, 2004). Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos de LTA no país (FIG. 02), caracterizando esta doença como um problema de saúde pública (Contijo & Carvalho, 2003).

No Brasil, a leishmaniose visceral americana (LVA) encontra-se disseminada em 17 estados das regiões Nordeste, Centro-oeste e Sudeste. A ampliação da área de distribuição geográfica da AIDS e sua extensão para camadas mais pobres da população e, por outro lado, a crescente urbanização da LVA faz supor que a prevalência de casos de co-infecção LVA/HIV venha a aumentar nos próximos anos. No Brasil está descrita a maioria dos casos de co-infecção de LVA/HIV, onde a incidência de AIDS tem aumentado de 0,8 casos para cada 100.000 habitantes em 1986, para 10,5 casos para cada 100.000 habitantes em 1997 (Paredes *et al.*, 2003). De acordo com os dados do Centro de Vigilância Epidemiológica, no Estado de São Paulo, do ano 2000 até 13 de maio

de 2005, foram registrados 526 casos de LVA, resultando em 63 óbitos (CVE, 2005).

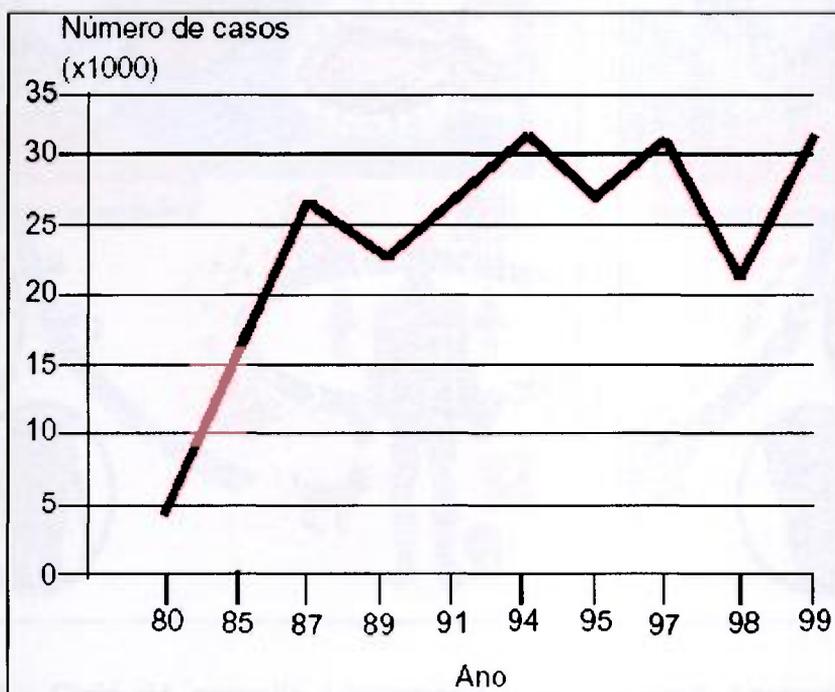


FIGURA 02 – Representação dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil, no período de 1980-99 (Contijo & Carvalho, 2003).

2.1.3. Ciclo do parasito

O parasito apresenta um ciclo dimórfico (FIG. 03), estando presente em dois tipos de hospedeiro: nas fêmeas dos insetos vetores flebotomíneos, vivendo no sistema digestório, sob a forma flagelada ou promastigota (extracelular), e nos mamíferos, vivendo juntamente com o fagolisossomo de macrófagos, sob a forma amastigota (intracelular). A transmissão da doença para o mamífero ocorre pela inoculação, feita pelo inseto, durante o repasto sanguíneo, de uma forma infectante do parasito denominada promastigota metacíclica. No mamífero, esta forma é fagocitada por macrófagos e subseqüentemente se transforma na forma amastigota, que se multiplica no interior do fagolisossomo e, quando liberadas, infectam outra célula hospedeira. A infecção do flebotomíneo ocorre quando macrófagos infectados são ingeridos pela fêmea e as formas amastigotas são imediatamente liberadas e transformadas na forma promastigota, que são morfológica e bioquimicamente distintas da forma amastigota (Jones *et al.*, 1998).

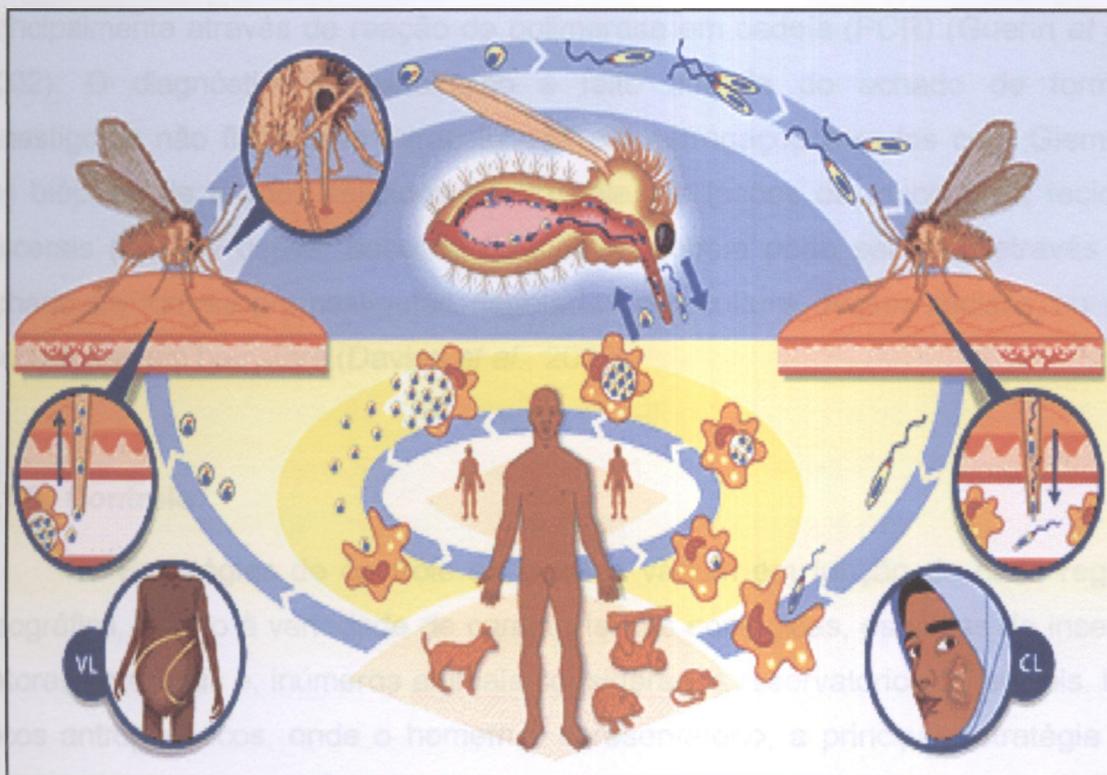


FIGURA 03 - Ciclo do parasito *Leishmania spp.* em seus hospedeiros (WHO, 2003).

2.1.4. Classificação

A classificação do gênero *Leishmania* em diferentes espécies baseou-se inicialmente nos aspectos clínicos, comportamento do vetor e distribuição geográfica (Magill, 2000). Porém, critérios moleculares, adotados recentemente, fizeram com que o gênero fosse subdividido em dois subgêneros: o subgênero *Viannia* que é encontrado somente no Novo Mundo e o subgênero *Leishmania*, que inclui espécies patogênicas do Velho Mundo e do Novo Mundo (Brito *et al.*, 1998). Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* patogênicas, responsáveis pelas várias formas clínicas da doença (Guerin *et al.*, 2002).

2.1.5. Diagnóstico

De modo geral, o diagnóstico da doença é baseado no exame clínico dos sintomas, no histórico fornecido pelo paciente e pela caracterização da área. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por: ensaios sorológicos, entre os quais se destacam os ensaios imunoenzimáticos como ELISA, teste de aglutinação direta (DAT), imunofluorescência indireta e ensaios moleculares,

principalmente através de reação de polimerase em cadeia (PCR) (Guerin *et al.*, 2002). O diagnóstico parasitológico é feito através do achado de formas amastigotas não flageladas intracelulares em esfregaços corados com Giemsa, em biópsias de tecidos seccionados da pele, de lesões da mucosa ou tecidos viscerais (medula óssea, baço ou fígado) e também pode ser feito através do achado de formas promastigotas flageladas em cultura desses tecidos ou em inoculações em hamsters (Davies *et al.*, 2003).

2.1.6. Controle

Estratégias de controle da doença variam em função de cada região geográfica, devido à variedade de características ecológicas, espécies de insetos vetores potenciais e, inúmeros animais considerados reservatórios potenciais. Em focos antroponóticos, onde o homem é o reservatório, a principal estratégia de controle é o tratamento dos indivíduos infectados, reduzindo assim, a transmissão da doença. Outra medida bastante importante é o controle do vetor através da utilização de inseticidas, porém grandes dificuldades vêm sendo apresentadas através dos numerosos casos de resistência dos insetos aos inseticidas (Guerin *et al.*, 2002).

Em focos zoonóticos, onde o cão doméstico é o principal reservatório, as medidas de controle tornam-se problemáticas, devido à falta de estratégias que satisfaçam os interesses da comunidade, dos órgãos de Saúde Pública e, além disso, muitas medidas adotadas são inviáveis e por vezes ineficazes, pois o cão não responde adequadamente aos tratamentos (Davies *et al.*, 2003).

2.1.7. Tratamento

Como descrito anteriormente, *Leishmania* são um grupo de protozoários encontrados em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Cada espécie apresenta um ciclo antroponótico ou zoonótico característico. Muitos destes parasitos provocam infecção no homem, ocasionando uma ampla variedade de síndromes clínicas. Cada região geográfica tem uma combinação única de cepas, vetores invertebrados, hospedeiros mamíferos e diversidade genética. Desta forma, um tratamento eficaz em uma área pode não ser eficaz em

outra. Portanto, não é possível e nem desejável a recomendação de um único regime de tratamento que poderia ser seguro e efetivo para todas as formas da doença e em todas as regiões geográficas (Magill, 2000).

Assim, têm-se buscado diversas soluções para o tratamento da leishmaniose, com a administração de diversos tipos de medicamentos. Atualmente, existem aproximadamente 25 compostos que apresentam atividade antileishmania, mas somente alguns são classificados como medicamentos para o tratamento da leishmaniose humana e a maioria destes são usados por via parenteral (Singh & Sivakumar, 2004). Dentre os fármacos de primeira escolha estão os antimoniais pentavalentes orgânicos representados pelo antimoniato de meglumina (Glucantime®) e pelo estibogluconato de sódio (Pentostam®). Dentre os fármacos de segunda escolha estão as diamidinas aromáticas (Pentamidina), os antibióticos (Anfotericina B e Paromomicina) e os antifúngicos (Ketoconazol e Itraconazol), Alopurinol e o anticâncer Miltefosine.

Antimoniais pentavalente. Em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna observou que o tártaro emético era eficaz na terapêutica da leishmaniose tegumentar americana, porém devido aos seus efeitos tóxicos e graves efeitos colaterais, estes antimoniais trivalentes (TAB. 01) foram substituídos por compostos estibiados pentavalentes (Rath *et al.*, 2003). Em 1920, Bramachari desenvolveu o primeiro composto a base de antimônio pentavalente (TAB. 02), a uréia estibamina e em 1936, Schmidt introduziu um antimonial pentavalente mais estável o gluconato de antimônio (V) sódico, conhecido comercialmente como Solustibosan® (Bayer) ou Pentostam® (Glaxo Wellcome) (Marsden, 1985). Somente no final da Segunda Guerra Mundial foi desenvolvido na França um medicamento alternativo, o antimoniato de n-metilglucamina, comercializado como Glucantime® (Rhône-Poulenc-Rohrer) (Marsden, 1985). Atualmente, o Pentostam® é manufaturado e comercializado nos países de língua inglesa e na Ásia, enquanto o Glucantime® é manufaturado e comercializado nos países de língua francesa e espanhola e na América Latina. As poucas diferenças entre os dois fármacos estão relacionadas à estabilidade e à toxicidade (Marsden & Nonata, 1975).

TABELA 01 - Estrutura química dos antimoniais trivalentes empregados na terapêutica da Leishmaniose (Rath *et al.*, 2003).

NOME QUÍMICO	Formula Estrutural	NOME COMERCIAL
Tartarato de antimônio e potássio	$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CO} - \\ \\ \text{HCO} - \text{Sb} - \text{OH} \\ \\ \text{HCO} / \\ \\ \text{COOH} \end{array} \right] \text{K}$	Tártaro emético
Antimônioato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico		Stibophen [®] , Repodral [®] , Fuadina [®]
Tioglicolato de sódio e antimônio	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{S} \\ \\ \text{O} = \text{C} - \text{O} \end{array} \text{Sb} - \text{S} - \text{CH}_2\text{COONa}$	

A fim de se reduzir os custos na utilização dos antimoniais pentavalentes em países subdesenvolvidos, uma formulação genérica do Pentostam foi produzida na Índia, envolvendo menor custo que a versão comercial e, após estudos de bioequivalência, revelou a mesma efetividade e segurança na utilização desta droga no tratamento de todas as formas de leishmaniose (Sundar & Raí, 2002).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não está bem elucidado, acredita-se que ajam pela depleção dos níveis intracelulares de Adenosina Trifosfato (ATP) e Guanosina Trifosfato (GTP), e pela inibição de enzimas da via glicolítica, devido à interferência no processo de glicólise e na β -oxidação de ácidos graxos em amastigotas de *Leishmania spp.* (Balaña-Fouce *et al.*, 1998; Berman *et al.*, 1988). Sugere-se que o antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, sendo convertido a antimônio trivalente após sua administração (Frézard *et al.*, 2001). Há indícios que o antimônio trivalente é substancialmente mais eficiente que o antimônio pentavalente contra promastigotas e amastigotas

(Roberts *et al.*, 1995). Esses resultados reforçam a hipótese de uma conversão metabólica intramacrofágica do antimônio pentavalente em antimônio trivalente, sendo, este o elemento tóxico ao parasito no seu estado intracelular, já que o antimônio pentavalente é dez vezes menos tóxico para os humanos e tem um maior índice terapêutico que as preparações de antimônio trivalente (Roberts *et al.*, 1995).

TABELA 02 - Estrutura química dos antimoniais pentavalentes empregados na terapêutica da Leishmaniose (Rath *et al.*, 2003).

Nome Químico	Formula estrutural proposta	Nome comercial
Antimoniato de N-metilglucamina	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NHCH}_3^+ \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \cdot (\text{OH})_2\text{Sb}_2\text{O}^- $	Glucantime®
Gluconato de antimônio (V) sódico ou Estibogluconato de sódio	$ \left. \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{HCO} \\ \\ \text{HCO} \\ \\ \text{HCO} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} \right\} \text{Sb} - \text{O} - \text{Sb} \left. \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}^- \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} \right\} \text{Na}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O} $	Pentostam® Solustibosan®
Uréia estibamina ¹⁶	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O} = \text{Sb} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{NH-CO-NH}_2 \end{array} $	Estibamine®

A conversão do antimônio pentavalente para a forma trivalente também pode ser verificada *in vitro*, através da incubação do fármaco na presença de uma enzima encontrada no citosol de células humanas (pH 5,0, 37°C), responsável pelo mecanismo de defesa contra danos oxidativos, denominada glutathione

redutase (GSH). Baseado nestes resultados, o mecanismo de ação do antimoniato de meglumina envolve três etapas: primeiramente a entrada do fármaco em vacúolos digestivos do macrófago (fagolisossomos), através de difusão ligada a carboidratos na membrana plasmática, em seguida, a redução do antimônio pentavalente para trivalente na presença de tióis provenientes da célula hospedeira ou do próprio parasita e, finalmente, o acúmulo do antimônio trivalente e o contato com grupos sulfidrilas do parasito, causando sua morte (Frézard *et al.*, 2001).

Alguns estudos evidenciam a participação de tióis específicos do parasito como a tripanotiona, bem como de tióis específicos do macrófago como a glicilcisteína, na redução do antimônio pentavalente para a forma trivalente, por meio de processo não enzimático (Santos Ferreira *et al.*, 2003). Em outro estudo verificaram uma provável redução mediada por enzimas, onde uma enzima específica do parasito, denominada TDR1, apresentou atividade catalítica na conversão do antimônio pentavalente para trivalente, usando a glutatona como redutor (Denton *et al.*, 2004). É possível que mais de um mecanismo seja responsável pela ativação da droga, e a redução ou perda da ativação da droga pode ser um mecanismo pelo qual o parasito pode se tornar resistente (Ouellette *et al.*, 2004).

Os antimoniais pentavalentes apresentam alta eficácia em todas as formas de leishmaniose, porém as baixas dosagens e tratamento descontínuo provocaram o aumento do número de relapsos e de cepas de *Leishmania* resistente aos antimoniais pentavalentes (Guerin *et al.*, 2002). Assim, a Organização Mundial de Saúde recomenda um regime de tratamento baseado em 20 mg Sb^{5+} /kg diariamente, não ultrapassando 850 mg de antimônio, por 20-40 dias, dependendo da área geográfica, podendo ser administrado via intravenosa ou intramuscular (Balaña-Fouce *et al.*, 1998).

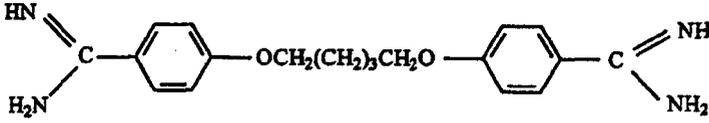
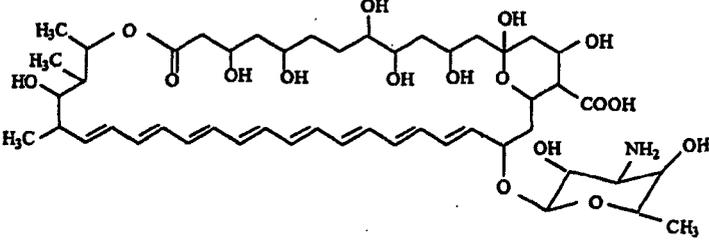
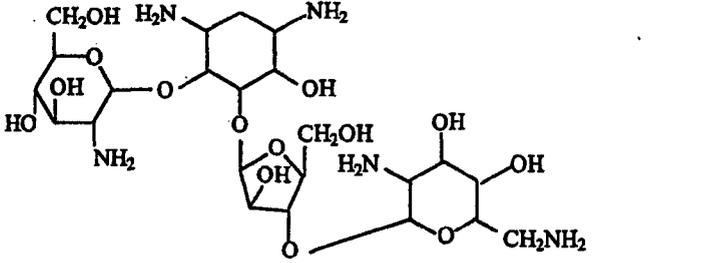
Alguns efeitos colaterais podem surgir com a sua utilização, tais como: artralgia, náusea, pancreatite, citopenia, cólicas abdominais, mialgias, alterações hepáticas e mudanças no padrão eletrocardiográfico, porém após o término do tratamento estes efeitos desaparecem (Berman, 1997).

Diamidinas aromáticas. A pentamidina sintetizada primeiramente como agente hipoglicemiante (TAB. 03), tem sido utilizada como primeira terapia alternativa (segunda escolha) em alguns casos de leishmaniose, por exemplo,

quando há resistência aos antimoniais pentavalentes (Balaña-Fouce *et al.*, 1998). Em doses terapêuticas, os efeitos colaterais, após a administração destes fármacos, aparecem em 30 a 50 % de pacientes tratados. Dentre esses efeitos é possível citar a taquicardia, lesões na pele, dores de cabeça e vômito. Após o tratamento contínuo, foram descritos efeitos como a hipotensão, hipoglicemia, alterações cardíacas, nefrotoxicidade e morte súbita (Balaña-Fouce *et al.*, 1998). Além de ser tóxica e de serem relatados casos de resistência adquirida pelo parasito, o mecanismo de ação da pentamidina não é muito conhecido, sugere-se que sua atividade esteja relacionada a múltiplos alvos, interagindo com ácidos nucléicos do parasito e inibindo o processo de replicação e transcrição. Por causa da alta dose e do longo regime de tratamento, a pentamidina é provavelmente mais tóxica que os antimoniais pentavalentes, sendo somente indicada quando o tratamento será mais efetivo que com os antimoniais. Assim, a pentamidina deve ser usada onde é comum o tratamento com antimoniais apresentar falhas e em regiões onde não é amplamente utilizada (Berman, 1997).

Antibióticos poliênicos. A anfotericina B é um antibiótico anfótero que se liga aos esteróis das membranas celulares, preferencialmente ao ergosterol que é o maior esteroide das membranas celulares dos fungos e também da *Leishmania*, e altera a sua permeabilidade (TAB. 03), criando poros e provocando o extravasamento de íons, levando assim o parasito à morte (Misha *et al.*, 1994). É usada predominantemente como uma droga antifúngica, mas apresenta alta eficácia em cepas de *Leishmania* resistentes aos antimoniais e em casos de leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral que não respondem ao tratamento com antimoniais. Porém, sua toxicidade e necessidade de ser administrada por infusão lenta durante quatro horas, representam suas grandes desvantagens. O uso de formulações lipídicas contendo anfotericina B, as quais apresentam toxicidade reduzida e maior meia-vida plasmática, têm sido um dos maiores avanços no tratamento da leishmaniose (Croft & Coombs, 2003). No entanto, estes apresentam um custo muito elevado quando comparados aos antimoniais, inviabilizando sua utilização em países subdesenvolvidos. Além disso, em altas doses de administração foram observados efeitos adversos como: febre, diminuição dos níveis de potássio e magnésio e nefrotoxicidade (Balaña-Fouce *et al.*, 1998).

TABELA 03 - Outros fármacos empregados na terapêutica da Leishmaniose (Rath *et al.*, 2003).

Nome Químico	Formula estrutural	Nome comercial
Isetionato de pentamidina		Pentamidina® Lomidina®
Anfotericina B		Fungizone®
Miltefosine	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	—
Paromomicina		Humatin®

Formas alternativas de tratamento. Recentemente, Interferon γ recombinante tem sido utilizado como adjuvante em associação com antimoniais pentavalentes no tratamento de leishmaniose cutânea (Berman, 1997).

A Paromomicina (TAB. 03) é um aminoglicosídeo usado no tratamento de doenças bacterianas, quando injetado em associação com Pentostam mostrou resultados satisfatórios no tratamento de leishmaniose visceral. Porém, a administração parenteral não apresentou resultados satisfatórios no tratamento de leishmaniose cutânea (Singh & Sivakumar, 2004), enquanto a sua utilização em formulação tópica no tratamento de leishmaniose cutânea apresentou boa eficácia (Sundar & Raí, 2002).

Outros fármacos de administração oral como os antifúngicos Cetoconazol e Itraconazol produzem efeito antileishmania pelo bloqueio da

síntese de ergosterol. O Alopurinol interfere na síntese protéica do parasito, em combinação com outros agentes antileishmania têm sido utilizados no tratamento da leishmaniose cutânea em alguns países da América Latina, porém este tipo de tratamento não tem sido recomendado (Singh & Sivakumar, 2004).

O Miltefosine é um alquilfosfolípido inicialmente desenvolvido como um agente anticâncer (TAB. 03), é ativo contra *Leishmania in vivo* e *in vitro*. O mecanismo de ação do Miltefosine ainda não está bem esclarecido, mas está associado a mudanças no metabolismo alquilfosfolípido e na biossíntese de fosfolípidios (Ouellette *et al.*, 2004). O Miltefosine pode vir a ser o primeiro tratamento oral para leishmaniose visceral, visto que os resultados de estudos de fase III, na Índia, indicaram boa tolerância e excelência na cura parasitológica. O Miltefosine foi registrado para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia em março de 2002, porém é um potencial teratogênico, e necessita ser usado com cuidado em mulheres e em crianças recém-nascidas, além de apresentar efeitos colaterais gastrintestinais (Croft & Coombs, 2003).

2.2. Estudos farmacológicos com auxílio de um traçador radioativo

Um traçador radioativo ou radioisótopo pode ser definido como uma pequena quantidade de um isótopo radioativo incorporado a um sistema, com a finalidade de definir seu percurso ou localização (Brownell *et al.*, 1968). Tem diversas aplicações na medicina, indústria, agricultura e na proteção ao meio ambiente (CNEN, 2003), sendo um elemento ou substância que quando administrado em um ser vivo em quantidades mínimas, mantendo-se identificável e indiferenciável, pode reproduzir com fidelidade o comportamento do organismo, sem contudo influenciá-lo. Estudos utilizando os radioelementos e moléculas radiomarcadas mostram grande simplicidade no processo analítico (Brownell *et al.*, 1968). Desta forma, o estudo farmacológico de muitas drogas tem sido possível devido ao auxílio de traçadores isotópicos, representados por substâncias marcadas com átomos radioativos – radiofármacos (Neves *et al.*, 2002).

Para o estudo farmacológico de uma droga, devem ser levados em conta alguns fatores essenciais relacionados com a ação da droga em um ser vivo. Um dos principais fatores é a ação transportadora do sangue, primordial sob

o ponto de vista fisiológico dos organismos e importante no caso de drogas que necessitam deslocar-se do ponto de entrada até o local de ação.

O sistema sangüíneo e o sistema linfático constituem o compartimento central de partida de onde as drogas são distribuídas aos tecidos, sofrendo a devida biotransformação e sendo finalmente excretada (Wilkinson, 2001). A entrada de uma droga no compartimento central, o sangue, segue uma interação droga-proteína. Ocorrendo de uma droga estar ligada a proteínas no sistema circulatório, há necessidade primeiramente de haver liberação da droga na fase aquosa para depois se difundir fora do compartimento vascular (Wilkinson, 2001). Assim, a distribuição da droga vai sendo progressivamente efetuada para os espaços extracelulares até alcançar seus receptores específicos.

Para se estudar a cinética de fármacos no organismo, é importante avaliar a biotransformação – os metabólitos podem ainda apresentar algumas propriedades farmacodinâmicas e possuir cinética da droga inicial (Cohen, 1968). Além disso, os métodos que empregam elementos radioativos como traçadores, não distinguem em geral o produto íntegro daquele degradado, considerando os resultados obtidos como um todo. Isto deve ser analisado com bastante precaução antes de ser idealizado um modelo cinético.

2.2.1. Farmacocinética e análise compartimental

A farmacocinética se caracteriza, entre outros aspectos, pela construção de modelos que representam um sistema de compartimentos no organismo e nos quais se supõe que se distribui o fármaco depois de administrado. Um compartimento pode ser um grupo de tecidos com características fisiológicas e físico-químicas similares, tais como o fluxo sangüíneo, afinidade por fármacos, etc. Depois de sua introdução na corrente sangüínea, por um processo de absorção, bem como, por injeção intravenosa, o fármaco se distribui nestes compartimentos. O processo de absorção é, em geral, rápido e se caracteriza por ser reversível. Deste modo, o fármaco presente no sangue se encontra em estado de equilíbrio com o fármaco em outros fluidos, tecidos ou órgãos de distribuição. Como conseqüência deste equilíbrio, as trocas de concentração do fármaco no sangue indicam trocas de concentração em outros compartimentos. A transferência do fármaco do sangue para urina ou a outros compartimentos de excreção, assim como os processos de

biotransformação dos fármacos, no plasma e tecidos, em produtos metabólicos, geralmente inativos, são processos irreversíveis. Esta irreversibilidade dá lugar ao processo denominado eliminação, que compreende todos aqueles mecanismos que determinam à eliminação do fármaco do organismo, seja por excreção urinária, biliar ou outras vias (Cárcamo, 1982)

A farmacocinética também pode ser definida como sendo o estudo da dinâmica de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de uma droga (Wilkinson, 2001). Assim, o objetivo da farmacocinética é descrever as alterações na concentração de fármacos e de seus metabólitos nos vários fluidos do organismo e tecidos em função do tempo. Equações matemáticas e modelos são utilizados para descrever os resultados experimentais e para obter parâmetros farmacocinéticos, tais como: constante de velocidade de transferência (k), constantes de absorção, metabolismo e eliminação de fármacos, volume de distribuição (V_d), o grau de ligação às proteínas plasmáticas, entre outros (Wilkinson, 2001).

O estudo da cinética de drogas pode ser obtido com a determinação da curva de decaimento plasmático, a medida de captação no corpo inteiro, em órgãos de interesse e excreção, facilitados pela utilização de um traçador radioativo. Assim, os dados obtidos são analisados por meio de gráficos e a curva resultante permite determinar a presença de uma exponencial ou mais. A partir dos dados extraídos da curva decide-se qual tratamento matemático é apropriado, permitindo a interpretação dos resultados experimentais de forma quantitativa e dinâmica (Araújo, 1995).

A análise compartimental representa um modelo utilizado para definir quantitativamente a distribuição de um fármaco no organismo em função do tempo (Murphy, 1992). A hipótese de compartimentalização envolve a utilização de modelos matemáticos, que permitem definir certo número de parâmetros aos quais se podem atribuir valores numéricos, com o objetivo de aproximar-se ao máximo dos parâmetros biológicos. O modelo do qual se parte é uma hipótese, havendo concordância entre os parâmetros determinados experimentalmente e o modelo escolhido, pode-se considerar a hipótese de partida válida (Murphy, 1992).

O modelo desenvolvido em termos matemáticos, isto é, descrito por uma série de equações, poderá ser testado contra todos os dados experimentais

disponíveis. Desta forma, a metodologia de modelagem envolve não somente a postulação de um modelo (isto é, o esquema que o representa), mas também a transformação dos dados em parâmetros que descrevem este modelo, o teste de modelos alternativos e a programação de novos experimentos (Murphy, 1992).

2.3. Radioisótopos de antimônio

De acordo com a tabela periódica, o antimônio (Sb) é um semimetal da família 5A, com número atômico (Z) 51 e número de massa (A) 121,75, sendo um elemento estável. Ocorre na natureza como sulfeto de antimônio ou óxido de antimônio e existe no estado trivalente (Sb^{3+}) e pentavalente (Sb^{5+}). O Sb^{5+} tem a tendência de se converter para a forma Sb^{3+} em meio ácido e age como um agente oxidante. O Sb^{3+} reage facilmente com grupos sulfidríla *in vivo* para formar tioantimoniatos. Desde que os compostos inorgânicos são mais tóxicos que os compostos orgânicos, estes últimos são freqüentemente usados em terapia (Stemmer, 1976).

A produção dos isótopos radioativos de antimônio pode ser realizada através de uma reação nuclear provocada em um reator, onde ocorre o bombardeamento dos núcleos estáveis do produto com os nêutrons vindos do processo de fissão do Urânio-235 (combustível físsil). Assim, a produção do radioisótopo se dá por uma reação tipo (n, γ), por ativação nuclear (1):



Onde: X = elemento químico

Z = número atômico do elemento

A = número de massa do elemento

Na TAB. 04 são apresentadas às energias gama dos radioisótopos ${}^{122}\text{Sb}$ e ${}^{124}\text{Sb}$.

TABELA 04 - Energias gama dos radioisótopos ^{122}Sb e ^{124}Sb .

Radioisótopo	Meia-vida	Energia (keV)	Abundância (%)	Modo de produção
^{122}Sb	2,72 dias	563,9	70	$^{121}\text{Sb} (n, \gamma) ^{122}\text{Sb}$
		686	3,5	
^{124}Sb	60,20 dias	602,73	97,80	$^{123}\text{Sb} (n, \gamma) ^{124}\text{Sb}$
		645,76	7,50	
		722,79	10,76	
		1368,16	2,62	
		1690,98	47,34	
		2090,94	5,58	

Os radioisótopos produzidos em reator apresentam-se instáveis por excesso de nêutrons e transformam um nêutron em um próton, assim desintegram-se preferencialmente por emissão de nêutron e raios gama, como pode ser verificado no esquema de decaimento dos radioisótopos de ^{122}Sb e ^{124}Sb (TAB. 05). O ^{122}Sb decai 97,59 % por emissão de β^- e 2,41 % por emissão de captura eletrônica (EC) e β^+ , gerando ^{122}Te estável e ^{122}Sn estável, respectivamente (FIG. 04). O ^{124}Sb decai 100 % por emissão de β^- , gerando ^{124}Te estável (FIG. 05).

TABELA 05 - Características dos isótopos (Weast, 1978-79).

Isótopo	Abundância na natureza (%)	Modo de decaimento	Energia de decaimento (MeV)	Energia partícula (MeV)	Abundância da partícula (%)	Seção de choque por captura de nêutrons térmicos (b)
$^{121}_{51}\text{Sb}$	57,25					6,2 (Sb^{122})
$^{122}_{51}\text{Sb}$		β^- β^+ , EC	1,972	β^+ 0,56		
			1,62	β^- 0,74	4	
				1,40	63	
				1,97	30	
$^{123}_{51}\text{Sb}$	42,75					4,8 (Sb^{124})
$^{124}_{51}\text{Sb}$		β^-	2,916	0,06	2	6,5
				0,23	11	
				0,621	50	
				0,950	5	
				1,01	1,5	
				1,59	5	
				1,67	3	
	2,317	22				

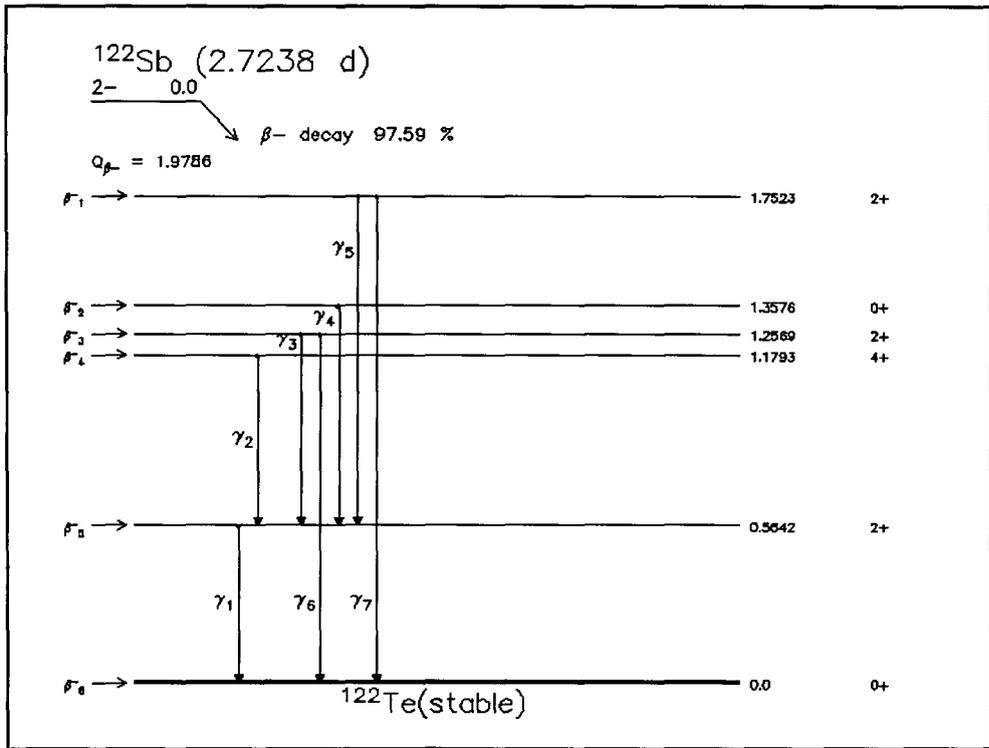


FIGURA 04 - Esquema simplificado de decaimento do ^{122}Sb .

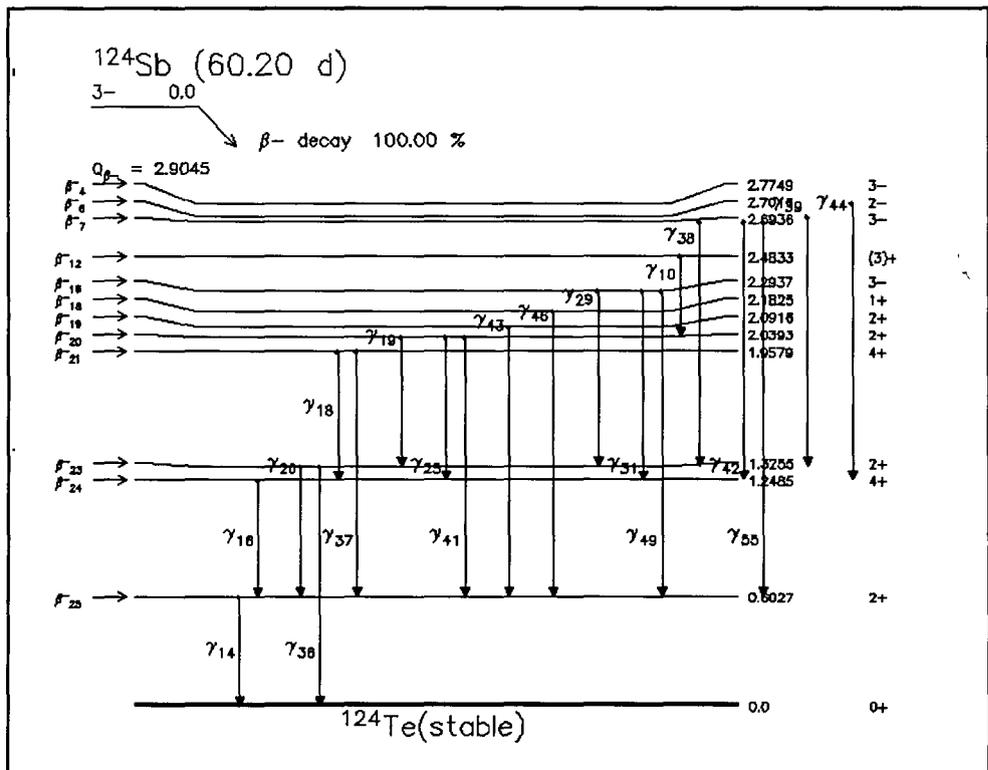


FIGURA 05 - Esquema simplificado de decaimento do ^{124}Sb .

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi estudar a biodistribuição de antimoniato de meglumina (Glucantime®), irradiado por nêutrons, em animais sadios ou infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, para estabelecer as propriedades químicas, a eficiência biológica, a cinética e biodistribuição deste composto.

Especificamente, pretendeu-se:

1. Padronizar a irradiação por nêutrons do antimoniato de meglumina e do hexahidroxiantimoniato de potássio (antimonio pentavalente livre), no reator nuclear IEA-R1 (IPEN/CNEN/SP), para a construção de radiotraçador (^{122}Sb e ^{124}Sb);

2. Determinar a pureza radionuclídica e química do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons;

3. Determinar a eficiência biológica do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons no tratamento *in vitro* e *in vivo*;

4. Determinar a sua biodistribuição em animais sadios ou infectados com modelos experimentais de leishmaniose visceral;

5. Avaliar a biodistribuição do hexahidroxiantimoniato de potássio (antimonio pentavalente livre) irradiado em animais sadios;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Drogas e reagentes

Antimoniato de Meglumina (Antimoniato de meglumina®; Aventis Pharma LTDA., lote 201475), é um antimonial pentavalente dotado de ação terapêutica específica sobre todas as formas de clínicas de leishmaniose. As ampolas de Glucantime® utilizadas continham 8,1% antimônio em 5 mL (81 mg Sb^{5+} /mL) (DRAFT, 2000).

Hexahidroxiantimoniato de Potássio (Sigma®), antimônio pentavalente não complexado. Diluído em água fervente (11,5 mg Sb^{5+} /mL).

Tartarato de Potássio Antimonila hemihidratado (Tártaro Emético) (Merck®), antimônio trivalente livre não complexado. Diluído em solução salina (8,1 mg Sb^{3+} /mL).

Rompun® (Bayer S.A.- saúde animal, lote 001/03), sedativo, analgésico e relaxante muscular para uso veterinário. As ampolas de 10 mL de Rompun® continham 2 g de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina em 100 mL (20 mg/mL).

Cloridrato de Quetamina (Ketalar®; Cristália, lote 03031043), anestésico geral, não barbitúrico. As ampolas de 10 mL de Ketalar® estavam na concentração de 50 mg/mL.

4.2. Animais de laboratório

Os animais utilizados foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina – USP. Os estudos foram realizados em hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*), macho recém-desmamado e camundongo BALB/c fêmea pesando entre 20 e 25 g, mantidos em caixas esterilizadas, forradas com material absorvente, alimentados com ração comercial e água *ad libitum* (à vontade). Todos os procedimentos realizados nos ensaios foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Proc. Nº. 006/03).

4.3. Células

Amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* (cepa M 6445) foram purificadas de baço de hamster dourado, por meio de centrifugação diferencial e a infecção, avaliada pelo método de Stauber (1958) 60 -70 dias após o inóculo. O inóculo foi realizado com solução salina na concentração entre $5-7 \times 10^7$ parasitas/animal, via intraperitoneal.

Promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* (cepa M 6445) foram mantidas em meio M199 suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 0,25 % de hemina e 2 % de urina humana, incubadas em estufa tipo B.O.D. a 24°C.

Células RAW 264.7 (ATCC TIB-71), células macrofágicas murinas, foram cultivadas em meio de cultura RPMI-PR⁺ 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e incubadas a 37°C, em estufa com 5 % CO₂.

4.4. Infecção pelo parasito

Para obtenção de animais com leishmaniose visceral, foi utilizado camundongo BALB/c, inoculado com *L. (L.) chagasi*, na concentração entre $1-2 \times 10^7/150\mu\text{L}$, via intravenosa (via plexo retro-orbital), anestesiados com uma associação anestésica de Ketalar®/Rompun® (100mg/kg/10mg/Kg) via intramuscular (Payton *et al.*, 1993; Curl *et al.*, 1983). Os animais foram utilizados após 19 -22 dias de infecção.

4.5. Produção do radiotraçador

A fim de se produzir um radiotraçador de antimônio para posteriormente avaliar a sua biodistribuição em um sistema *in vivo*, foram irradiadas amostras de compostos orgânicos e inorgânicos a base de antimônio pentavalente e trivalente.

Para a padronização da irradiação, inicialmente foram irradiadas amostras de 0,5-0,8 mL do antimoniato de meglumina, em ampolas de quartzo, dentro de cápsulas (coelho) de alumínio, no reator IEA-R1(IPEN-CNEN/SP) durante 20 (vinte), 15 (quinze) e 07 (sete) minutos, num fluxo de nêutrons térmicos de $1 \times 10^{13} \text{ n/cm}^2 \cdot \text{s}$.

Assim, todas as amostras usadas nos ensaios seguintes seguiram o mesmo padrão de irradiação. Amostras de 0,5-0,8 mL do antimoniato de meglumina (81 mg Sb⁵⁺/mL), amostras de 1 mL de hexahidroxiantimoniato de

potássio (11,5 mg Sb^{5+}/mL) e amostras de 1 mL de tartarato de potássio antimoniato hemihidratado (8,1 mg Sb^{3+}/mL) foram irradiadas em ampolas de quartzo, dentro de cápsulas (coelho) de alumínio, no reator IEA-R1 (IPEN-CNEN/SP) durante 7 (sete) minutos, num fluxo de nêutrons térmicos de 1×10^{13} n/cm².s, para produção dos radioisótopos.

O radionuclídeo foi produzido em reator nuclear por bombardeamento de núcleos estáveis com nêutrons, por ativação nuclear, por reações como as descritas abaixo:

Reação do tipo $^{121}\text{Sb} (n, \gamma) ^{122}\text{Sb}$

Reação do tipo $^{123}\text{Sb} (n, \gamma) ^{124}\text{Sb}$

4.6. Avaliação da pureza radionuclídica e determinação da atividade

A pureza radionuclídica foi determinada por meio de espectroscopia- γ , 10 μL do antimoniato de meglumina irradiados com nêutrons foi colocado em um tubo de vidro e acondicionado dentro de um detector de Ge hiper puro, Canberra Company, gerenciado pelo programa Geniepc no micro computador. Os espectros obtidos foram: no eixo x - a energia- γ , em keV e no eixo y - as contagens. A calibração em energia foi realizada utilizando fontes padrão de ^{60}Co e ^{137}Cs . O levantamento da eficiência (ϵ_γ) para cada prateleira do detector foi realizado pela contagem de fontes calibradas de ^{60}Co , ^{137}Cs e ^{152}Eu .

O cálculo da atividade foi determinado pela equação (2):

$$dps = \frac{cps}{a_\gamma \cdot \epsilon_\gamma} \quad (2)$$

Onde: dps = desintegrações por segundo;

cps = contagens por segundo;

a_γ = abundância da radiação gama;

ϵ_γ = eficiência gama.

Sendo que, 1 dps = 1 Bq e 1 Ci = $3,7 \times 10^7$ Bq.

4.7. Avaliação química do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons

A fim de se verificar a pureza química das amostras de antimoniato de meglumina irradiadas foram realizados alguns procedimentos tais como: análise

por espectroscopia ultravioleta - visível e cromatografia líquida de alta eficiência, para analisar os efeitos da irradiação no composto.

4.7.1. Espectroscopia Ultravioleta-visível

A avaliação química foi determinada por meio de espectroscopia UV-visível, utilizando um espectrofotômetro Ultrospec 3000, n° de série 68222 4094 V1.4, Pharmacia Biotech Ltda. Foram realizadas varreduras entre os espectros nas regiões entre 200 e 700 nm, para as amostras do antimoniato de meglumina irradiado com nêutrons (AMI) e do antimoniato de meglumina não irradiado (nativo) (AMN). Foi utilizado um feixe duplo, onde a referência era água bidestilada e/ ou fármaco nativo e todas as medidas foram realizadas utilizando cubetas de quartzo e quando necessário às amostras foram diluídas com água bidestilada.

4.7.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (High-Performance Liquid Chromatography – HPLC)

Os ensaios foram realizados em um cromatógrafo líquido Waters (Milford, MA, EUA), o qual consiste de um módulo de controle e bomba Waters 600 e de um integrador Waters 746. O sistema cromatográfico foi fixado em um detector ultravioleta-visível Waters 486. Na análise foi utilizada uma coluna C18 (5µm, 120Å, 4,6 x 150 mm, Acclaim™ 120, Dionex) de fase reversa, usando um sistema isocrático. Os parâmetros utilizados para a realização do CLAE estão explícitos na TAB. 06.

TABELA 06 - Parâmetros experimentais otimizados para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

CLAE	Waters 600
Fase Móvel	Acetonitrila 70%/Água 30%
Vazão	1 mL/min
Temperatura	23°C
Volume injetado	5-20µL
Pressão de operação	940 psi
Comprimento de onda	330 e 250 nm

Na realização dos ensaios foram utilizadas amostras de antimoniato de meglumina irradiadas (AMI) durante 15 e 07 minutos, num fluxo de nêutrons térmicos 1×10^{13} n/cm².s, amostras de antimoniato de meglumina não irradiadas (AMN) e como solução padrão foi utilizada amostra de tartarato de potássio antimonila hemihidratado, dissolvido em solução salina, irradiado durante 07 minutos, num fluxo de nêutrons térmicos 1×10^{13} n/cm².s. Quando necessário às amostras foram diluídas em solução salina.

Após a estabilização do sistema com o solvente, durante 1 hora, foram realizadas as análises por meio de CLAE, onde foram injetadas as amostras e feitas às avaliações espectrofotométricas durante os 20 minutos iniciais da corrida. No caso das análises dos produtos irradiados, também foram coletadas amostras, de 2 em 2 minutos do tempo de corrida, e colocadas em tubos de contagem. Posteriormente, estas amostras foram analisadas em um detector de radiação gama tipo contador de poço (Shell, Jr. 1000/2000 - USA).

4.8. Avaliação da atividade biológica *in vitro* do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons

A fim de se avaliar a manutenção da atividade biológica das amostras do antimoniato de meglumina, após a irradiação, foram realizados alguns procedimentos tais como: a determinação da efetividade, da atividade antileishmania e do perfil citotóxico do composto.

4.8.1. Determinação da Concentração Efetiva 50 % em formas promastigotas

Com o objetivo de se verificar a efetividade do AMN e AMI₇ (irradiado durante 07 minutos) frio (quando ocorreu a completa desintegração de seus átomos radioativos) em formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, realizou-se a determinação da Concentração Efetiva 50 % (CE₅₀), concentração suficiente para provocar a inviabilidade de 50 % das células testadas. Os respectivos produtos foram dissolvidos em meio de cultura para promastigotas, diluídos em série (base 2) e incubados por um período de 24 horas com 1×10^6 promastigotas/poço em placas de 96 poços (duplicata). A viabilidade das células foi avaliada por um método colorimétrico baseado no sal de tetrazolio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio), Sigma®, que age como substrato no

processo respiratório oxidativo de mitocôndrias, devido à desidrogenases mitocondriais das células. Este produto é reduzido a seu subproduto formazan, permitindo verificar somente as células vivas e pode ser lido em um espectrofotômetro (leitor de placa ELISA) (Mitiskan MS – Uniscience) (TADA *et al.*, 1986). O MTT foi dissolvido em solução salina na concentração de 5 mg/mL, esterilizado por filtração e adicionado à placa de cultura. Após 4 h de incubação (estufa a 25°C) foi adicionado 100 µL/poço de SDS-HCl 10 % por um período de 18 h a 25°C. Finalmente foi realizada a leitura da absorvância em 570 nm. Os resultados foram expressos como curvas de sobrevivência. A análise dos dados e construção das curvas, assim como as determinações das CE₅₀ foram realizadas utilizando-se o programa Graph Pad Prisma 3.0, através de uma curva sigmóide dose-resposta.

4.8.2. Determinação da citotoxicidade em células RAW 264.7

Para determinação de citotoxicidade, o AMN e AMI durante 07 minutos frio foram diluídos em série (base 2), em meio de cultura RPMI-PR⁺ 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e incubados com 4×10^4 células RAW 264.7/poço, em placas de 96 poços (duplicata). A placa foi incubada a 37°C em estufa com 5 % CO₂ por 48 horas. A viabilidade das células foi avaliada por um método colorimétrico baseado no sal de tetrazolio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio) Sigma® (TADA *et al.*, 1986). O MTT foi dissolvido em solução salina na concentração de 5 mg/mL, esterilizado por filtração e adicionado à placa de cultura. Após 4 h de incubação (estufa a 37°C) foi adicionado 100 µL poço de SDS-HCl 10 % por um período de 18 h a 25°C. Finalmente foi realizada a leitura da absorvância em 570 nm. Os resultados foram expressos como curvas de sobrevivência. A análise dos dados e construção das curvas, assim como as determinações das CE₅₀ foram realizadas utilizando-se o programa Graph Pad Prisma 3.0, através de uma curva sigmóide dose-resposta (Tempone *et al.*, 2005).

4.8.3. Determinação da Concentração Efetiva 50 % em macrófagos peritoneais infectados com *L. (L.) chagasi*

Macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas (18-22 g) através de lavagem com meio RPMI-PR⁺ 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e posteriormente aplicados em placas de 24 poços, contendo lamínulas redondas de vidro (13 mm de diâmetro). Incubou-se as células por um período de 1 hora à 37°C em estufa com 5 % de CO₂ para adesão a placa. As células não aderentes foram removidas através de lavagem com meio de cultura à 25°C e posteriormente incubadas nas mesmas condições por um período de 24 horas. Amastigotas de *L. (L.) chagasi* extraídas de baço e separadas por centrifugação foram adicionadas aos macrófagos na proporção de 1:10 (macrófagos/amastigotas) e incubadas nas mesmas condições por 18 horas. Tratamento: o AMN e o AMI durante 15 e 07 minutos frio foram diluídos em série (base 2) em meio RPMI-PR⁺ 1640 e incubados com os macrófagos infectados (duplicata), por um período de 96 horas, mantendo-se como controle macrófagos não tratados. Ao final, as lamínulas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A determinação da CE₅₀ foi realizada através da contagem de 100 macrófagos/lamínula, usando os macrófagos não tratados como controle de 100 % de infecção. Os dados foram avaliados pelo software Graph Pad Prism 3.0, através de uma curva sigmóide dose-resposta (Tempone *et al.*, 2005).

4.9. Avaliação *in vivo* do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons

A fim de se verificar a efetividade *in vivo* do fármaco irradiado, foi realizado um ensaio em camundongos BALB/c fêmeas (20-25 g) infectados com *L. (L.) chagasi*, pelo inóculo de formas amastigotas de *L. (L.) chagasi*, retiradas de macerado de baço de hamster infectado, na concentração de $1-2 \times 10^7 / 100\mu\text{L}$, via intravenosa (via plexo retro-orbital), anestesiados com uma associação anestésica de Ketalar® (Cristália) /Rompun® (Bayer S.A.) (100mg/kg/10mg/kg) via intramuscular (Curl *et al.*, 1983; Payton *et al.*, 1993). Foram utilizados três grupos de animais (n= 4), um grupo tratado com o AMI₇ frio, um grupo tratado com AMN e outro tratado com solução salina, usada como controle. Após uma semana de infecção (7 dias), iniciou-se o tratamento dos camundongos com uma dose de 50 mg Sb⁵⁺/kg/dia, via injeção intraperitoneal, por um período de 4 dias consecutivos.

Duas semanas após a infecção (14 dias), os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, o baço e o fígado foram removidos e pesados, em seguida, foi realizado um *inprint* (marcação em lâminas de vidro). As lâminas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Foi realizada a contagem em microscópio óptico do número de amastigotas por 400 células nucleadas presentes nas lâminas impressas com cada órgão. Foi realizado o cálculo das Unidades Leishman- Donovan (LDU), para o baço e o fígado, de acordo com a equação (3):

$$LDU = \left(\frac{\text{n}^\circ \text{de amastigotas}}{1000 \text{ células nucleadas}} \right) \times \text{peso do órgão (g)} \quad (3)$$

Os dados foram analisados pelo software Graph Pad Prism 3.0, em uma curva sigmóide dose-resposta.

4.10. Estudos de imagem

A avaliação da biodistribuição do AMI por método não invasivo através da aquisição de imagens dinâmicas foi realizada no Centro de Radiofarmácia do IPEN, sob orientação do Dr. João Alberto Osso Jr.

Foram utilizados 2 hamsters machos sadios (115 g), anestesiados com associação de Rompun/Ketalar®, via intramuscular (10 mg/kg e 100mg/kg, respectivamente). A seguir, foi administrado via intramuscular 50 mg Sb⁵⁺/kg contendo atividade de 4,7 x 10⁶ Bq de ¹²²Sb (127 µCi) e 1,1 x 10⁵ Bq de ¹²⁴Sb (2,98 µCi). Foram realizadas imagens durante as seis primeiras horas de injeção do produto irradiado, utilizando uma gama câmara digital plana Gama Technical, Micro Segams Softer System, modelo v4.19, Hungria, colimador HEGP, faixa de energia entre 20 e 500 keV. A interação da radiação gama no cristal detector da câmara leva a emissão de luz (cintilação), posteriormente, é convertida em sinal elétrico. Assim, a gama câmara detecta a radiação e determina a posição da fonte emissora (correspondente à área que a luz foi emitida) e sua energia (intensidade da luz emitida).

4.11. Estudos biológicos em camundongos

Em todos os estudos biológicos realizados em camundongos BALB/c, os animais foram previamente pesados e o produto irradiado foi administrado via

intraperitoneal, 0,081mg Sb^{5+} /100 μ L (aproximadamente 0,1 % da Dose Efetiva, dose de fármaco necessária para atingir o efeito farmacológico desejado), contendo atividade de $2,2 \times 10^4$ Bq/100 μ L de ^{122}Sb (0,6 μ Ci) e $5,2 \times 10^2$ Bq/100 μ L de ^{124}Sb (0,014 μ Ci). Todo o procedimento foi realizado sem utilização de anestesia.

Na realização dos diferentes estudos foram utilizados 6 animais para cada tempo avaliado

4.11.1 Estudos de biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons

Após administração do produto irradiado por nêutrons e tendo decorrido os tempos pré-estabelecidos (3, 5, 15, 30, 60, 120, 300, 1440, 2880 e 4320 minutos), foi coletado o sangue dos animais via plexo retro-orbital e foram sacrificados por deslocamento cervical. Posteriormente, foram retirados os órgãos e tecidos considerados essenciais: cérebro, pulmão, coração, baço, fígado, estômago, rins, intestino delgado, intestino grosso, músculo e útero/ovário. Estes órgãos foram pesados e a sua radioatividade foi determinada em contador gama tipo poço com detector de NaI (TI) automático (Cobra Auto-Gamma -Packard - Canberra Company). Foi estabelecida a faixa de energia gama entre 500 e 700 keV e realizou-se a contagem em 1 minuto ou até atingir 1000000 cpm.

Foi feito um padrão tomando-se a mesma dose injetada nos animais, isto é, $2,22 \times 10^4$ Bq/100 μ L de ^{122}Sb (0,6 μ Ci), 518 Bq/100 μ L de ^{124}Sb (0,014 μ Ci), que foi colocada em um tubo e feita a contagem. A porcentagem de cada órgão foi calculada a partir da contagem do padrão equivalente a 100 % da dose injetada. Para os estudos de musculatura esquelética, foi adotada como massa 40 % do peso corpóreo e para a análise do sangue, foi adotada a volemia equivalente a 7 % do peso corpóreo.

O mesmo procedimento foi realizado com camundongos saudáveis e camundongos portadores de leishmaniose visceral.

4.11.2. Estudo de biodistribuição do hexahidroxi antimoniato de potássio irradiado por nêutrons

A fim de se comparar a biodistribuição do antimônio pentavalente complexado, como é o caso do antimoniato de meglumina – Glucantime, com a biodistribuição do antimônio pentavalente em sua forma livre, foram realizados estudos de biodistribuição utilizando o hexahidroxi antimoniato de potássio irradiado, em camundongos BALB/c fêmea pesando entre 20-24 g. Foi administrada, via intraperitoneal, 0,0821 mg Sb⁵⁺/100µL, contendo atividade de 1,9x10⁴ Bq/100µL de ¹²²Sb (0,5 µCi) e 3,33x10² Bq/100µL de ¹²⁴Sb (0,009 µCi). Foram realizados os mesmos procedimentos do estudo anterior, utilizando-se 5 animais saudáveis em cada grupo. Foram coletados os órgãos, sangue, urina e fezes entre os tempos pré-determinados (3, 5, 15, 30, 60, 120, 300, 1440 e 2880 minutos). O sangue foi adicionado em tubos heparinizados e, logo em seguida, foi centrifugado por 10 minutos, 1500 rpm a 4°C, para promover a separação do plasma e células. As amostras de urina e fezes foram coletadas no momento do sacrifício do animal, determinado o volume e adicionados aos tubos de contagem. A determinação da radioatividade foi realizada como descrito anteriormente.

Todos os procedimentos realizados nos ensaios foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Proc. No. 006/03).

4.12. Análise estatística

Os resultados e os parâmetros estimados foram descritos com a média e o desvio padrão. O teste t de *Student* foi aplicado para a análise estatística dos dados de biodistribuição. O nível de significância P<0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Produção e análise do radiotraçador

A avaliação das amostras de antimoniato de meglumina, irradiadas por nêutrons, indicou que as amostras irradiadas por maiores tempos (20 e 15 minutos) apresentaram mudanças severas na coloração, diferentemente do observado para as amostras irradiadas durante 7 minutos. A determinação da pureza radionuclídica, por meio de espectroscopia- γ , e os cálculos da atividade indicaram que nas amostras irradiadas durante 7 minutos, 33,2 MBq (0,897 mCi) de ^{122}Sb e 0,77 MBq (0,021 mCi) de ^{124}Sb foram obtidos ao final da irradiação, correspondendo a uma atividade específica de 273 MBq/g Sb (7,40 mCi/g) para o ^{122}Sb e 6,36 MBq/g Sb (0,172 mCi/g) para o ^{124}Sb ou 22,12 MBq $^{122}\text{Sb}/\text{mL}$ antimoniato de meglumina (0,598 mCi/mL) e 0,52 MBq $^{124}\text{Sb}/\text{mL}$ de antimoniato de meglumina (0,014 mCi/mL).

A avaliação da pureza radionuclídica das amostras de AMI, determinada por meio de espectroscopia- γ , mostrou alta pureza radionuclídica. Pode ser expressa de forma qualitativa através da identificação dos espectros de raios gama observados, correspondentes apenas aos picos de decaimento dos radioisótopos ^{122}Sb e ^{124}Sb (TAB. 07).

Devido a inexistência de antimônio radioativo disponível comercialmente e as lacunas no conhecimento de síntese do antimoniato de meglumina, verificou-se que a possibilidade mais viável de produção de radiotraçador de antimônio se deu pela irradiação com nêutrons das amostras de antimoniato de meglumina. Os radioisótopos produzidos apresentam um tempo de meia vida ($T_{1/2}$) bastante satisfatório para a realização dos estudos, onde o $T_{1/2}$ do ^{122}Sb é de 2,7 dias e do ^{124}Sb é 60,2 dias, favorecendo o desenvolvimento e realização dos estudos. Estes radioisótopos decaem pela emissão de raios gama e os principais picos de energia gama emitidos estão dentro de uma faixa de energia entre 564 a 723 keV, permitindo a utilização de um detector de radiação gama, para a identificação da biodistribuição do radiotraçador em diferentes sistemas biológicos.

TABELA 07 - Espectros de raios gama do ^{122}Sb e ^{124}Sb , determinados por meio de espectroscopia- γ , utilizando um detector de Ge hiper puro.

Radioisótopo	Meia vida ($T_{1/2}$)	Energia γ (keV)	Abundância (%)
^{122}Sb	2,7 dias	563,99	69,30
^{122}Sb	2,7 dias	692,94	3,78
^{124}Sb	60,2 dias	602,66	97,80
^{124}Sb	60,2 dias	645,77	7,38
^{124}Sb	60,2 dias	668,87	-
^{124}Sb	60,2 dias	709,26	1,35
^{124}Sb	60,2 dias	713,73	2,40
^{124}Sb	60,2 dias	722,75	10,76
^{124}Sb	60,2 dias	790,46	0,74
^{124}Sb	60,2 dias	968,31	1,80
^{124}Sb	60,2 dias	1045,15	1,84
^{124}Sb	60,2 dias	1368,43	2,62
^{124}Sb	60,2 dias	1691,51	47,34

Os radioisótopos ^{122}Sb e ^{124}Sb foram produzidos em quantidades adequadas quando a irradiação foi realizada relativamente numa posição de baixo fluxo de nêutrons térmicos (1×10^{13} n/cm².s) e num curto período de tempo (7 minutos). A maior vantagem deste procedimento deve-se a possibilidade da irradiação por nêutrons dos isótopos estáveis ^{121}Sb e ^{123}Sb presentes na formulação do antimoniato de meglumina, resultando na produção de radiotraçadores isotópicos com características físicas adequadas para a realização dos estudos de biodistribuição do antimônio pentavalente.

5.2. Avaliação química do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons

5.2.1. Espectroscopia UV-visível

A avaliação química do antimoniato de meglumina irradiado e não irradiado, por meio de espectroscopia UV-visível, mostrou que o fármaco nativo apresenta pico de absorvância apenas em regiões inferiores a 260 nm (FIG. 06). Por outro lado, amostras de AMI, irradiadas por maiores tempos (20 e 15

minutos), apresentaram mudanças severas na coloração e grandes alterações espectrofotométricas comparativamente ao AMN. O AMI durante 15 minutos apresentou dois picos de absorvância máximos nas regiões de 220 nm e 300 nm (FIG. 07 e FIG. 08).

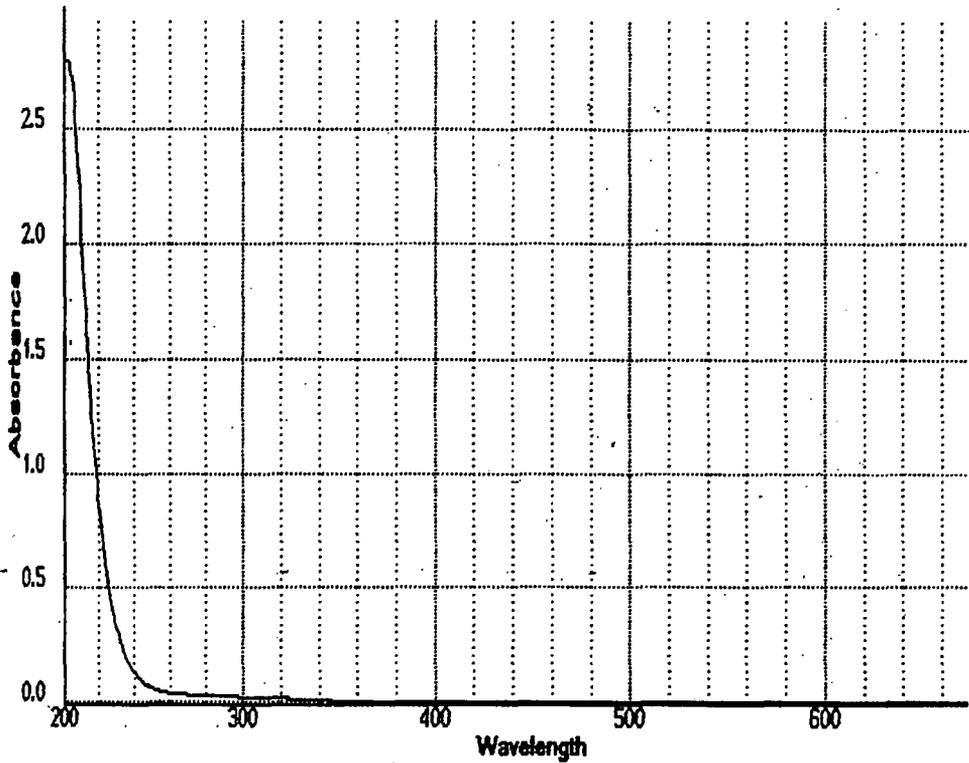


FIGURA 06 – Espectro UV-visível do AMN (162 µg Sb/mL) (referência: água bidestilada).

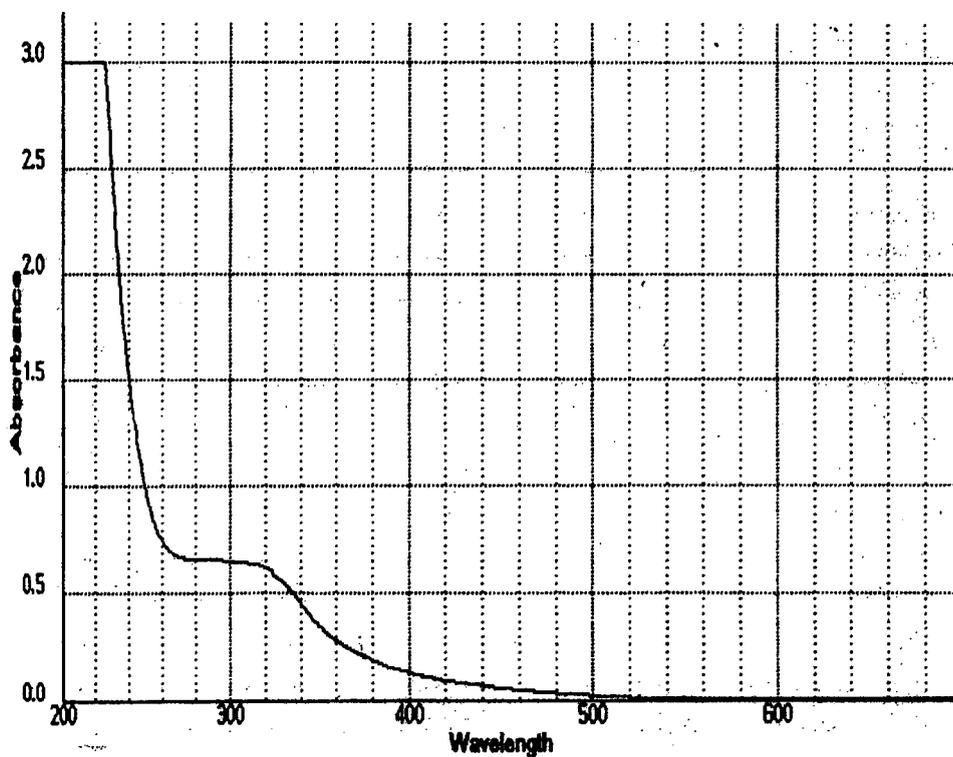


FIGURA 07 - Espectro UV-visível do AMI irradiado durante 15 minutos (162 µg Sb/mL) (referência: água bidestilada).

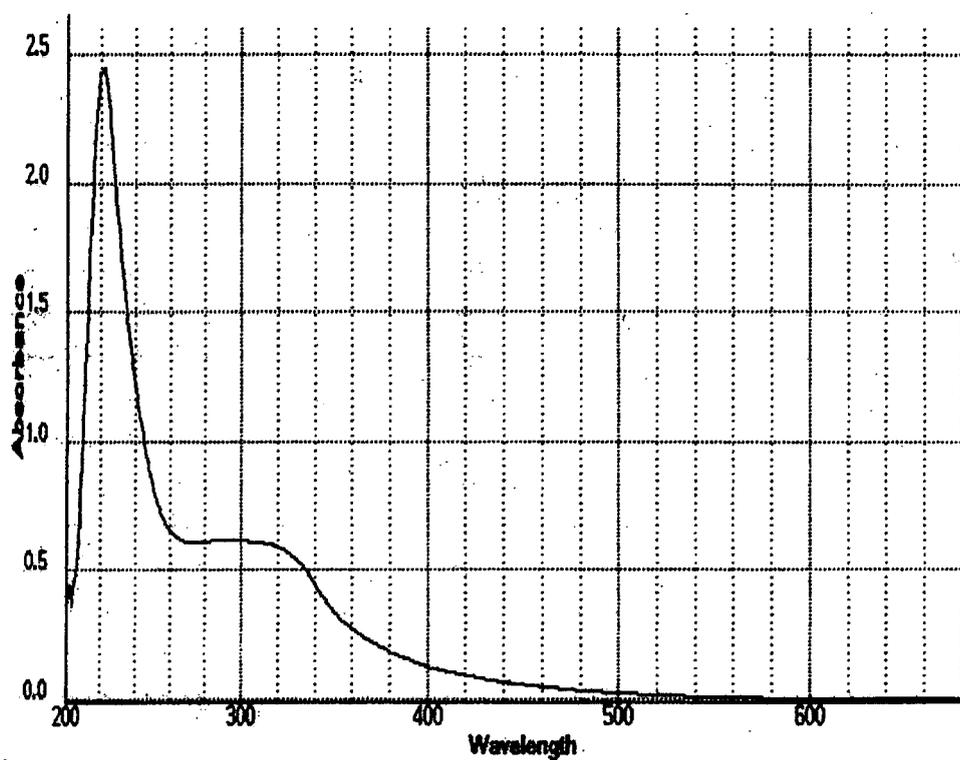


FIGURA 08 - Espectro UV-visível do AMI irradiado durante 15 minutos (162 µg Sb/mL), (referência: AMN).

Nas amostras irradiadas durante 7 minutos em relação ao AMN (FIG. 09) foi verificado um ligeiro pico de absorvância na região de 300 nm (FIG. 10 e FIG. 11). Desta forma, foi observado que quando o antimoniato de meglumina é irradiado por maior tempo (15 minutos) ocorre à formação de uma espécie química que absorve com maior intensidade na região de 220 nm e outra com menor intensidade que absorve na região de 300 nm. Por outro lado, quando o antimoniato de meglumina é irradiado em menor tempo (07 minutos) somente foi observado o aparecimento de uma espécie química que absorve com menor intensidade na região de 300 nm. Foi verificado num espectro UV-visível do Pentostam que os picos de absorvância exibidos na região 270-290 nm podem estar associados com a formação de um sistema aromático conjugado (Roberts *et al.*, 1993). Quando uma amostra apresenta um pico de baixa intensidade na região entre 250 a 360 nm, e uma menor absorção entre a região de 200 a 250 nm, usualmente indica uma transição para compostos carbonila. Desde que a absorção não ocorra em comprimentos de onda longos, um cromóforo simples ou não conjugado é indicado, geralmente um que contenha átomos de O, N ou S (Paiva *et al.*, 2001).

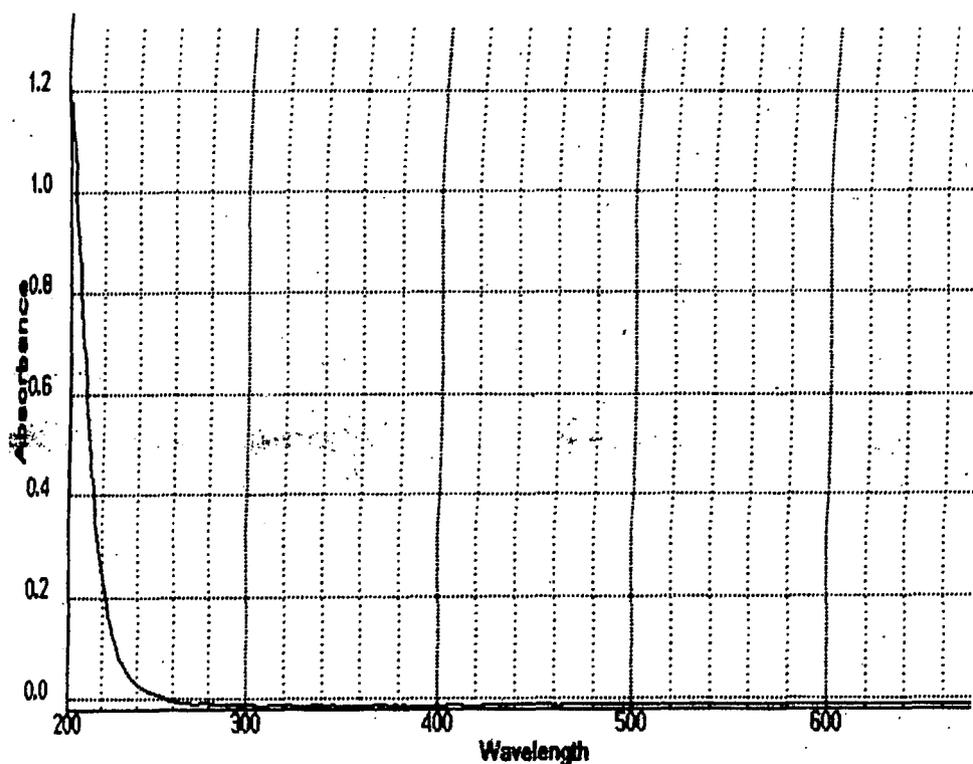


FIGURA 09 – Espectro UV-visível do AMN (40,5 µg Sb/mL) (referência: água bidestilada).

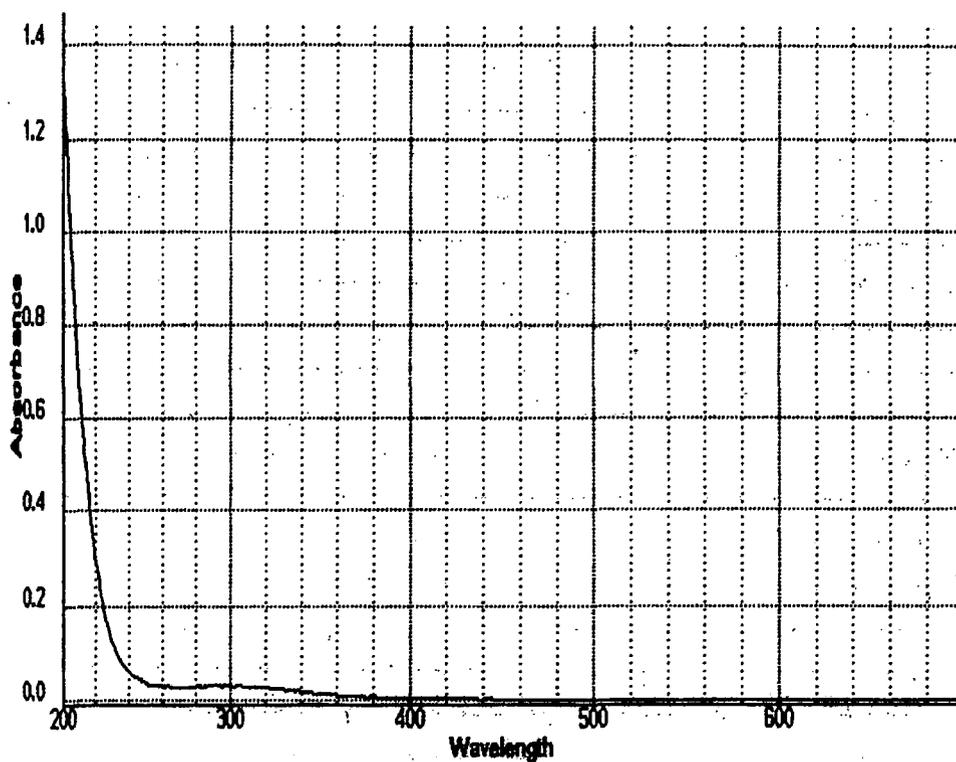


FIGURA 10 – Espectro UV-visível do AMI irradiado durante 7 minutos (162 µg Sb/mL), (referência: água bidestilada).

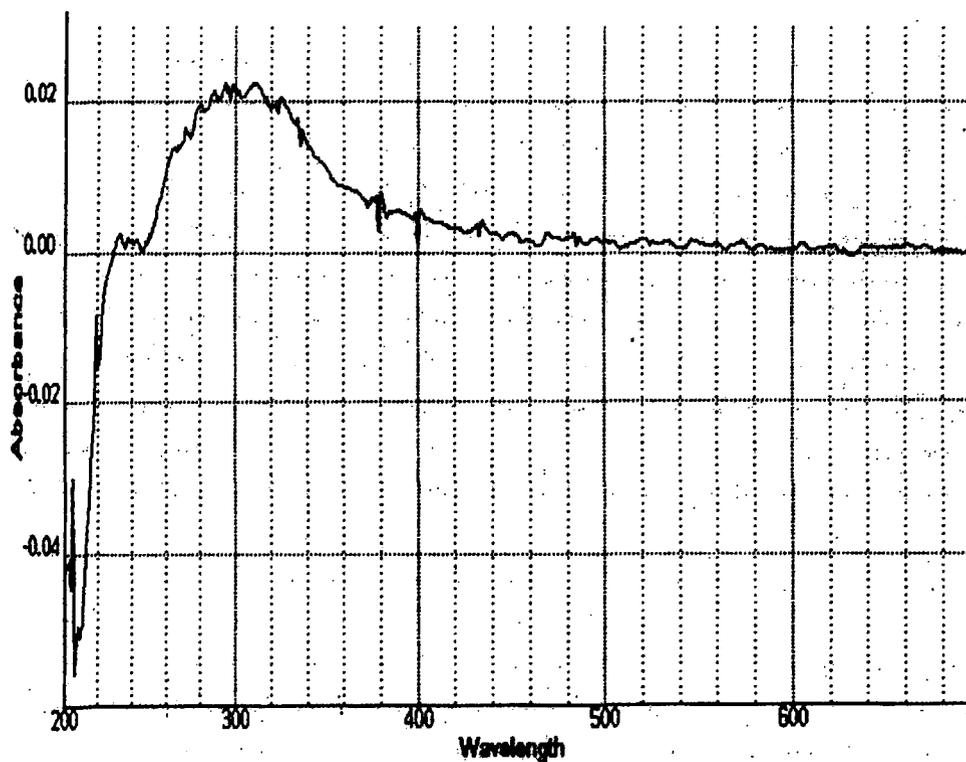


FIGURA 11 – Espectro UV-visível do AMI irradiado durante 7 minutos (162 µg Sb/mL) (referência: AMN).

O antimoniato de meglumina irradiado durante 7 minutos apresentou uma leve alteração colorimétrica, indicando uma provável polimerização da meglumina. Este composto é obtido sinteticamente por uma reação do antimônio pentavalente com a n-metil-d-meglumina e a extensa polimerização na composição do antimoniato de meglumina pode influenciar na farmacocinética de liberação da droga, na captação pelo sistema reticuloendotelial e na distribuição intracelular do antimônio pentavalente (Roberts *et al.*, 1998).

A polimerização da meglumina pode ser explicada pela reação de Maillard. Esta reação foi primeiramente descrita em 1912, por Louis Camille Maillard onde registrou que a reação entre aminas e açúcares redutores resulta em pigmentos marrons. Nesta reação uma amina reage com um açúcar redutor para formar uma amina glicosilada, e via rearranjo de Amadori forma um 1-amino-2-ceto açúcar resultando em corpos coloridos (Byrn *et al.*, 2001). A reação de Maillard é também conhecida como escurecimento não enzimático, esta sendo estudada à quase 100 anos, sem que se tenha chegado ao conhecimento completo do seu mecanismo. Tudo indica que a reação é muito complexa e que os produtos finais podem variar em função de diferentes caminhos. A exposição ao calor intensifica a polimerização de carboidratos, e conseqüentemente altera a coloração da amostra. Este efeito foi observado neste trabalho, onde amostras de antimoniato de meglumina nativo foram armazenadas em frascos tampados e sem tampa, expostas a diferentes condições de temperatura e luminosidade e foi verificado que as amostras expostas ao ar, solidificaram e todas sofreram alteração na coloração. O mesmo efeito também foi verificado quando o antimoniato de meglumina é exposto a condições inadequadas de temperatura e luminosidade, em más condições de armazenagem (Romero *et al.*, 1996).

5.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE é um método bastante difundido, com grande utilização em análises biomédicas, biotecnologias, bioquímicas e farmacológicas, incluindo aplicação na separação, identificação, purificação e quantificação de diferentes compostos. Desta forma, foi utilizada esta metodologia para a identificação das alterações observadas nas amostras de antimoniato de meglumina irradiadas por nêutrons.

Na avaliação cromatográfica do antimoniato de meglumina nativo e irradiado, por meio de CLAE acoplada ao espectrofotômetro UV-visível, foi observado na leitura em 250 nm (FIG. 12, FIG. 13 e FIG. 14) a presença de dois picos de absorvância principais, com tempos médios de retenção de aproximadamente 1,3 minuto e 5,8 minutos. Na leitura em 330 nm (FIG. 15, FIG. 16 e FIG. 17), foi observada a presença de apenas um pico de absorvância com tempo médio de retenção de 1,34 minuto.

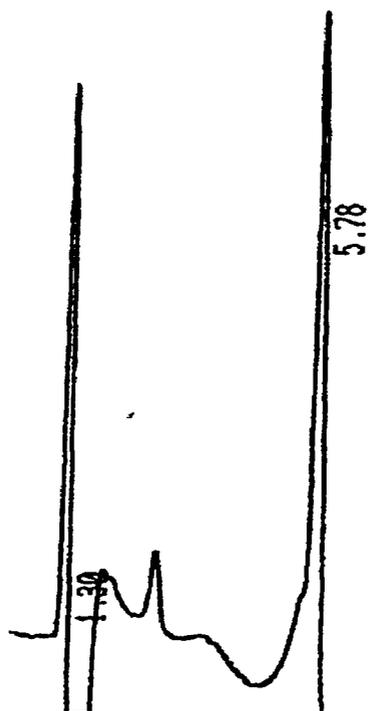


FIGURA 12 - Cromatograma de CLAE do AMN (1,62 μg Sb), monitorado em 250nm durante 10 minutos.

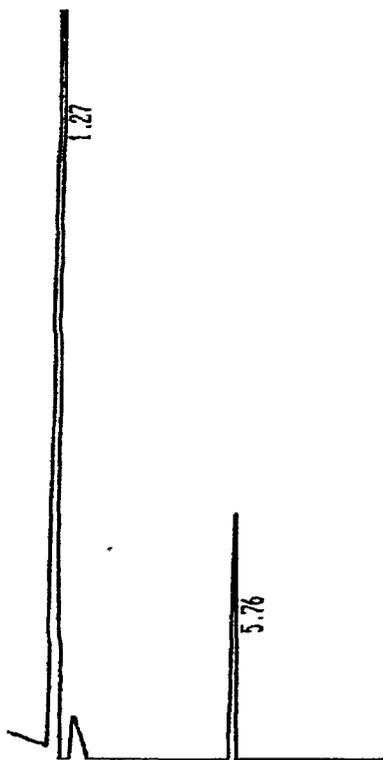


FIGURA 13 - Cromatograma de CLAE do AMI irradiado durante 7 minutos ($1,62 \mu\text{g}$ Sb), monitorado em 250 nm durante 10 minutos.

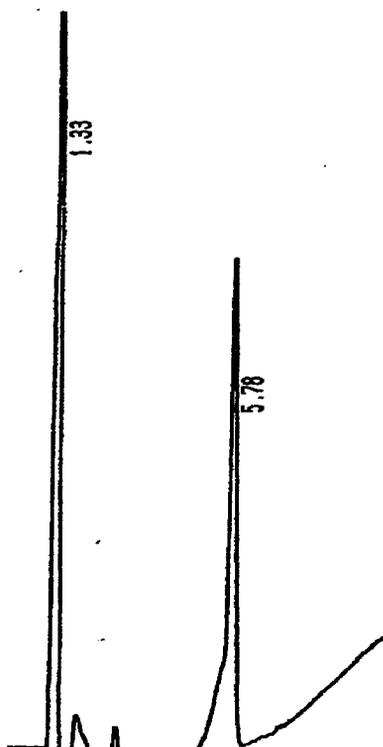


FIGURA 14 - Cromatograma de CLAE do AMI irradiado durante 15 minutos ($1,62 \mu\text{g}$ Sb), monitorado em 250 nm durante 10 minutos.

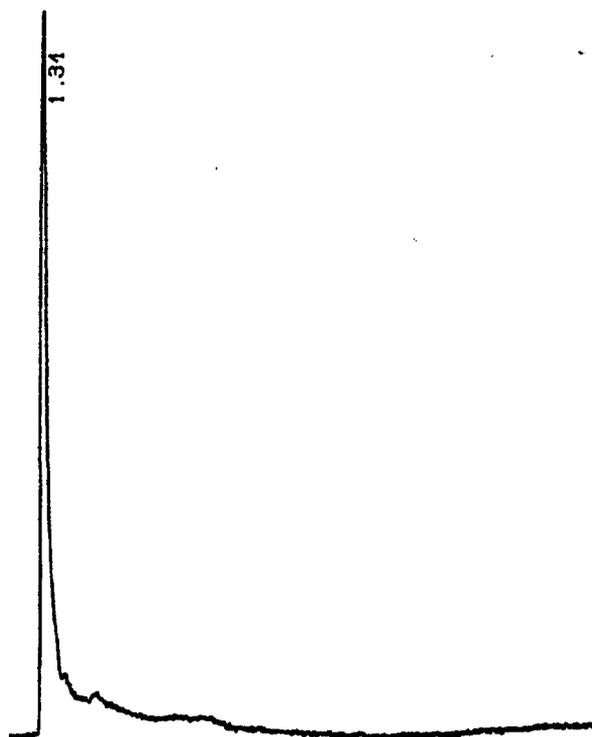


FIGURA 15 - Cromatograma de CLAE do AMN (1,62 μg Sb), monitorado em 330nm durante 20 minutos.



FIGURA 16 - Cromatograma de CLAE do AMI irradiado durante 7 minutos (1,62 μg Sb), monitorado em 330 nm durante 20 minutos.

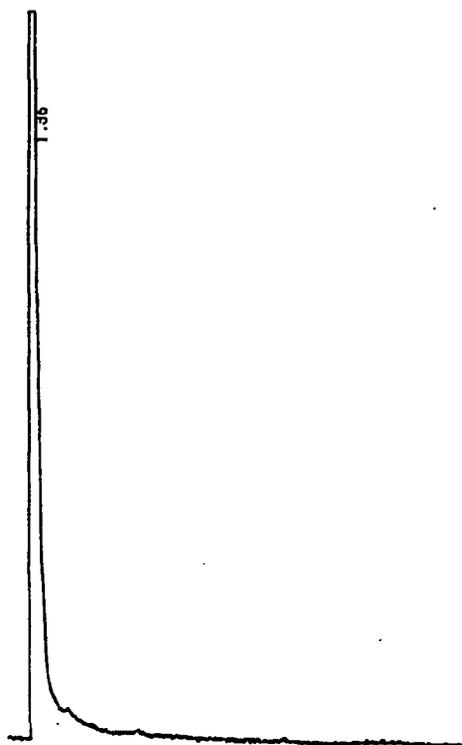


FIGURA 17 - Cromatograma de CLAE do AMI irradiado durante 15 minutos (1,62 μg Sb), monitorado em 330 nm durante 20 minutos.

A avaliação cromatográfica do antimoniato de meglumina foi realizada em dois comprimentos de onda 250 nm (TAB. 08) e 330 nm (TAB. 09). Na análise do AMN foi observado, na leitura em 250 nm (TAB. 08), que a área do primeiro pico de absorção referente ao tempo de retenção de 1,3 minuto é levemente maior que a área do segundo pico referente ao tempo de retenção de 5,8 minutos. Nas amostras de AMI foi verificado que a área do primeiro pico de absorção, referente ao tempo de retenção de 1,3 minuto, é bem maior que a área do segundo pico, referente ao tempo de retenção de 5,8 minutos. Comparativamente, a área do primeiro pico de absorção do AMI é maior que a do AMN, não tendo sido observada contudo, diferença significativa no segundo pico.

TABELA 08 – Cromatograma de CLAE do antimoniato de meglumina monitorado em 250 nm.

Amostra	Área (%) TR 1,3min	Área (%) TR 5,8min
AMN	119544 (57)	89254 (43)
AMI (7 min)	227922 (75)	73819 (25)
AMI (15 min)	259392 (75)	87431 (25)

TR= tempo de retenção; AMN= antimoniato de meglumina nativo; AMI= antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons

TABELA 09 – Cromatograma de CLAE do antimoniato de meglumina monitorado em 330 nm.

Amostra	Área (%) TR 1,3min
AMN	105326 (100)
AMI (7 min)	116376 (100)
AMI (15 min)	344756 (100)

TR= tempo de retenção; AMN= antimoniato de meglumina nativo; AMI= antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons

Como foi verificado no espectro UV-visível do antimoniato de meglumina irradiado durante 15 minutos (FIG. 08), há dois picos de absorvância na região de 220 e 300 nm, e na análise cromatográfica da mesma amostra foi confirmada a presença de moléculas que absorvem em ambos os comprimentos de onda, 250 e 330 nm (TAB. 08 e TAB. 09) que apresentam maior área e pico de absorvância no primeiro tempo de retenção de 1,3 minutos comparativamente as amostras de antimoniato de meglumina nativo e de antimoniato de meglumina irradiado durante 07 minutos. O espectro UV-visível do antimoniato de meglumina irradiado durante 07 minutos (FIG. 11) apresentou um ligeiro pico de absorvância em 300nm, e na análise cromatográfica em 330nm (TAB. 09) foi verificada uma leve diferença de absorvância em relação ao AMN, e quando na leitura em 250 nm (TAB. 08) apresentou uma maior área de absorvância que o AMN. Assim, quanto maior o tempo de irradiação do antimoniato de meglumina, maior é a área de absorvância das espécies químicas que apresentam tempo de retenção em 1,3 minuto e absorvem na região de 250-330 nm.

Possivelmente, após a irradiação ocorre a formação de novas espécies químicas, ou a quebra da molécula nativa, apresentando-se como produtos de

decomposição e ou impurezas da amostra, que absorvem no mesmo comprimento de onda e apresentam mesmo tempo de retenção. Essas espécies químicas absorvem com maior intensidade na região de comprimento de onda de 330 nm, não apresentam muita interação com a coluna, são moléculas pequenas, com baixa polaridade e também são mais hidrofílicas.

Foi verificado que o cloreto de sódio (solução salina) absorve na região de 189,7-291,8 nm, apresentando dois picos de absorvância em 235 e 260 nm (Silver *et al.*, 1986). Desta forma, deve ser salientado que as amostras analisadas em CLAE foram diluídas em solução salina e assim, a área de absorvância descrita na região de 250nm apresenta participação da absorvância do cloreto de sódio.

Como foi verificado no espectro UV-visível, o antimoniato de meglumina nativo (FIG. 06) absorve em comprimento de onda inferior a 260 nm. Após a sua análise cromatográfica, foi verificado que possivelmente absorve no comprimento de onda de 250 nm e apresenta tempo de retenção em 5,8 minutos, sofrendo pouca ou mesmo nenhuma alteração após a irradiação. São moléculas mais polares, que ficam retidas por maior tempo na fase estacionária e apresentam menor afinidade pelo solvente.

Na análise cromatográfica das amostras irradiadas, coletadas e analisadas em um detector de radiação gama tipo contador de poço, foi verificado que o antimônio trivalente irradiado por nêutrons durante 7 minutos - a forma inorgânica livre do antimônio (TAB. 10 e FIG. 17) apresenta a maior atividade no tempo de retenção entre 10 e 12 minutos, correspondendo a aproximadamente 33 % de todo o antimônio presente na amostra. O mesmo procedimento foi realizado com amostras de antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons durante 7 minutos - forma orgânica complexada de antimônio (TAB. 11, FIG. 19) e também foi verificada a maior atividade no tempo de retenção entre 10 e 12 minutos, correspondendo a aproximadamente 31 % de todo o antimônio presente na amostra, sendo esta região sugerida como a região de maior concentração do fármaco.

TABELA 10 - Contagem da amostra de antimônio trivalente irradiado durante 7 minutos ($81 \mu\text{g Sb}^{3+}$), após CLAE.

Amostra	Tempo (min)	Contagem Final	Absorvância
1	0-2	20	0,100
2	2-4	15	0,001
3	4-6	62	0,001
4	6-8	71	0
5	8-10	1064	0
6	10-12	1764	0
7	12-14	1216	0
8	14-16	720	0
9	16-18	414	0

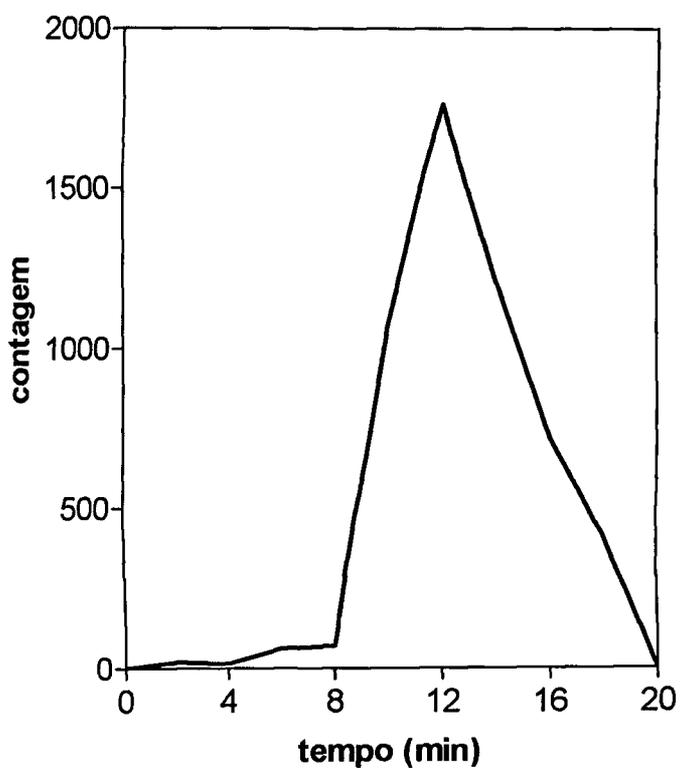


FIGURA 18 - Contagem da amostra de antimônio trivalente irradiado durante 7 minutos ($81 \mu\text{g Sb}^{3+}$), após CLAE.

TABELA 11 - Contagem da amostra de antimoniato de meglumina irradiado durante 7 minutos ($3,24 \mu\text{g Sb}^{5+}$), após CLAE.

Amostra	Tempo (min)	Contagem Final	Absorvância
1	0-2	27	2,000
2	2-4	21	0,070
3	4-6	45	0,030
4	6-8	141	0,020
5	8-10	4648	0,015
6	10-12	10161	0,013
7	12-14	7865	0,011
8	14-16	5148	0,010
9	16-18	3057	0,009
10	18-20	2109	0,009

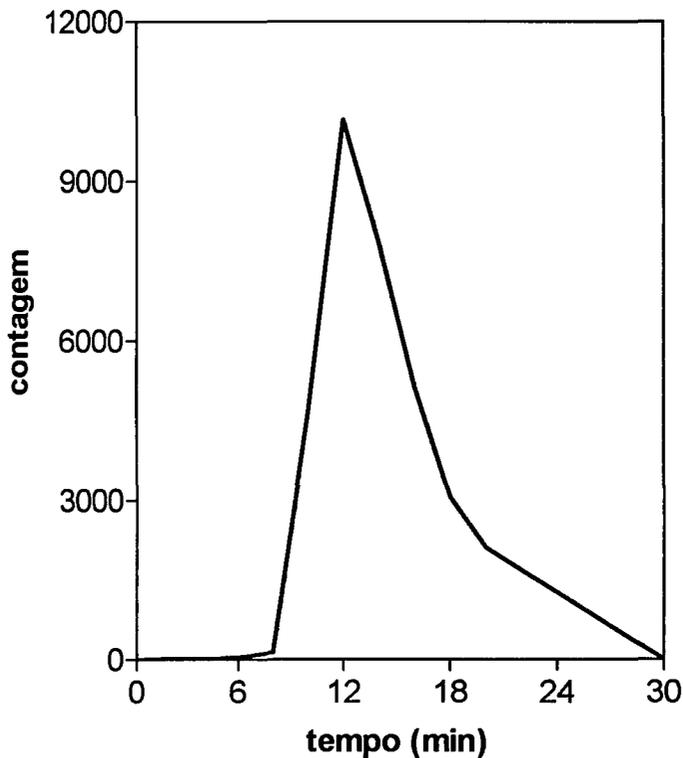


FIGURA 19 – Contagem da amostra de antimoniato de meglumina irradiado durante 7 minutos ($3,24 \mu\text{g Sb}^{5+}$), após CLAE.

Após a irradiação por nêutrons do antimoniato de meglumina, podem ter ocorrido modificações na molécula, visto que a água e soluções aquosas podem sofrer alterações químicas pela absorção da radiação ionizante e formar espécies reativas - moléculas que contêm elétrons desapareados como o $H\cdot$ agente redutor e o $OH\cdot$ agente oxidante. Além de interagir com as moléculas em solução, os radicais podem sofrer recombinação, originando outros componentes como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, quando os radicais hidroxila ($OH\cdot$) combinam-se com moléculas orgânicas, formam-se radicais livres orgânicos. As moléculas e radicais livres originados são denominados de "produtos primários da radiólise da água": $H\cdot$, $OH\cdot$, e^-_{aq} , H_2 , H_2O_2 e H_3O^+ . Este efeito corresponde a cerca de 70 % do efeito biológico produzido pelas radiações e sua maior ocorrência, deve-se ao fato de a água ocupar grande parte da composição celular (Michaels & Hunt, 1978). Esses fatores podem provocar a redução do antimônio pentavalente para sua forma mais tóxica trivalente.

Foram realizados outros experimentos para esclarecer alguns dados sobre o antimoniato de meglumina como cromatografia ascendente em papel, microteste com vermelho de bromopirogalol para especificação de antimônio trivalente e pentavalente (Rath *et al.*, 1997) e determinação de antimônio pentavalente com reagente rodamina B (Fries & Getrost, 1977), porém estes ensaios não apresentaram resultados conclusivos, motivo pelo qual não estão descritos aqui com detalhes. Desta forma, dados do produto nativo e das possíveis alterações ocorridas no antimoniato de meglumina após o processo de irradiação não foram totalmente esclarecidas, devido principalmente a falta de conhecimento da estrutura da molécula, apesar de sua utilização por mais de 60 anos.

O antimoniato de meglumina é um sólido amorfo susceptível a degradação térmica e sob o calor, transforma-se rapidamente em um sal não volátil, estas propriedades tem limitado sua caracterização estrutural (Demicheli *et al.*, 2003). Acredita-se que o antimoniato de meglumina contenha um gluconato polar ou um grupo funcional derivado do gluconato. Através de estudos do antimoniato de meglumina utilizando espectrometria de massa de bombardeamento com átomos rápidos (*FAB-MS*) sugeriu-se uma estrutura na qual duas moléculas de n-metil-d-glucamina estão coordenadas com um único átomo de antimônio em uma geometria simétrica (Headley *et al.*, 1995). Por meio

de FAB-MS e espectrometria de massa com ionização de íon positivo por "electrospray" (ESI (+) MS) sugeriu-se que o antimoniato de meglumina consiste de uma mistura de componentes que existem em equilíbrio em solução aquosa, com fórmulas gerais: $(\text{NMG-Sb})_n - \text{NMG}$ (maiores componentes; massa molecular= 507, 820, 1132 e 1444) e $(\text{NMG-Sb})_n$ (menores componentes; massa molecular= 314 e 627), onde NMG representa n-metil-d-glucamina e Sb representa antimônio (Roberts *et al.*, 1998). As ligações coordenadas entre o antimônio e as hidroxilas das moléculas de n-metil-d-glucamina são relativamente lábeis, visto que a osmolaridade aumenta quando a solução de antimoniato de meglumina é diluída, sugerindo hidrólise das espécies menos complexas (Roberts *et al.*, 1998).

Apesar destes recentes progressos na caracterização estrutural do antimoniato de meglumina usando técnicas de espectrometria de massa, a estrutura exata e local de ligação entre o antimônio e a molécula de n-metil-d-glucamina ainda necessitam de futuras investigações. Além do que, pouco se sabe a respeito dos métodos usados na indústria para a preparação dos organoantimoniais pentavalentes e os procedimentos descritos na literatura são geralmente extensos e relativamente complexos (Demicheli *et al.*, 2003).

5.3. Avaliação da atividade biológica *in vitro* do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons

5.3.1. Determinação da Concentração Efetiva 50 % em formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*

Na avaliação da atividade antileishmania dos compostos em promastigotas de *L. (L.) chagasi*, foi observado que a Concentração Efetiva 50 % (CE_{50}) do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons durante 07 minutos é 20,94 mg Sb/mL (Intervalo de Confiança 95 % - $\text{IC}_{95} \% = 16,73 - 26,21$ mg/mL) e para o antimoniato de meglumina nativo a CE_{50} é 41,73 mg Sb/mL ($\text{IC}_{95} \% = 32,67 - 53,30$ mg/mL) (TAB. 12, FIG. 20). Foi verificado que o antimoniato de meglumina irradiado apresentou-se duas vezes mais eficiente que o antimoniato de meglumina nativo em promastigotas de *L. (L.) chagasi*. Este fato pode estar relacionado com a possível presença de antimônio trivalente no produto, possivelmente provindo da conversão de antimônio pentavalente após o processo

de irradiação. Também foi verificada a presença de contaminantes de antimônio trivalente em ampolas de drogas antimoniais pentavalentes, como Glucantime, Pentostam e Estibonato (Franco *et al.*, 1995).

TABELA 12 - Avaliação da atividade dos compostos em formas promastigotas de *L.(L.) chagasi*. A viabilidade foi verificada pelo método do MTT. CE_{50} = Concentração Efetiva 50%; IC 95%= Intervalo de Confiança 95%; r= coeficiente de correlação linear, AMN= antimoniato de meglumina nativo, AMI= antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons durante 07 minutos (n=2).

COMPOSTO	CE_{50} (mg/mL)	IC 95% (mg/mL)	r
AMN	41,73	32,67 – 53,30	0,9911
AMI	20,94	16,63 – 26,21	0,9960

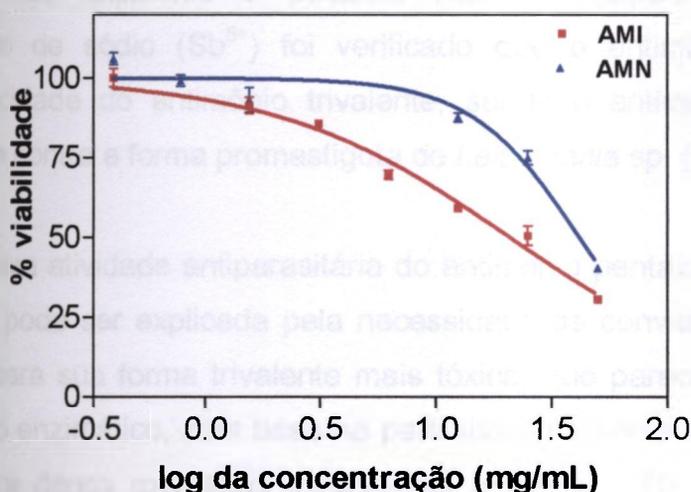


FIGURA 20 - Determinação da CE_{50} em promastigotas de *L. (L.) chagasi*. A viabilidade foi verificada pelo método de MTT. AMN= antimoniato de meglumina nativo, AMI= antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons durante 07 minutos (n=2).

Preparações de antimônio trivalente e pentavalente livres e complexadas em um polissacarídeo reconhecido por receptores de manose em macrófagos – manan, foram incubadas com formas promastigotas e amastigotas onde verificaram que as preparações de antimônio trivalente são mais ativas que as preparações de antimônio pentavalente contra ambas as formas amastigotas e promastigotas. Também observaram que as preparações de antimônio

pentavalente são inerentemente menos tóxicas nas formas promastigotas (Roberts *et al.*, 1995). Foi observado que o tartarato de antimônio e potássio (Sb^{3+}) é mais eficiente que o estibogluconato de sódio (Sb^{5+}) tanto em formas promastigotas como em formas amastigotas (Roberts *et al.*, 1993), esses dados são consistentes com a hipótese de redução *in vivo* do antimônio pentavalente para sua forma trivalente ativa.

Neste trabalho, foi verificado que tanto o antimoniato de meglumina irradiado como o nativo apresentam baixa atividade antiparasitária contra as formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*. A baixa atividade do antimônio pentavalente nas formas promastigotas também foi mostrado por Roberts e colaboradores (1993) onde verificaram que frações do estibogluconato de sódio são mais eficientes contra formas amastigotas de *L. panamensis* do que em formas promastigotas. Quando promastigotas de *L. donovani* foram pré-tratadas com tartarato de antimônio e potássio (Sb^{3+}) e depois incubadas com estibogluconato de sódio (Sb^{5+}) foi verificado que o antimônio pentavalente reverte à toxicidade do antimônio trivalente, sendo o antimônio pentavalente pouco eficiente contra a forma promastigota de *Leishmania* sp. (Shaked-Mishan *et al.*, 2001).

A baixa atividade antiparasitária do antimônio pentavalente nas formas promastigotas pode ser explicada pela necessidade de conversão do antimônio pentavalente para sua forma trivalente mais tóxica, que parece ser dependente um mecanismo enzimático, com base na participação de enzimas do sistema de proteção contra danos oxidativos tripanotiona redutase (TR), um tiol de baixa massa molecular, presente em quantidade muito maior na forma intracelular (amastigota) do parasita. Estas enzimas vêm sendo descritas como fundamentais no processo de bioconversão do antimônio pentavalente para a forma trivalente (Yan *et al.*, 2003). Tem sido demonstrado que as próprias enzimas antioxidantes do hospedeiro, como a glutathiona redutase (GR) também contribuem no processo de bioconversão do antimônio, porém de forma menos intensa quando comparada com as enzimas da *Leishmania* sp. (Frézard *et al.*, 2001).

5.3.2. Determinação da citotoxicidade em células RAW 264.7

Na avaliação da citotoxicidade em células macrofágicas murinas, – RAW 264.7, foi verificado que a CE_{50} do antimoniato de meglumina nativo é 3,56 mg

Sb/mL (IC95 %= 2,37 – 5,35 mg/mL) e para o antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons durante 07 minutos a CE_{50} é 1,43 mg Sb /mL (IC95 %= 0,99 – 2,07 mg/mL) (TAB. 13, FIG. 21). Com base nesses resultados, foi verificado que o antimoniato de meglumina irradiado apresentou-se duas vezes mais citotóxico que o antimoniato de meglumina nativo em células de mamíferos. Este fato pode estar relacionado com a possível presença de antimônio trivalente no produto, possivelmente provindo da conversão de antimônio pentavalente após o processo de irradiação.

TABELA 13 - Citotoxicidade dos compostos em células RAW 264.7. A viabilidade foi verificada pelo método do MTT. CE_{50} = Concentração Efetiva 50%; IC 95% = Intervalo de Confiança 95%; r= coeficiente de correlação linear, AMN= antimoniato de meglumina nativo, AMI= antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons durante 07 minutos (n=2).

COMPOSTO	CE_{50} (mg/mL)	IC 95% (mg/mL)	r
AMN	3,56	2,37 – 5,35	0,9905
AMI	1,43	0,99 – 2,07	0,9872

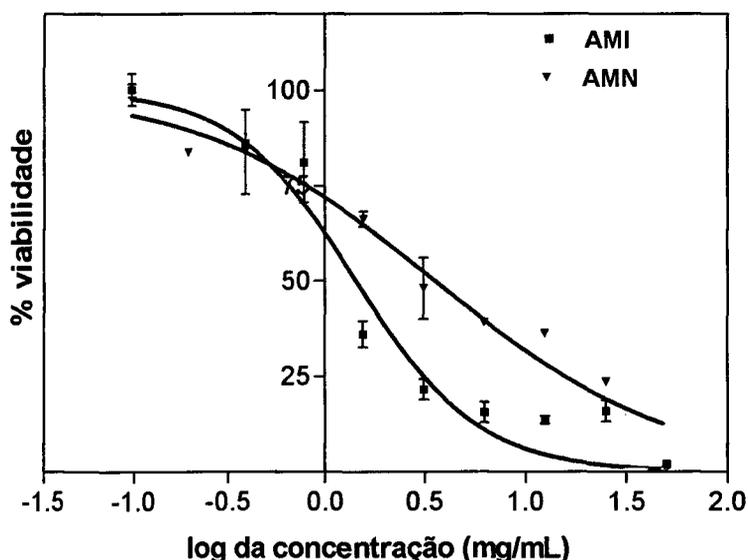


FIGURA 21 - Determinação da CE_{50} em células macrofágicas murinas (RAW 264.7). A viabilidade foi verificada pelo método de MTT. AMN= antimoniato de meglumina nativo, AMI= antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons durante 07 minutos (n=2).

Os antimoniais pentavalentes são 10 vezes menos tóxicos para células de mamíferos que os antimoniais trivalentes. Do mesmo modo, as drogas contendo antimoniais pentavalentes são menos tóxicas para o homem e apresentam um alto índice terapêutico que as preparações orgânicas de antimônio trivalente (Roberts *et al.*, 1995).

5.3.3. Determinação da Concentração Efetiva 50 % em macrófagos peritoneais infectados com *L. (L.) chagasi*

A determinação da CE_{50} dos compostos em macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. (L.) chagasi* é mostrada na FIG. 22.

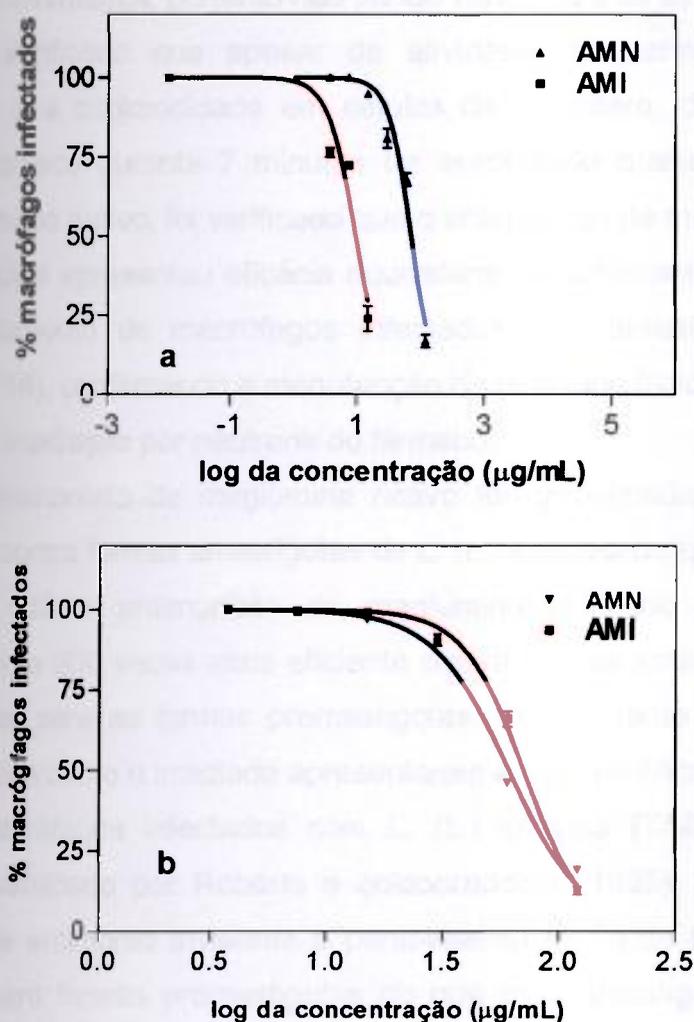


FIGURA 22 - Determinação da CE_{50} em macrófagos peritoneais infectados com *L. (L.) chagasi* e tratados por um período de 96 horas. AMN= antimoniato de meglumina nativo, AMI= antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons, a = AMN 15 min, b = AMI 7 min, (n=2).

Verificou-se que o antimoniato de meglumina nativo apresentou uma CE_{50} de 61,14 $\mu\text{g Sb/mL}$ ($IC_{95} \% = 52,68 - 70,96 \mu\text{g/mL}$), o antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons durante 15 minutos resultou em uma CE_{50} de 9,69 $\mu\text{g Sb/mL}$ ($IC_{95} \% = 4,72 - 19,90 \mu\text{g/mL}$) e o antimoniato de meglumina irradiado por 07 minutos resultou em uma CE_{50} de 70,62 $\mu\text{g Sb/mL}$ ($IC_{95} \% = 64,22 - 77,67 \mu\text{g/mL}$) (FIG. 22).

Com base nestes resultados, foi verificado que o antimoniato de meglumina irradiado durante 15 minutos apresentou uma atividade antileishmania cerca de 7 vezes maior que o antimoniato meglumina nativo ou mesmo em relação ao antimoniato de meglumina irradiado por 7 minutos, sendo também citotóxico aos macrófagos, portanto não sendo viável para os estudos seguintes.

Foi verificado que apesar da atividade antileishmania em formas promastigotas e a citotoxicidade em células de mamífero, do antimoniato de meglumina irradiado durante 7 minutos ter aumentado quase duas vezes em relação ao fármaco nativo, foi verificado que o antimoniato de meglumina irradiado durante 7 minutos apresentou eficácia equivalente ao antimoniato de meglumina nativo no tratamento de macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) chagasi* (TAB. 14), confirmando a manutenção da atividade biológica mesmo após o processo de irradiação por nêutrons do fármaco.

O antimoniato de meglumina nativo foi aproximadamente 680 vezes mais eficiente contra formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* do que para as formas promastigotas. Já o antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons foi aproximadamente 300 vezes mais eficiente contra formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* do que para as formas promastigotas. Porém, tanto o antimoniato de meglumina nativo como o irradiado apresentaram a mesma eficácia no tratamento *in vitro* de macrófagos infectados com *L. (L.) chagasi* (TAB. 14). O mesmo resultado foi verificado por Roberts e colaboradores (1995), onde a CE_{50} das formulações de antimônio trivalente e pentavalente foram de 60 a mais de 600 vezes maior para formas promastigotas do que para amastigotas, sendo estas formulações mais eficientes contra as formas amastigotas.

TABELA 14 - Efetividade do antimoniato de meglumina em promastigotas de *L. (L.) chagasi*, em macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) chagasi* e em células de mamífero. AMI= antimoniato de meglumina irradiado (fluxo de n térmicos de $1 \times 10^{13} \text{n/cm}^2 \cdot \text{s}$, por 7 minutos); AMN= antimoniato de meglumina nativo. CE 50% (IC95%), (n=2).

COMPOSTOS	AMI	AMN
CÉLULA		
Promastigota de <i>L. (L.) chagasi</i>	20,94 mg Sb/mL (16,73 – 26,2)	41,73 mg Sb/mL (32,67 – 53,30)
Amastigota de <i>L. (L.) chagasi</i>	70,62 µg Sb/mL (64,22 – 77,67)	61,14 µg Sb/mL (52,68 - 70,96)
Célula de mamífero RAW 264.7	1,43 mg Sb/mL (0,99 – 2,07)	3,56 mg Sb/mL (2,37 – 5,35)

Tem sido sugerido que a atividade antileishmania do antimônio pentavalente é dependente de sua redução para antimônio trivalente dentro do parasito. Devido a maior susceptibilidade da forma amastigota intracelular do que a forma promastigota ao antimônio pentavalente, sugere-se que a redução da droga ocorra dentro da forma amastigota intracelular (Yan *et al.*, 2003).

Foi verificado que a cisteína e o complexo cisteína-glicina – tióis predominantes nos compartimentos acídicos das células de mamíferos e, a tripanotiona – principal tiol intracelular presente em *Leishmania* sp., promovem a redução do antimônio e a taxa inicial de redução é maior na presença destes tióis do que na presença de glutatona - tiol predominante no citosol das células de mamíferos. Esta reação ocorre tanto em pH 5 como em pH 7, mas é favorecida em pH ácido, suportando a hipótese de que o antimônio pentavalente é reduzido *in vivo* pela tripanotiona dentro do parasito e pela cisteína ou cisteína-glicina dentro da célula hospedeira (Santos Ferreira *et al.*, 2003). Também foi verificado que a redução do antimônio pentavalente é mais lenta quando o antimônio está na sua forma complexada (antimoniato de meglumina) do que quando está na forma não complexada, indicando que a complexação do antimônio pentavalente tende a diminuir sua velocidade de redução (Santos Ferreira *et al.*, 2003).

Outros estudos mostraram que a redução do antimônio pentavalente ocorre mais rapidamente em pH baixo, aproximadamente ao do vacúolo

parasitóforo. Esta atividade não ocorre em promastigotas de *Leishmania*, somente na forma amastigota, devido à redução e ativação do antimônio pentavalente ser mediada por enzimas do parasito nesta fase de seu ciclo de vida. Assim, a perda da atividade redutora ou perda da ativação pode constituir um mecanismo pelo qual o parasita torna-se resistente às drogas antimoniais (Denton *et al.*, 2004).

Para ser ativo contra *Leishmania*, o antimônio pentavalente tem que entrar na célula hospedeira, atravessar a membrana fagolisossomal, atingir a amastigota intracelular e ser convertido para forma trivalente mais tóxica. Os detalhes do mecanismo de ativação e do local exato da conversão ainda não estão claros, mas é provável que a redução ocorra no parasito e também nos macrófagos hospedeiros, sendo possível que mais de um mecanismo seja responsável pela ativação da droga (Ouellette *et al.*, 2004).

Acredita-se que o antimoniato de meglumina possa servir como um sistema passivo de entrega do antimônio pentavalente para o sistema reticuloendotelial, no qual a espécie ativa - antimônio trivalente é gerada *in situ* (Serenio *et al.*, 1998). Sugere-se que o antimônio pentavalente pode matar o parasita por mecanismos diretos e indiretos, e a resposta imune do hospedeiro está relacionada com a atividade do antimônio pentavalente (Ouellette *et al.*, 2004).

5.4. Avaliação *in vivo* do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons

A efetividade do antimoniato de meglumina irradiado durante 07 minutos foi comparada com o antimoniato de meglumina nativo em modelos experimentais de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) chagasi*, onde foi observado que após o tratamento não houve diferença significativa entre os dois compostos ($P > 0,05$) (TAB. 15).

Foi verificado que ambos os compostos provocaram a redução de aproximadamente 20 % da infecção de amastigotas no fígado de camundongos, em relação ao tratamento com solução salina, mas a redução da infecção no baço não foi muito evidente. Em outros estudos, utilizando camundongos infectados com *L. donovani* e tratados com Pentostam, foram verificados altos níveis de antimônio no fígado, provocando a supressão da infecção neste órgão. Entretanto, o mesmo não foi observado em outros dois locais de infecção; como baço e medula óssea, órgãos onde os antimoniais pentavalentes apresentam

pouco efeito antiparasitário (Carter *et al.*, 1988) e onde o parasita aparentemente é menos susceptível à terapia antimonial (Collins *et al.*, 1992).

TABELA 15 - Efetividade do antimoniato de meglumina em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) chagasi*, tratados após 7 dias de infecção, 50 mg Sb⁵⁺/kg, por 4 dias. AMI= antimoniato de meglumina irradiado durante 07 minutos; AMN= antimoniato de meglumina nativo; Controle= solução salina. LDU= Unidades Leishman- Donovan (LDU± desvio padrão, massa g. ± desvio padrão) (n= 4).

Órgão	AMI	AMN	Controle
Baço (g)	0,130 ± 0,018	0,150 ± 0,019	0,136 ± 0,005
LDU	43,57 ± 29,38	32,17 ± 19,20	41,69 ± 8,60
Fígado (g)	1,085 ± 0,104	1,134 ± 0,137	1,104 ± 0,110
LDU	2555 ± 1065	2696 ± 1472	3331 ± 1745

5.5. Estudo de imagem

Os estudos de quantificação de compostos radiomarcados *in vivo* em modelos animais têm provocado melhorias no desenvolvimento das metodologias nucleares, como avanços na tomografia computadorizada por emissão de fótons simples (SPECT) e na tomografia por emissão de pósitrons (PET) (Ploux & Mastrippolito, 1999).

O uso de sistema de geração de imagem permite a realização de estudos de biodistribuição de compostos radiomarcados, podendo ser feitas medidas em diferentes tempos, em órgãos específicos ou no corpo inteiro, usando animais vivos e também o ser humano. Cabe ressaltar que a realização de imagens não invasivas requerem a utilização de poucos animais para os estudos farmacocinéticos de drogas, sendo mais eficientes e mais baratos (Saleem *et al.*, 2000).

Neste trabalho, os estudos não invasivos, pela geração de imagens dinâmicas, utilizando uma gama câmara, não resultaram em imagens com boa resolução (FIG. 23), devido aos radioisótopos utilizados - ¹²²Sb e ¹²⁴Sb - serem emissores de radiação de alta energia (aproximadamente 564 keV- energia gama recomendada para os cálculos de atividade para o ¹²²Sb), e a eficiência da gama câmara ser baixa nesta região. Assim seria necessária a utilização de colimadores para se obter uma imagem adequada. Devido à impossibilidade de aquisição

destes colimadores no momento do estudo, foram realizados os estudos invasivos, avaliando a biodistribuição em um contador gama tipo poço.

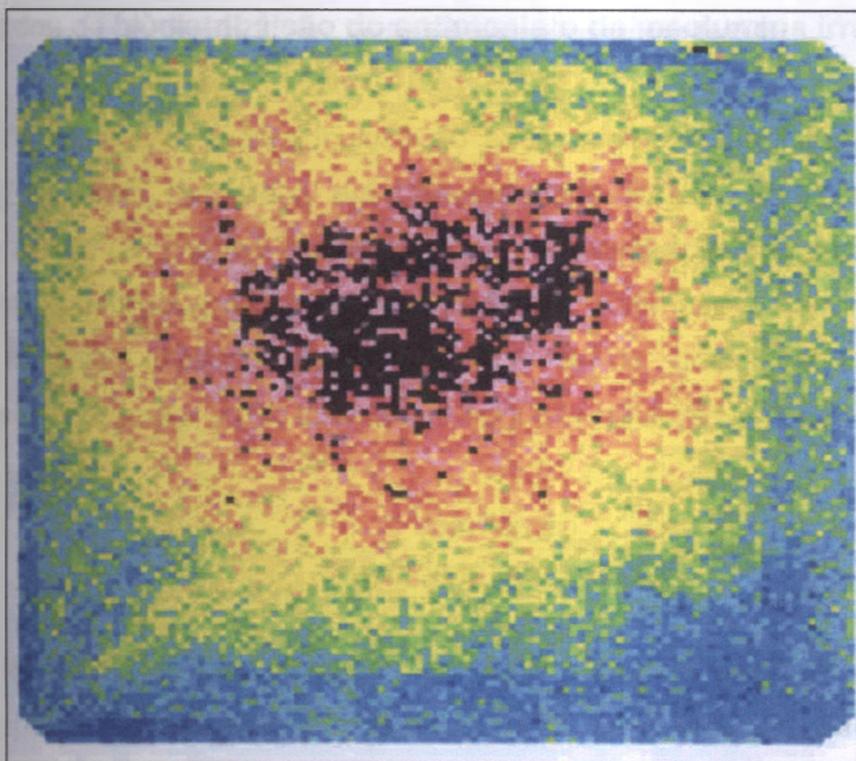


FIGURA 23 - Imagem dinâmica em uma gama câmara, de um hamster sadio, após 2 horas da administração via intramuscular do antimoniato de meglumina irradiado. Contagem: 317 segundos/700000 cpm.

5.6. Estudo de biodistribuição

Devido à impossibilidade de aquisição de imagens dinâmicas não invasivas, foram realizados os estudos em camundongos, realizando uma análise invasiva, pela retirada de todos os órgãos de interesse e verificando a biodistribuição tecidual e sérica pela contagem da radiação em um contador gama tipo poço. Materiais cintiladores como o NaI (TI) (iodeto de sódio ativado com tálio) são associados a detectores de luz, tais como tubos fotomultiplicadores ou fotodiodos, que convertem o sinal luminoso em sinal elétrico. Algumas vantagens oferecidas por este método de análise podem ser salientadas, por ser um detector relativamente barato, de fácil manutenção e utilização (não requer instalações de baixa temperatura). Sendo um detector compacto e relativamente denso, apresenta também uma eficiência superior à maioria dos outros detectores de

radiação gama, sendo por isso indicado para trabalhar com fontes radioativas não muito intensas.

5.6.1. Estudos de biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado por nêutrons

Os estudos de biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado (APÊNDICES) foram realizados em camundongos BALB/c fêmeas sadias e infectadas com *L. (L.) chagasi* e determinados pela avaliação dos órgãos em um contador gama tipo poço com cristal de NaI (TI), automático. Sabendo-se que atividade radioativa injetada equivale a 100 % da dose, foi calculada a porcentagem da dose por órgão total com a seguinte equação (4):

$$\% \text{ dose / órgão} = \frac{\text{cpm / órgão}}{\text{dose administrada (cpm)}} \times 100 \quad (4)$$

No estudo de biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado realizado após a administração intraperitoneal (FIG. 24 e FIG. 25), foi observado que no cérebro e coração, o pico de absorção é alcançado nos 15 minutos após a administração da dose, respectivamente 0,09 % e 0,30 % da dose administrada. Em seguida, inicia-se o processo de eliminação, onde os níveis de antimônio mantiveram-se abaixo de 0,03 %. No útero e ovário o pico da concentração da dose ocorre nos 3 minutos iniciais da administração e, passados 15 minutos, há redução para menos da metade da dose, que segue com eliminação contínua, atingindo níveis inferiores a 0,03 % da dose. No pulmão o pico da absorção também ocorre nos 15 minutos iniciais da administração (0,7 % da dose) seguida do clareamento progressivo da dose.

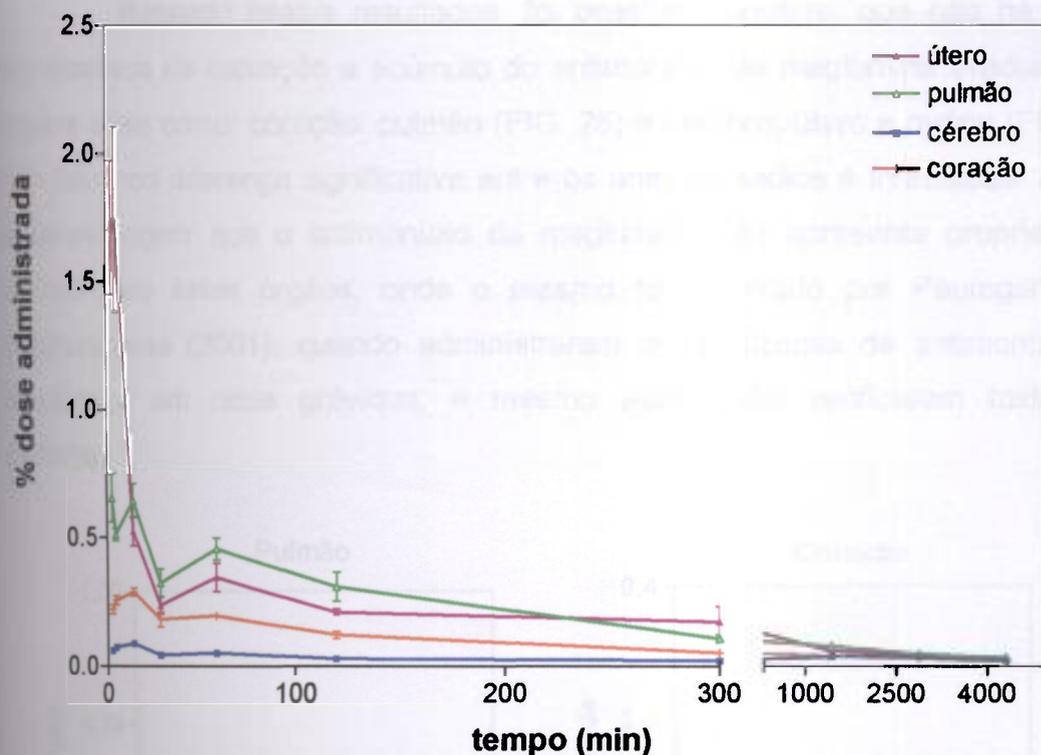


FIGURA 24 - Biodistribuição do antimoniatado de meglumina irradiado em fêmea BALB/c sadia, % da dose administrada/órgão total (desvio-padrão, n=6).

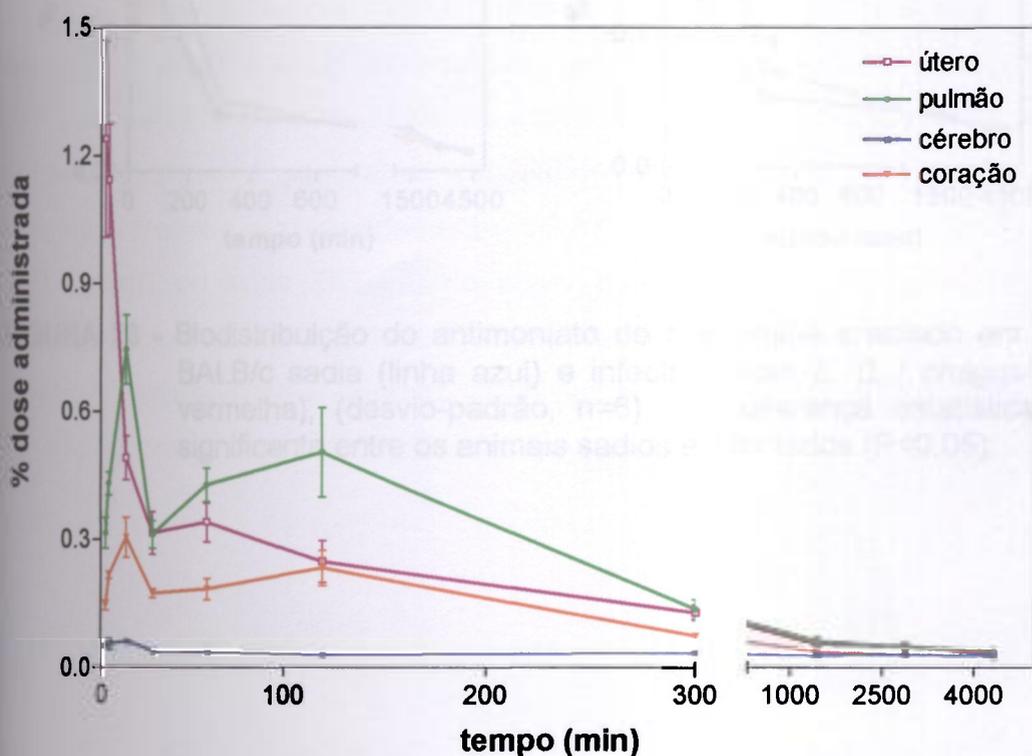


FIGURA 25 - Biodistribuição do antimoniatado de meglumina irradiado em fêmea BALB/c infectada com *L. (L.) chagasi*, % da dose administrada/órgão total (desvio-padrão, n=6).

Baseado nestes resultados, foi possível constatar que não há níveis significativos de captação e acúmulo do antimoniato de meglumina irradiado em órgãos vitais como: coração, pulmão (FIG. 26) e cérebro, útero e ovário (FIG.27), não havendo diferença significativa entre os animais sadios e infectados. Assim, pode-se sugerir que o antimoniato de meglumina não apresenta propriedades tóxicas para estes órgãos, onde o mesmo foi mostrado por Paumgarten e colaboradores (2001), quando administraram doses tóxicas de antimoniato de meglumina em ratas grávidas, e mesmo assim não verificaram toxicidade materna.

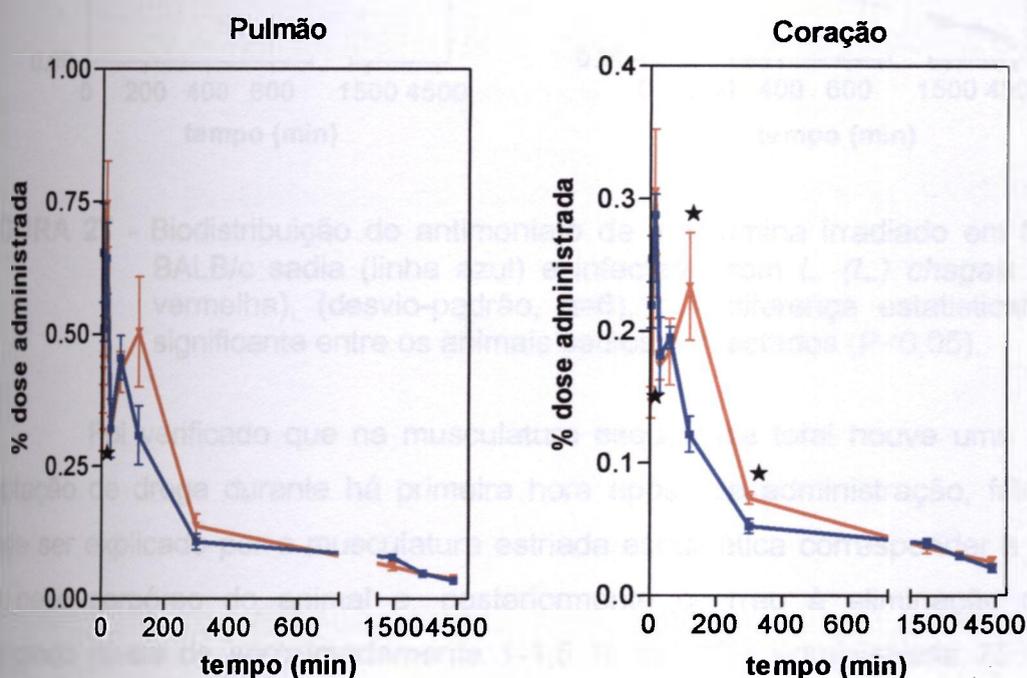


FIGURA 26 - Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em fêmea BALB/c sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados ($P < 0,05$).

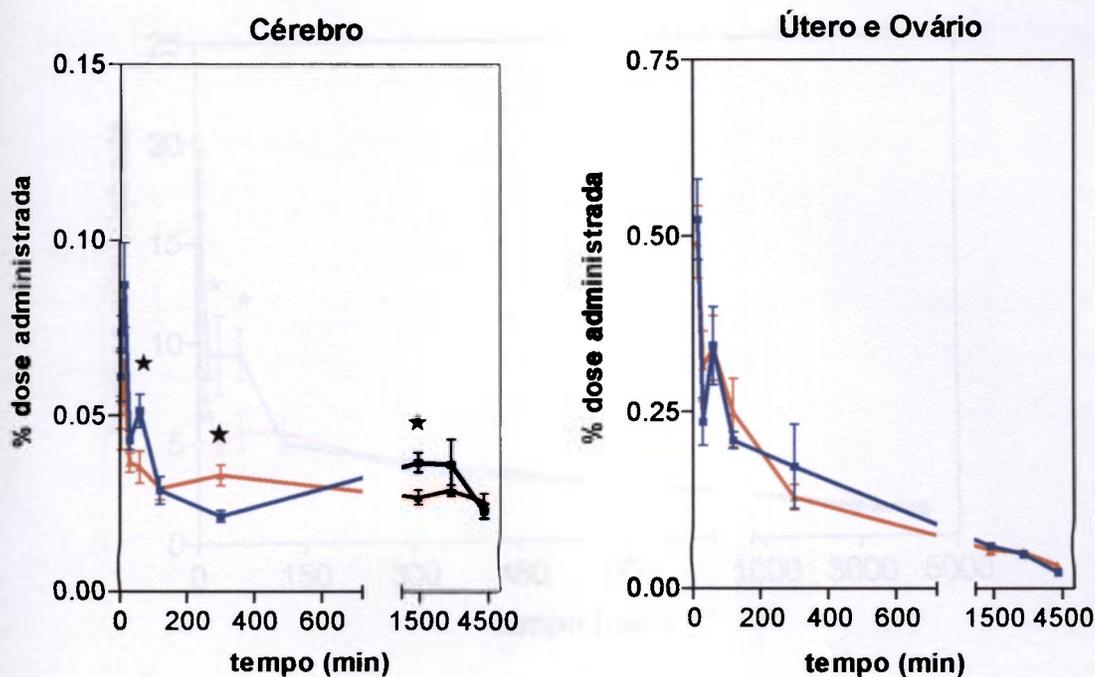


FIGURA 27 - Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em fêmea BALB/c sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados ($P < 0,05$).

Foi verificado que na musculatura esquelética total houve uma maior captação de droga durante há primeira hora após sua administração, fato que pode ser explicado por a musculatura estriada esquelética corresponder a 40 % do peso corpóreo do animal e, posteriormente ocorreu à eliminação desta, atingindo níveis de aproximadamente 1-1,5 % da dose administrada 72 horas após a injeção da droga (FIG. 28). Foi observado que o antimoniato de meglumina irradiado não apresenta propriedade tóxica neste órgão, porém os animais sadios mostraram uma leve maior captação da droga em relação aos animais infectados, em dois tempos avaliados (30 e 60 minutos) (FIG. 28).

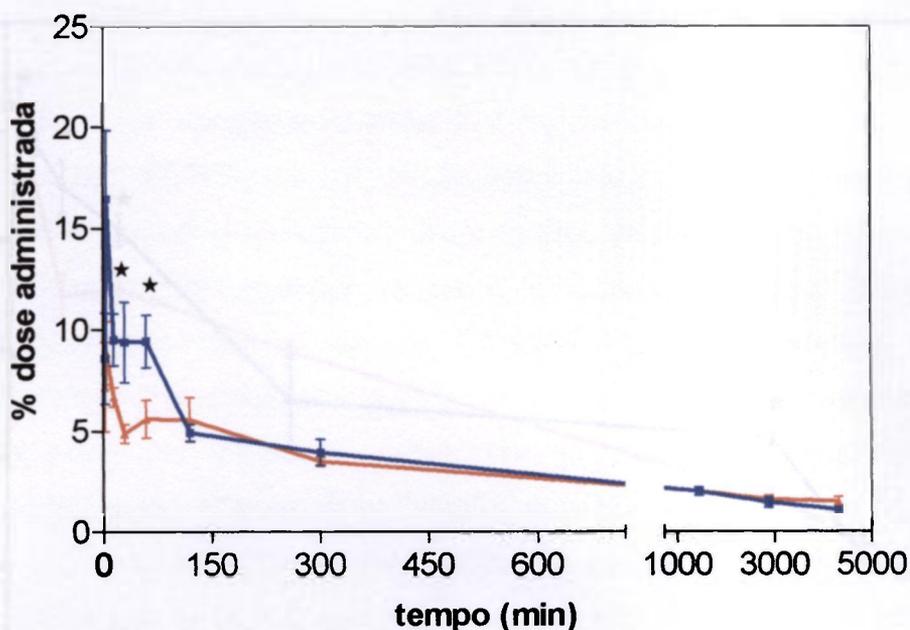


FIGURA 28 - Biodistribuição do antimoníato de meglumina irradiado na musculatura esquelética total de fêmea BALB/c sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados ($P < 0,05$).

A captação da droga pelo fígado (FIG. 29) aumenta progressivamente até atingir um pico máximo em 30 minutos após a administração da droga. Nos animais sadios este pico corresponde a aproximadamente 49 % da dose administrada e nos animais infectados este mesmo pico corresponde a 46 % da dose administrada, ocorrendo uma lenta depuração até 72 horas após a administração da droga, alcançando níveis de 7 % da dose nos animais sadios e nos animais infectados. Desta forma, a maior captação da droga ocorre no fígado dos animais sadios em relação aos animais infectados.

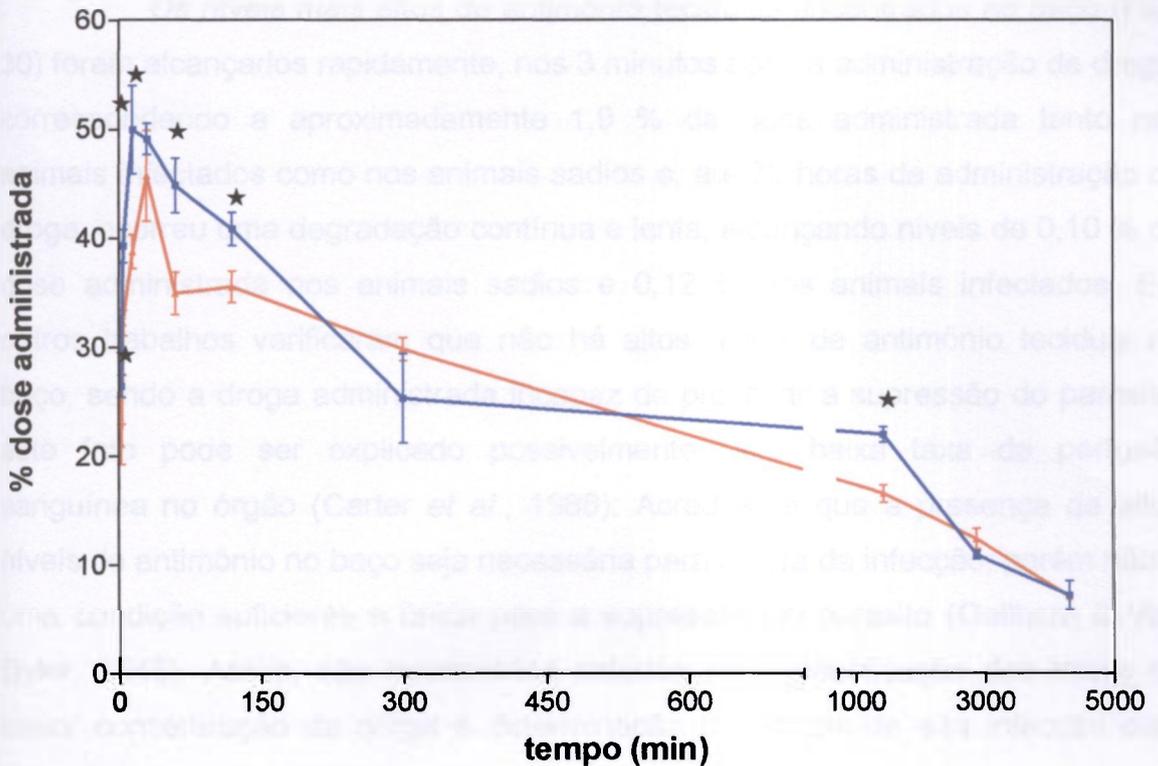


FIGURA 29 - Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado no fígado de camundongo BALB/c fêmea sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados ($P < 0,05$).

Os dados de maior captação da droga pelo fígado corroboram com os dados verificados por outros autores e estão associados com um efeito antiparasitário. Collins e colaboradores (1992) verificaram alta concentração dos níveis de antimônio no fígado e significativa supressão do parasito, em relação aos outros órgãos avaliados (baço e medula óssea), quando foi administrado estibogluconato de sódio via intravenosa em camundongo BALB/c sadio e infectado com *L. donovani*. Este resultado sugere que o pico de antimônio tecidual alcançado rapidamente após a dosagem é um fator importante para determinar a eficácia da droga num local particular da infecção. Em outro estudo, foi administrado estibogluconato de sódio via intramuscular em camundongo BALB/c sadio e após 24 horas verificou-se que no fígado está presente o mais alto nível de antimônio tecidual (Hunter *et al.*, 1988). Os altos níveis de antimônio no fígado podem ser explicados pela alta taxa de perfusão sangüínea (Carter *et al.*, 1988).

Os níveis mais altos de antimônio teciduais encontrados no baço (FIG. 30) foram alcançados rapidamente, nos 3 minutos após a administração da droga, correspondendo a aproximadamente 1,9 % da dose administrada tanto nos animais infectados como nos animais sadios e, até 72 horas da administração da droga, ocorreu uma degradação contínua e lenta, alcançando níveis de 0,10 % da dose administrada nos animais sadios e 0,12 % nos animais infectados. Em outros trabalhos verificaram que não há altos níveis de antimônio tecidual no baço, sendo a droga administrada incapaz de provocar a supressão do parasito, este fato pode ser explicado possivelmente pela baixa taxa de perfusão sanguínea no órgão (Carter *et al.*, 1988). Acredita-se que a presença de altos níveis de antimônio no baço seja necessária para a cura da infecção, porém não é uma condição suficiente e única para a supressão do parasito (Gellhorn & Van Dyke, 1946). Assim, são necessários estudos para identificação dos locais de maior concentração da droga e determinação dos locais de alta infecção para evitar falhas e relapsos no tratamento.

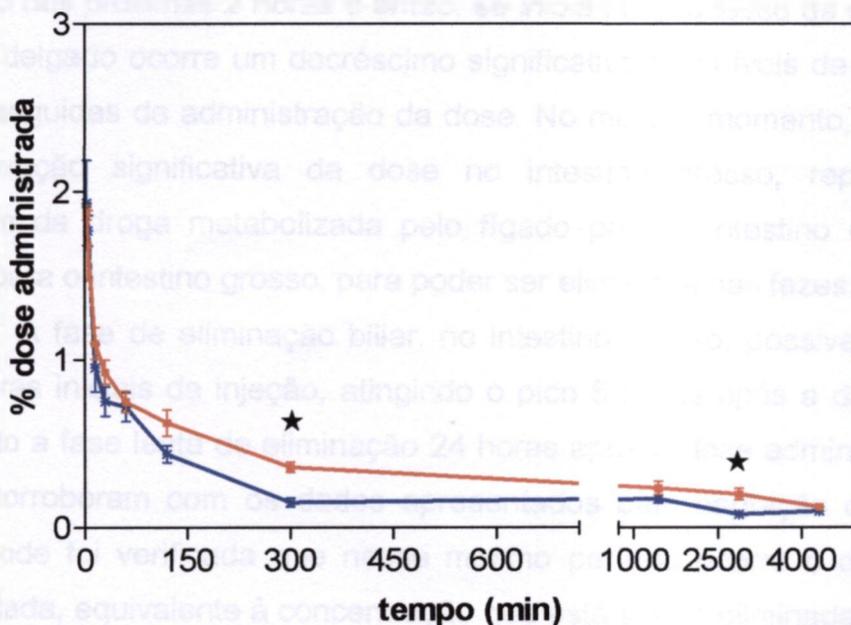


FIGURA 30 - Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado no baço de fêmea BALB/c sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significante entre os animais sadios e infectados.

Foi verificado que o efeito antiparasitário do estibogluconato de sódio é dependente do local de ação (Carter *et al.*, 1988) e do estágio da infecção (Baillie *et al.*, 1989). Não foi verificada correlação entre a supressão parasitária e os níveis de antimônio presentes no fígado e baço de hamsters infectados com *L. donovani* e tratados com diferentes agentes antimoniais (Gellhorn & Van Dyke, 1946). Collins e colaboradores (1992) também observaram que em camundongos com infecção aguda e tratados com estibogluconato de sódio ocorre significativa supressão do parasito somente no fígado, apesar dos níveis de antimônio serem altos tanto no baço como na medula óssea. Na infecção crônica a ausência da supressão parasitária no fígado está de acordo com os níveis de antimônio, os quais são menores do que na infecção aguda (Collins *et al.*, 1992).

O antimoniato de meglumina irradiado demonstrou ser uma droga absorvida pelo trato gastrointestinal (FIG. 31), e ser eliminado preferencialmente pela via hepática por excreção biliar. A absorção da dose ocorre no estômago, onde há um pico da dose nos 3 minutos iniciais da injeção. Nos 30 minutos seguintes ocorre um decréscimo da dose, seguido da elevação dos níveis de antimônio nas próximas 2 horas e então, se inicia um processo de eliminação. No intestino delgado ocorre um decréscimo significativo dos níveis de antimônio nas 2 horas seguidas da administração da dose. No mesmo momento, foi observada uma elevação significativa da dose no intestino grosso, representando a passagem da droga metabolizada pelo fígado para o intestino delgado e em seguida para o intestino grosso, para poder ser eliminada nas fezes.

A fase de eliminação biliar, no intestino grosso, possivelmente ocorre nas 2 horas iniciais da injeção, atingindo o pico 5 horas após a dose injetada e finalizando a fase lenta de eliminação 24 horas após a dose administrada. Esses valores corroboram com os dados apresentados pela captação da droga pelo fígado, onde foi verificada que nesse mesmo período ocorre o decaimento da dose injetada, equivalente à concentração que está sendo eliminada pelo intestino (FIG. 31 e FIG. 32). Então, seguidas às 24 horas iniciais da administração da droga possivelmente ocorre uma fase bastante lenta de eliminação via renal e biliar permanecendo até 72 horas após a injeção.

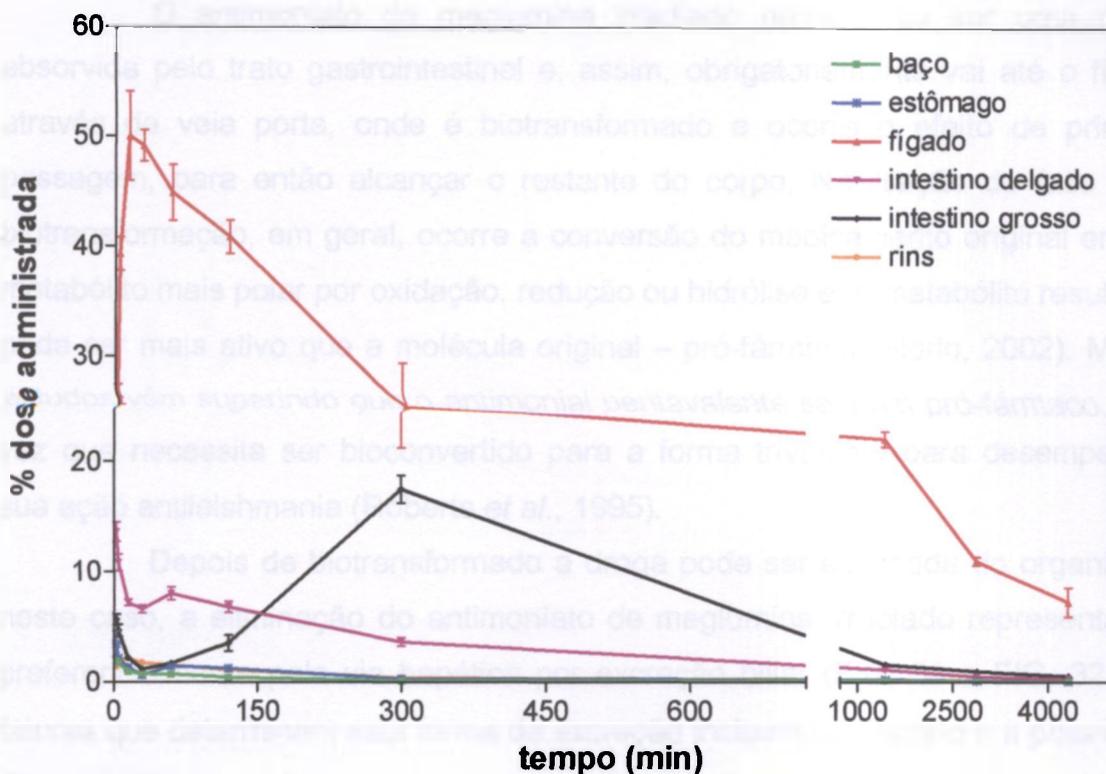


FIGURA 31 - Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em fêmea BALB/c sadia, % da dose administrada/órgão total (desvio-padrão, n=6).

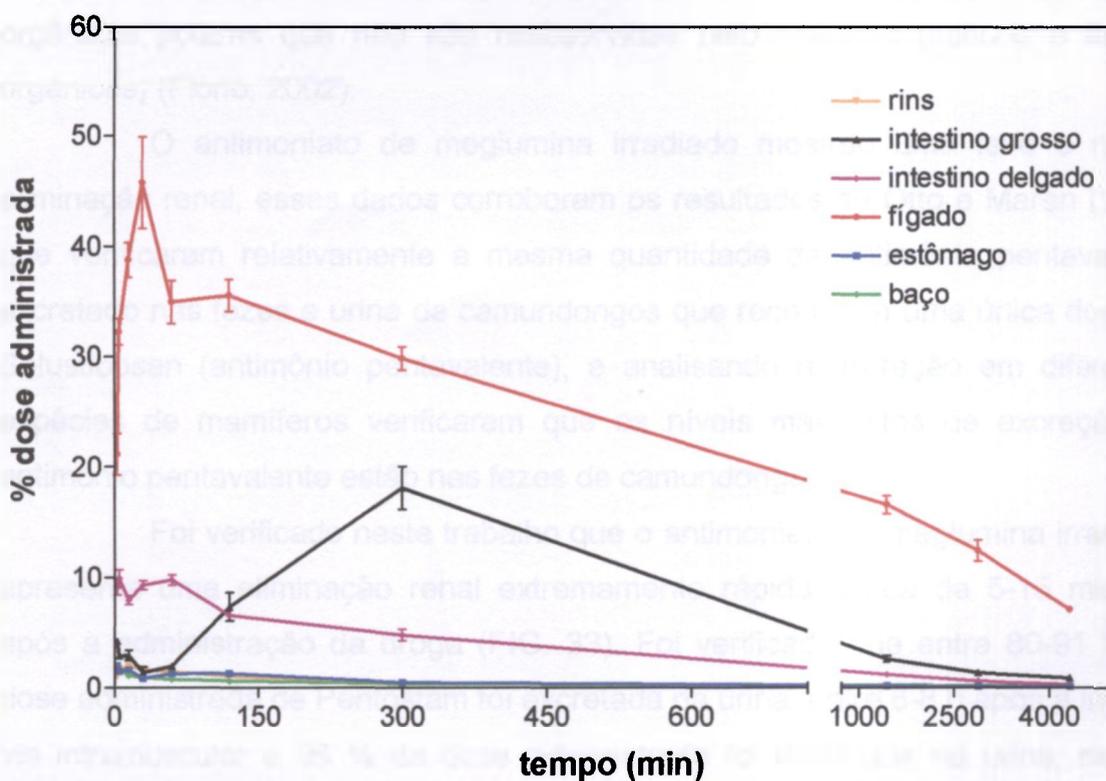


FIGURA 32 - Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em fêmea BALB/c infectada com *L. (L.) chagasi*, % da dose administrada/órgão total (desvio-padrão, n=6).

O antimoniato de meglumina irradiado demonstrou ser uma droga absorvida pelo trato gastrointestinal e, assim, obrigatoriamente vai até o fígado através da veia porta, onde é biotransformado e ocorre o efeito de primeira passagem, para então alcançar o restante do corpo. Na reação de fase 1 de biotransformação, em geral, ocorre a conversão do medicamento original em um metabólito mais polar por oxidação, redução ou hidrólise e, o metabólito resultante pode ser mais ativo que a molécula original – pró-fármaco (Florio, 2002). Muitos estudos vêm sugerindo que o antimonial pentavalente seja um pró-fármaco, uma vez que necessita ser bioconvertido para a forma trivalente para desempenhar sua ação antileishmania (Roberts *et al.*, 1995).

Depois de biotransformado a droga pode ser eliminada do organismo, neste caso, a eliminação do antimoniato de meglumina irradiado representa ser preferencialmente pela via hepática por excreção biliar (FIG. 31 e FIG. 32). Os fatores que determinam esta forma de excreção incluem o tamanho e a polaridade da molécula do medicamento a ser eliminado. Medicamentos com peso molecular elevado (> 300), têm grande probabilidade de serem excretados pela bile. A excreção pela bile tem importância também na eliminação de substâncias orgânicas polares que não são reabsorvidas pelo intestino (cátions e ânions orgânicos) (Florio, 2002).

O antimoniato de meglumina irradiado mostrou uma leve e rápida eliminação renal, esses dados corroboram os resultados de Otto e Maren (1950) que verificaram relativamente a mesma quantidade de antimônio pentavalente excretado nas fezes e urina de camundongos que receberam uma única dose de Solustibosan (antimônio pentavalente), e analisando a excreção em diferentes espécies de mamíferos verificaram que os níveis mais altos de excreção de antimônio pentavalente estão nas fezes de camundongos.

Foi verificado neste trabalho que o antimoniato de meglumina irradiado apresenta uma eliminação renal extremamente rápida, cerca de 5-15 minutos após a administração da droga (FIG. 33). Foi verificado que entre 80-91 % da dose administrada de Pentostam foi excretada na urina, entre 6-8 h após a injeção via intramuscular e 96 % da dose administrada foi excretada na urina, nas 6h após a injeção via intravenosa (Rees *et al.*, 1980).

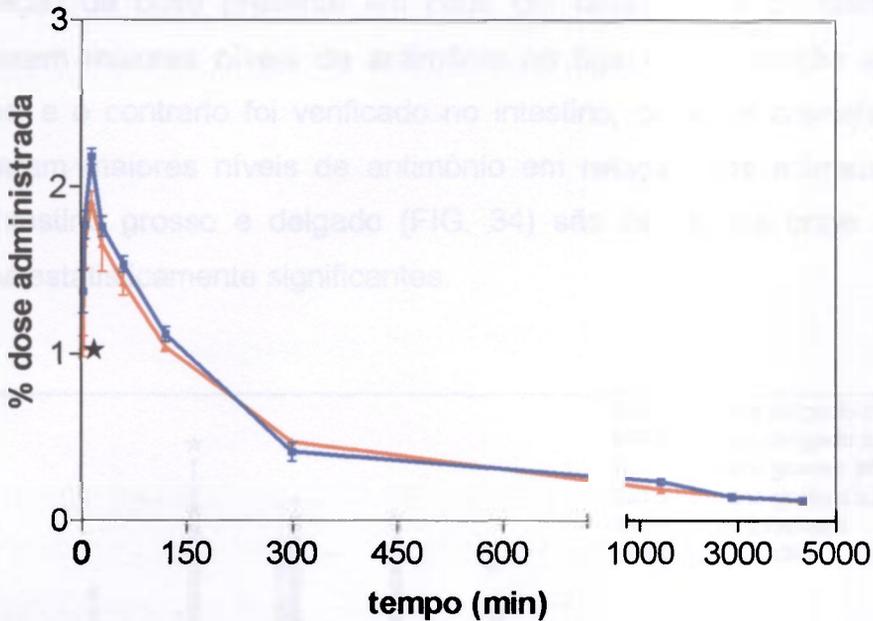


FIGURA 33 - Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado nos rins de fêmea BALB/c sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais saudáveis e infectados ($P < 0,05$).

A diferença entre os dados mostrados neste trabalho e os apresentados pela literatura pode ser explicada pela ausência de registro sobre análise da biodistribuição de antimônio pentavalente em órgãos que participam da via de eliminação entero-hepática, especialmente intestinos e vesícula biliar. Além disso, não há análise de antimônio nas fezes, pois somente há descrição da avaliação de alguns órgãos como baço, fígado, medula óssea e pele (Lugo de Yarbuh *et al.*, 1994; Berman *et al.*, 1988), análise de urina (Goodwin & Page, 1943; Rees *et al.*, 1980) e sangue (Otto *et al.*, 1947; Chulay *et al.*, 1988; Pamplim *et al.*, 1981). Estes fatos reiteram a necessidade eminente de mais estudos para poder esclarecer a farmacocinética do antimônio pentavalente.

Possivelmente, a irradiação por nêutrons sobre o antimoniato de meglumina provocou uma aparente polimerização da meglumina e, este fato pode ter interferido no processo de eliminação da droga, favorecendo uma maior captação pelo trato gastrointestinal e eliminação pela via hepática, por excreção biliar.

O mesmo perfil de biodistribuição foi verificado entre os animais saudáveis e infectados com *L. (L.) chagasi*, onde foi observado que o que os diferencia é a

concentração da dose presente em cada um deles, onde os animais sadios apresentaram maiores níveis de antimônio no fígado em relação aos animais infectados, e o contrario foi verificado no intestino, onde os animais infectados apresentaram maiores níveis de antimônio em relação aos animais sadios. O fígado, intestino grosso e delgado (FIG. 34) são os órgãos onde há maiores diferenças estatisticamente significantes.

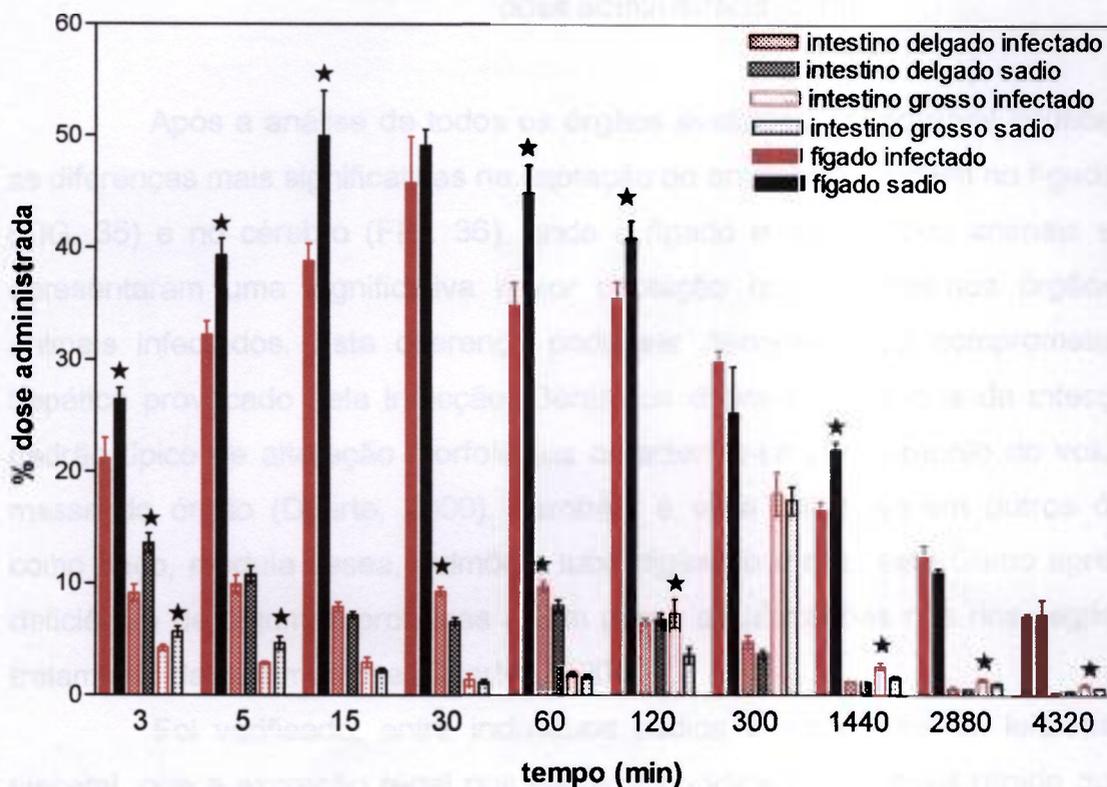


FIGURA 34 – Órgãos onde existem as maiores diferenças na porcentagem de dose na biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em fêmea BALB/c sadia (barra preta) e infectada com *L. (L.) chagasi* (barra vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados ($P < 0,05$).

A fim de comparar a afinidade relativa do antimoniato de meglumina irradiado por diferentes órgãos, foram analisados os dados de biodistribuição através de cálculo da porcentagem da dose administrada por grama de órgão, para se anular aparente captação que ocorre em órgãos que possuem maior massa (5).

$$\% \text{dose / grama} = \frac{\text{cpm / grama de órgão}}{\text{dose administrada (cpm)}} \times 100 \quad (5)$$

Após a análise de todos os órgãos avaliados, foi possível verificar que as diferenças mais significativas na captação do antimônio ocorrem no fígado, rins (FIG. 35) e no cérebro (FIG. 36), onde o fígado e os rins dos animais sadios apresentaram uma significativa maior captação que os mesmos órgãos dos animais infectados. Esta diferença pode ser decorrente do comprometimento hepático provocado pela infecção. Dentre os diferentes padrões de infecção, o padrão típico de alteração morfológica caracteriza-se por aumento do volume e massa do órgão (Duarte, 2000). Também é vista alteração em outros órgãos como baço, medula óssea, pulmões, tubo digestivo e rins, este último apresenta deficiência de algumas proteínas e, em geral, as alterações nos rins regridem o tratamento da leishmaniose (Duarte, 2000).

Foi verificado, entre indivíduos sadios e portadores de leishmaniose visceral, que a excreção renal nos pacientes sadios é bem mais rápida que nos indivíduos doentes, onde a excreção é completada após 24 horas da injeção de antimoniato de meglumina. Entre os pacientes doentes, há um retardo da eliminação, onde após 36 horas da administração da droga, ainda é possível verificar traços de antimônio na urina, este fato pode ser caracterizado por uma disfunção renal encontrada em muitos casos de indivíduos com leishmaniose visceral (Chakravarti & Sem Gupta, 1950).

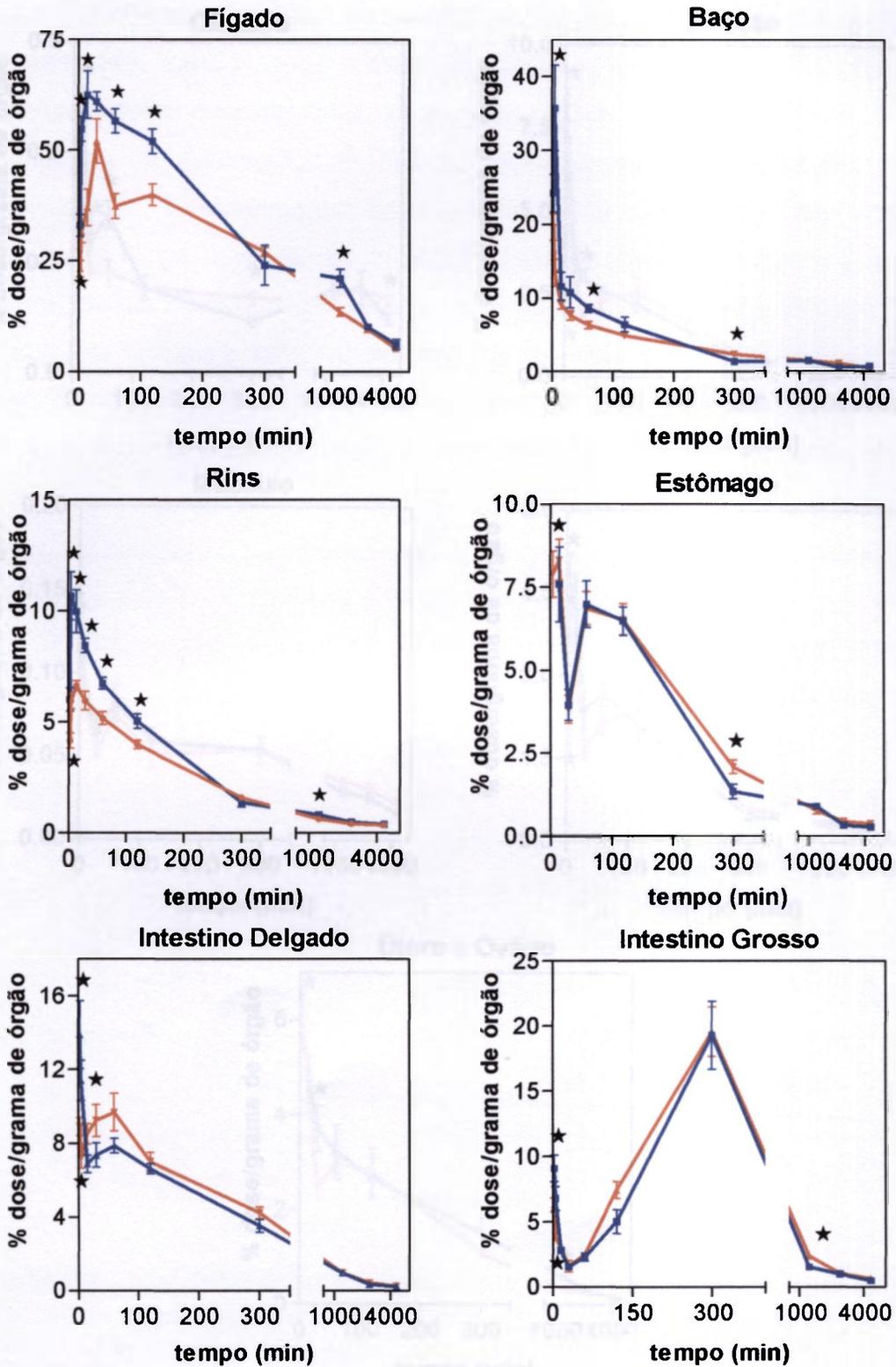


FIGURA 35 – Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em fêmea BALB/c sadia (barra azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (barra vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados ($P < 0,05$).

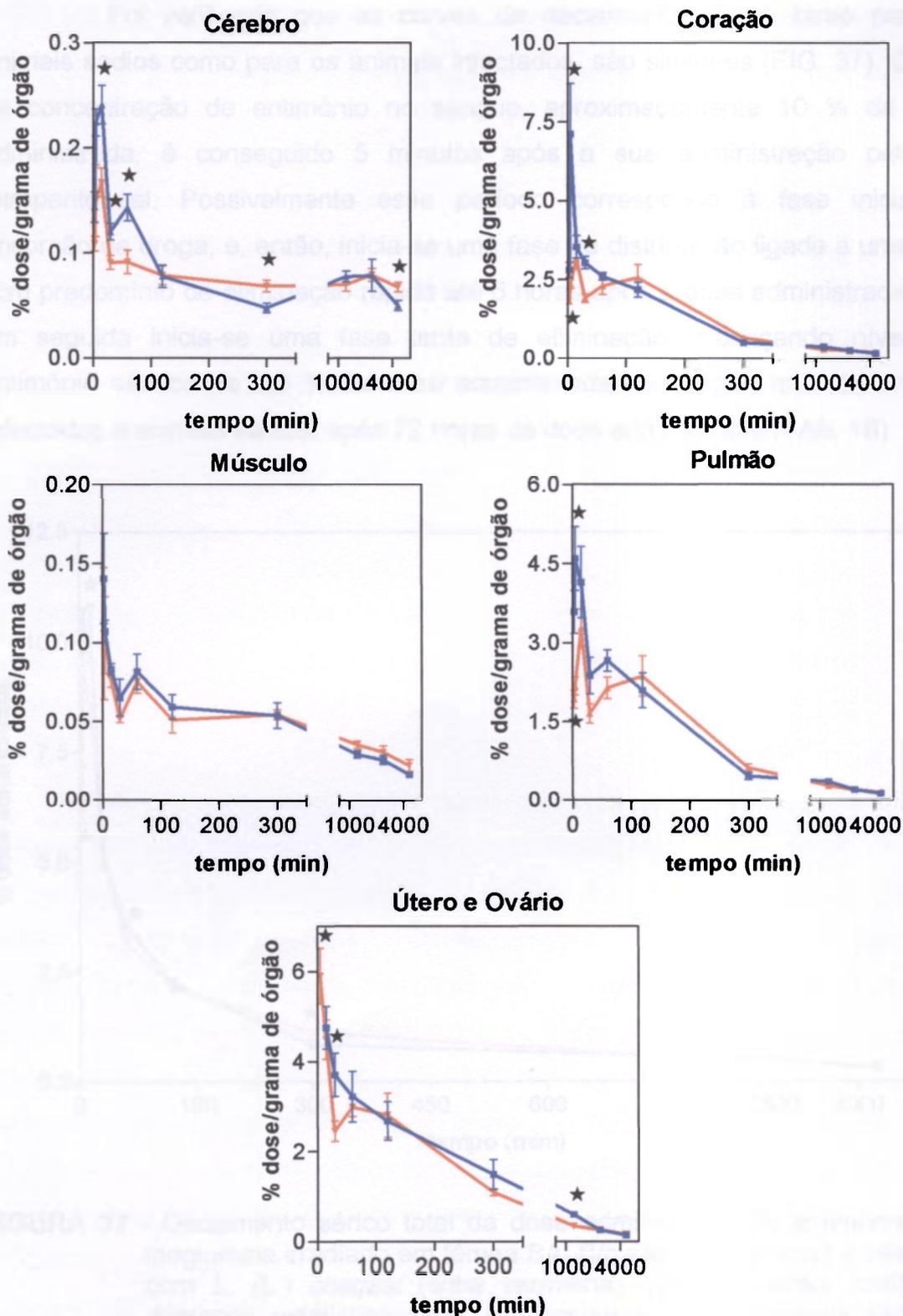


FIGURA 36 – Biodistribuição do antimoniate de meglumina irradiado em fêmea BALB/c sadia (barra azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (barra vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados ($P < 0,05$).

Foi verificado que as curvas de decaimento sérico, tanto para os animais sadios como para os animais infectados, são similares (FIG. 37). O pico da concentração de antimônio no sangue, aproximadamente 10 % da dose administrada, é conseguido 5 minutos após a sua administração pela via intraperitoneal. Possivelmente esse período corresponde à fase inicial de absorção da droga, e, então, inicia-se uma fase de distribuição ligada a uma fase com predomínio de eliminação rápida até 5 horas após a dose administrada. Em seguida inicia-se uma fase lenta de eliminação, alcançando níveis de antimônio séricos de 0,3 % da dose administrada no sangue total de animais infectados e animais sadios, após 72 horas da dose administrada (TAB. 16).

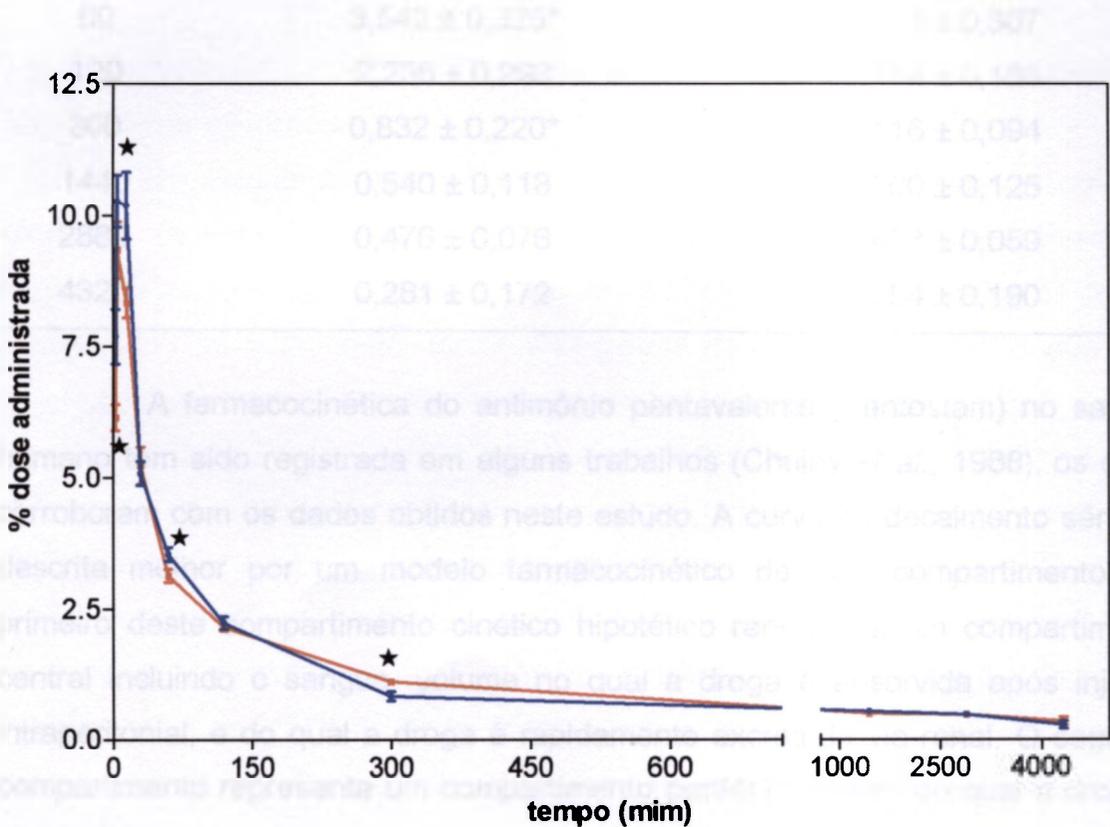


FIGURA 37 - Decaimento sérico total da dose administrada do antimoniato de meglumina irradiado em fêmea BALB/c sadia (linha azul) e infectada com *L. (L.) chagasi* (linha vermelha), (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados ($P < 0,05$).

TABELA 16 - Porcentagem da dose administrada no sangue total de camundongo BALB/c infectado com *L.(L.) chagasi* e sadio, de injeção intraperitoneal do antimoniato de meglumina irradiado, (media±desvio-padrão, n=6). * = diferença estatisticamente significativa entre os animais sadios e infectados (P<0,05).

Tempo (min)	Animal sadio (% dose administrada/ sangue total)	Animal infectado (% dose administrada/ sangue total)
3	7,688 ± 1,277*	6,146 ± 0,606
5	10,246 ± 1,226	9,341 ± 1,315
15	10,189 ± 1,568*	8,335 ± 0,689
30	5,080 ± 0,559	5,230 ± 0,870
60	3,542 ± 0,325*	3,133 ± 0,307
120	2,236 ± 0,293	2,154 ± 0,165
300	0,832 ± 0,220*	1,116 ± 0,094
1440	0,540 ± 0,118	0,500 ± 0,125
2880	0,476 ± 0,076	0,478 ± 0,059
4320	0,281 ± 0,172	0,354 ± 0,190

A farmacocinética do antimônio pentavalente (Pentostam) no sangue humano tem sido registrada em alguns trabalhos (Chulay *et al.*, 1988), os quais corroboram com os dados obtidos neste estudo. A curva de decaimento sérico é descrita melhor por um modelo farmacocinético de dois compartimentos. O primeiro deste compartimento cinético hipotético representa um compartimento central incluindo o sangue, volume no qual a droga é absorvida após injeção intraperitoneal, e do qual a droga é rapidamente excretada via renal. O segundo compartimento representa um compartimento periférico dentro do qual a droga é distribuída ou aonde pode ocorrer a conversão *in vivo* (no fígado) do antimônio pentavalente para a forma trivalente, com uma rápida excreção renal do antimônio pentavalente, seguido de uma fase mais lenta podendo corresponder a eliminação do antimônio trivalente (Chulay *et al.*, 1988; Valladares *et al.*, 1996). Sugere-se que o antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, sendo convertido a antimônio trivalente após sua administração (Frézard *et al.*, 2001). Há indícios que o antimônio trivalente é substancialmente mais eficiente que o antimônio pentavalente contra promastigotas e amastigotas (Roberts *et al.*, 1995). Esses resultados reforçam a hipótese de uma conversão metabólica intramacrofágica do

antimônio pentavalente em antimônio trivalente, sendo este o elemento tóxico ao parasita no seu estado intracelular, já que o antimônio pentavalente é dez vezes menos tóxico para os humanos e tem um maior índice terapêutico que as preparações de antimônio trivalente (Roberts *et al.*, 1995).

A determinação da farmacocinética permite verificar o tempo de permanência da droga no organismo, bem como avaliar seu período de ação, visto que não se sabe ao certo se para o tratamento da leishmaniose, o pico da concentração de antimônio demonstra ser mais importante (Berman *et al.*, 1988; Valladares *et al.*, 1997) do que a manutenção dos níveis totais de antimônio por um longo período (Chulay *et al.*, 1988; Tassi *et al.*, 1994).

5.6.2. Estudo de biodistribuição do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado por nêutrons

No estudo de biodistribuição do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado (antimônio pentavalente livre) realizado após a administração intraperitoneal, foi observado que o pico de absorção da dose em todos os órgãos ocorre entre os 5 primeiros minutos seguidos da injeção e foi verificada uma rápida e progressiva eliminação da droga em todos os órgãos (FIG. 38).

Alguns órgãos podem ser denominados como simplesmente vias de passagem da droga, sendo eles o cérebro, coração, pulmão e útero. Foi verificado, após 3 minutos da injeção, nível de antimônio no cérebro (FIG. 39) de 0,1 % da dose administrada e ao final de 48 horas os níveis atingiram de 0,03 % da dose administrada. Foi observado no coração (FIG. 39), após 3 minutos da injeção, cerca de 0,3 % da dose administrada e, após 48 horas, não foi possível detectar níveis significativos de antimônio. Foi verificado no pulmão (FIG. 40), após 3 minutos da injeção, cerca de 1 % da dose administrada e, após 48 horas aproximadamente 0,01 % da dose. Foi observado no útero (FIG. 40), após 5 minutos da administração da dose, o maior nível de antimônio, apresentando cerca de 2,1 % da dose, os níveis decaem rapidamente atingindo cerca de 0,009 % após 48 horas da injeção.

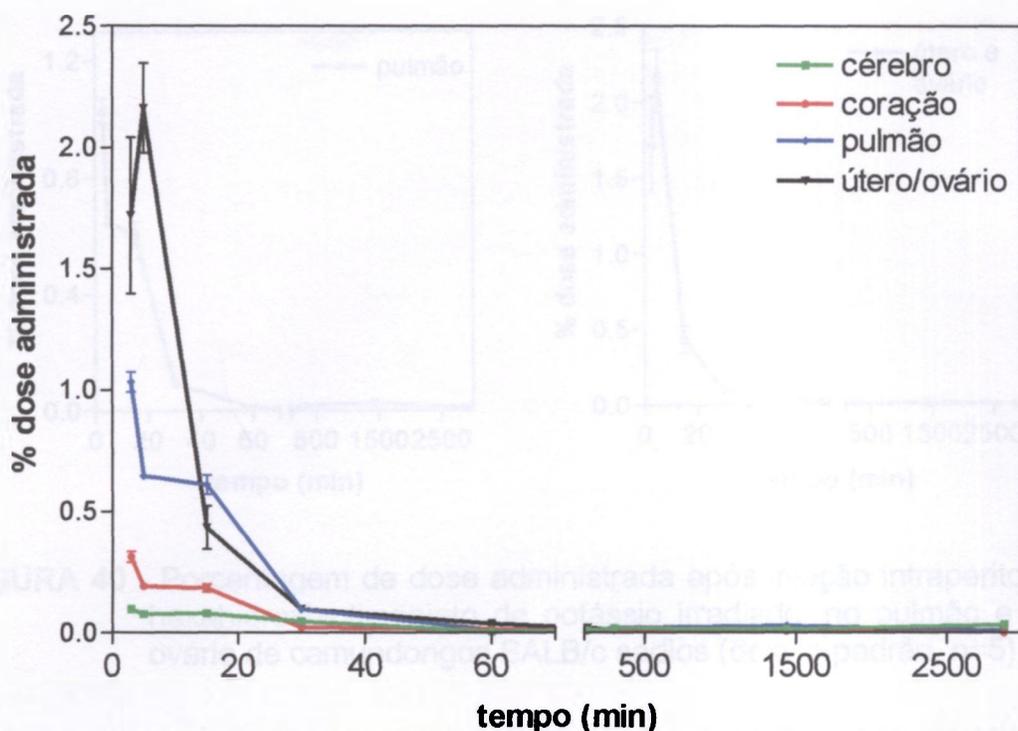


FIGURA 38 - Porcentagem de dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado em camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5).

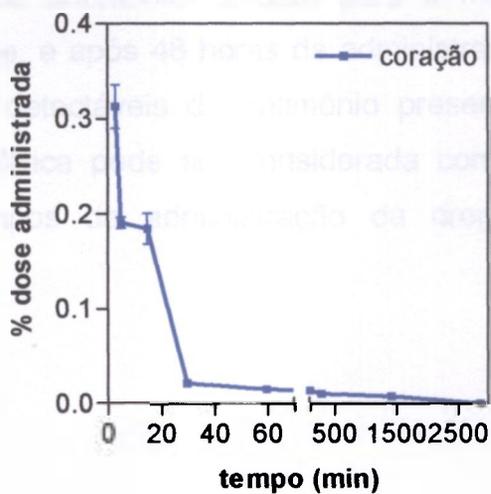
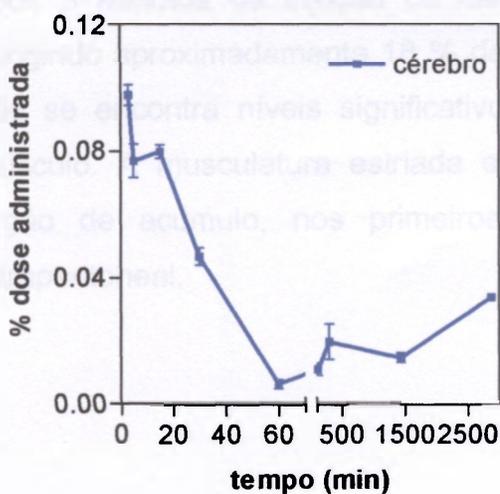


FIGURA 39 - Porcentagem de dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado, no cérebro e coração de camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5).

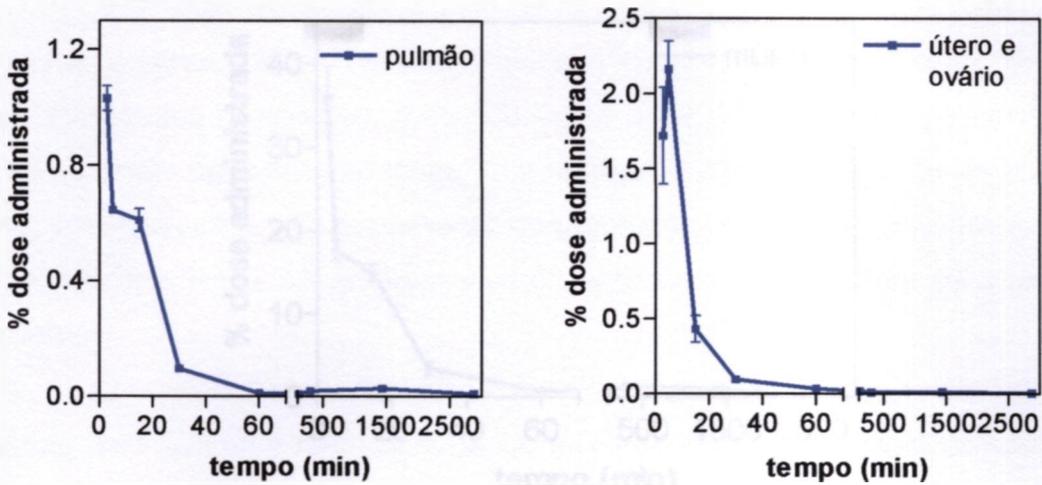


FIGURA 40 - Porcentagem de dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxi antimônio de potássio irradiado, no pulmão e útero e ovário de camundongos BALB/c saudáveis (desvio-padrão, n=5).

A musculatura esquelética (FIG. 41), correspondente a 40 % do peso corpóreo do animal, apresentou a maior concentração de antimônio, onde foi verificado aproximadamente 36 % da dose administrada no primeiro tempo avaliado. Em seguida, ocorre uma eliminação bastante rápida e progressiva, onde após 5 minutos da injeção os níveis de antimônio decaem para a metade, atingindo aproximadamente 18 % da dose, e após 48 horas da administração já não se encontra níveis significativos e detectáveis de antimônio presente no músculo. A musculatura estriada esquelética pode ser considerada como um órgão de acúmulo, nos primeiros tempos da administração da droga via intraperitoneal.

FIGURA 41 - Porcentagem de dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxi antimônio de potássio irradiado, no músculo de camundongos BALB/c saudáveis (desvio-padrão, n=5).

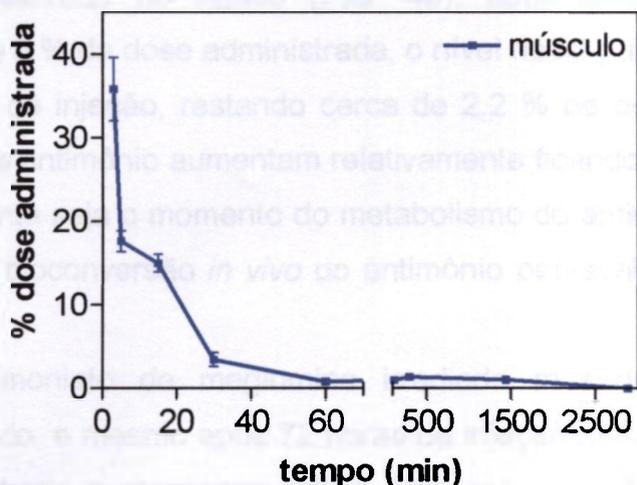


FIGURA 41 - Porcentagem de dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado, na musculatura esquelética de camundongos BALB/c saudáveis (desvio-padrão, n=5).

Não foi verificado relativamente alto nível de antimônio no baço (FIG. 42), onde após 3 minutos da injeção, continha cerca de 0,7 % da dose administrada e seguida 15 minutos da injeção, os níveis de antimônio decaem para menos da metade, restando apenas cerca de 0,25 % da dose. Após 1 hora da administração, os níveis de antimônio são de aproximadamente de 0,02 % da dose, permanecendo este nível durante as próximas horas, ou seja, por 48 horas depois da injeção.

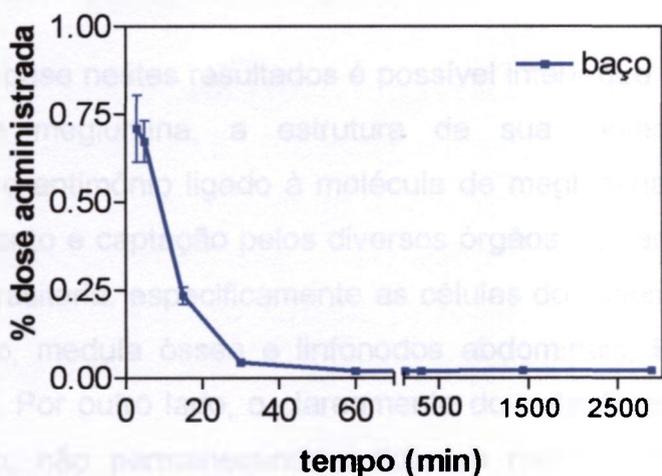


FIGURA 42 - Porcentagem de dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado, no baço de camundongos BALB/c saudáveis (desvio-padrão, n=5).

Foi observado no fígado (FIG. 43), após 3 minutos da injeção, aproximadamente 5 % da dose administrada, o nível decai para menos da metade após 15 minutos da injeção, restando cerca de 2,2 % da dose, porém após 24 horas os níveis de antimônio aumentam relativamente ficando cerca de 0,24 % da dose, possivelmente seja o momento do metabolismo do antimônio trivalente, isto é, onde ocorre a bioconversão *in vivo* do antimônio pentavalente para antimônio trivalente.

O antimoniato de meglumina irradiado mostrou-se ser altamente captado pelo fígado, e mesmo após 72 horas da injeção, aproximadamente 10 % da dose administrada permaneceu retida. Enquanto, o antimônio pentavalente livre irradiado apresentou rápida eliminação e não ficou retido em nenhum dos órgãos avaliados. Essa característica pode estar relacionada à presença do carreador, n-metil-d-meglumina, um carboidrato usado na síntese do antimoniato de meglumina (Glucantime) que está ligado ao antimônio pentavalente, o qual parece direcionar o antimônio ao seu local alvo de ação. Uma extensa polimerização na composição do antimoniato de meglumina pode influenciar na farmacocinética de liberação da droga, na captação pelo sistema reticuloendotelial e na distribuição intracelular do antimônio pentavalente (Roberts *et al.*, 1998). Assim, possivelmente a polimerização da meglumina facilitou uma maior captação de antimônio pelo fígado, o que favorece sua ação antiparasitária, ou seja, o antimônio permanece por maior tempo no órgão podendo agir contra os parasitas ali presentes.

Com base nestes resultados é possível inferir que após a irradiação do antimoniato de meglumina, a estrutura da sua molécula é preservada, permanecendo o antimônio ligado à molécula de meglumina. Este fato favorece seu direcionamento e captação pelos diversos órgãos, em especial os tecidos de maior carga parasitária, especificamente as células do sistema retículo-endotelial do fígado, baço, medula óssea e linfonodos abdominais, locais de eleição da *Leishmania sp.* Por outro lado, o clareamento do antimônio pentavalente livre é bastante rápido, não permanecendo retido em nenhum órgão, salientando a necessidade de um produto ligado ao antimônio, para que o mesmo permaneça por um tempo necessário para provocar supressão dos parasitos.

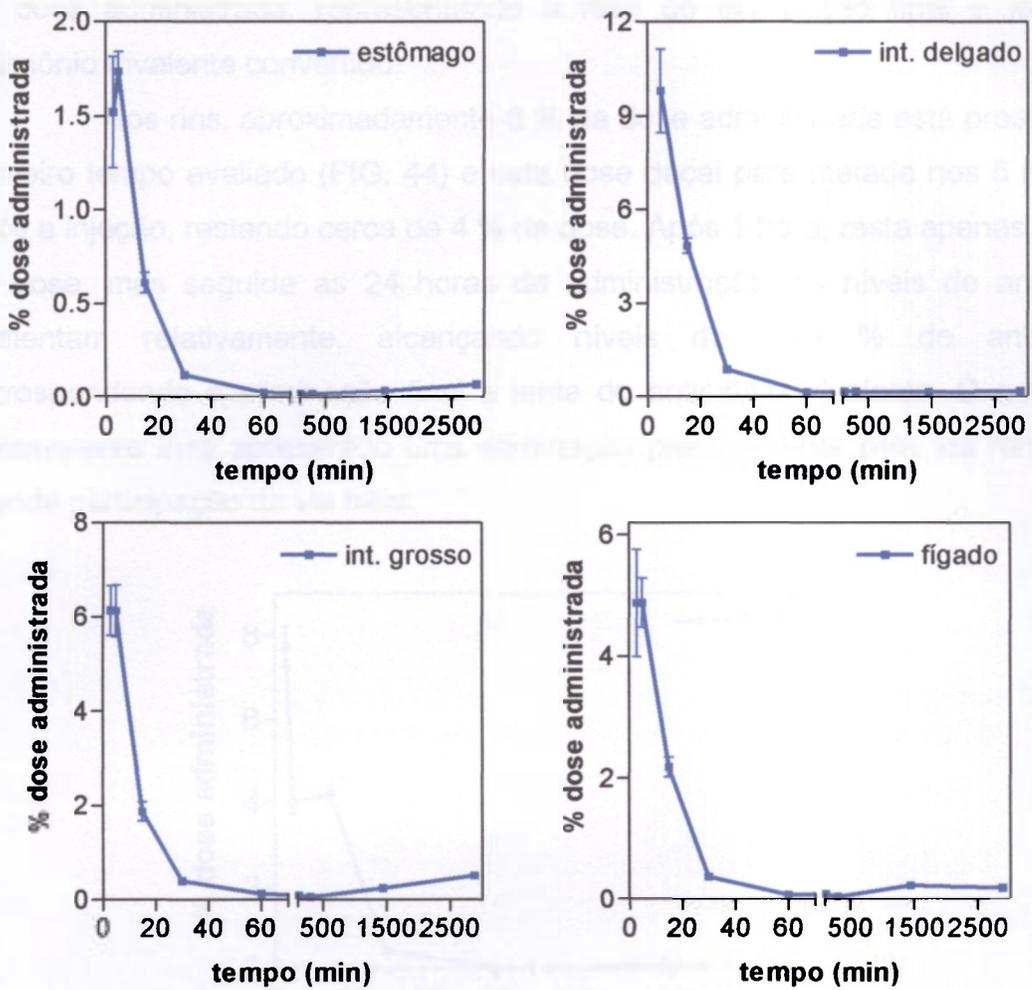


FIGURA 43 - Porcentagem de dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado em camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5).

Croft e colaboradores (1981) sugeriram que os parasitos, bem como os tecidos que eles infectam, retêm o antimônio usado na terapia. Eles observaram em estudos *in vitro* que amastigotas de *L. amazonensis* e *L. donovani* acumulam antimônio, indicando um importante efeito parasitostático, onde a multiplicação do parasito foi reduzida dentro do vacúolo parasitóforo de macrófagos dérmicos, embora a concentração de antimônio alcançada fosse insuficiente para matar os parasitos.

Foi verificada, no intestino delgado e intestino grosso (FIG. 43), que após 3 minutos da injeção, respectivamente, 18 % e 6 % da dose administrada, a eliminação da dose é bastante rápida e progressiva. Contudo, após 24 horas da injeção os níveis de antimônio aumentam, respectivamente para 0,2 % e 0,52 %

da dose administrada, representando a fase de eliminação final e lenta do antimônio trivalente convertido.

Nos rins, aproximadamente 8 % da dose administrada está presente no primeiro tempo avaliado (FIG. 44) e esta dose decai para metade nos 5 minutos após a injeção, restando cerca de 4 % da dose. Após 1 hora, resta apenas 0,04 % da dose, mas seguida as 24 horas da administração, os níveis de antimônio aumentam relativamente, alcançando níveis de 0,14 % de antimônio, correspondendo a eliminação final e lenta do antimônio trivalente. O antimônio pentavalente livre apresentou uma eliminação predominante pela via renal com grande participação da via biliar.

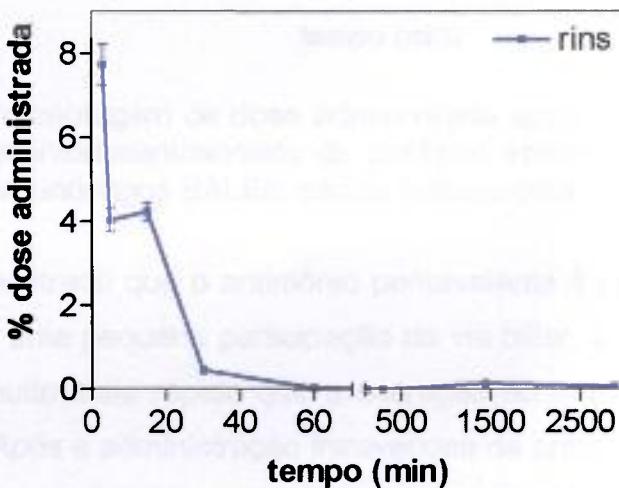


FIGURA 44 - Porcentagem de dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado, nos rins de camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5).

Foram verificados níveis de antimônio relativamente maiores nas amostras de urina (aproximadamente 18 %) em relação às amostras de fezes (aproximadamente 10 %) durante todo o período avaliado (FIG. 45). Na urina foi encontrado o maior nível de antimônio após 1 hora da administração da droga, e seguida 5 horas da injeção os níveis decaem para menos de 2 %, porém após 24 horas da administração os níveis de antimônio aumentam relativamente para cerca de 4 %, possivelmente correspondendo a fase de eliminação lenta do antimônio pentavalente e também de parte do antimônio trivalente convertido. Nas fezes, o maior nível de antimônio de cerca de 8 % foi observado após 2 horas da administração da dose, que decai para 0,14 %, porém após 24 horas os níveis de

antimônio aumentam relativamente para 1,2 % da dose, representando a eliminação do antimônio trivalente e também de parte do antimônio pentavalente.

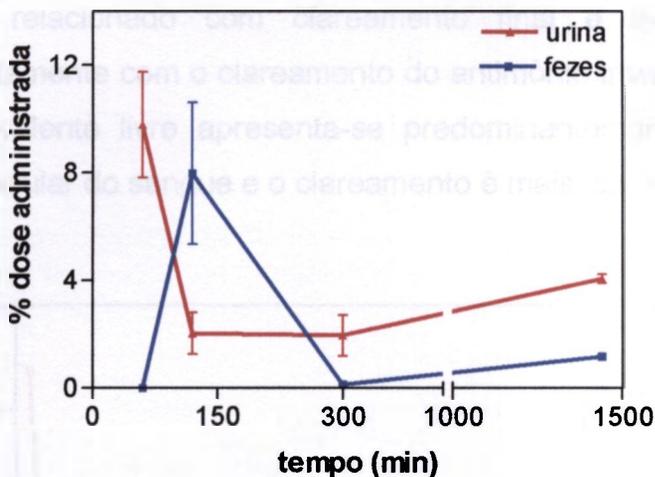


FIGURA 45 - Porcentagem de dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado, na urina e fezes de camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5).

Foi mostrado que o antimônio pentavalente é principalmente eliminado pelos rins, com uma pequena participação da via biliar, e foi verificado que a sua eliminação é muito mais rápida que a excreção do antimônio trivalente (Otto & Maren, 1950). Após a administração intravenosa de antimônio trivalente em ratos, foi verificado que a mesma porcentagem da dose administrada foi excretada na urina e nas fezes, enquanto após administração intraperitoneal, cerca de quatro vezes mais antimônio foi excretado nas fezes do que na urina dos ratos (Bailly *et al.*, 1991). Sugere-se que o antimônio inorgânico não seja metilado *in vivo* em ratos ou em humanos, sendo principalmente excretado na bile e na urina. Na bile o antimônio é combinado com a glutathiona, na concentração hepática a qual pode modular com relativa importância esta via de excreção, assim o antimônio é excretado na bile e parcialmente reabsorvido no intestino (Bailly *et al.*, 1991).

Foi verificado no sangue (FIG. 46), que o pico da concentração de antimônio ocorre nos 3 minutos seguidos da injeção intraperitoneal. Na parte celular do sangue foi verificado que o clareamento é mais rápido que no plasma (TAB. 17), e comparativamente, apresenta menos antimônio, onde após 5 minutos da injeção os níveis de antimônio decaem para metade, apresentando cerca de 3,2 % da dose e após 2 horas da injeção não é possível identificar níveis

significativos de antimônio. No plasma, após 30 minutos os níveis decaem para cerca de 1,2 % da dose e ocorre lento clareamento, porém após 24 horas os níveis de antimônio aumentam relativamente para cerca de 0,19 % da dose, podendo estar relacionado com clareamento final e lento do antimônio pentavalente juntamente com o clareamento do antimônio trivalente convertido. O antimônio pentavalente livre apresenta-se predominantemente no plasma em relação à parte celular do sangue e o clareamento é mais lento (FIG. 47).

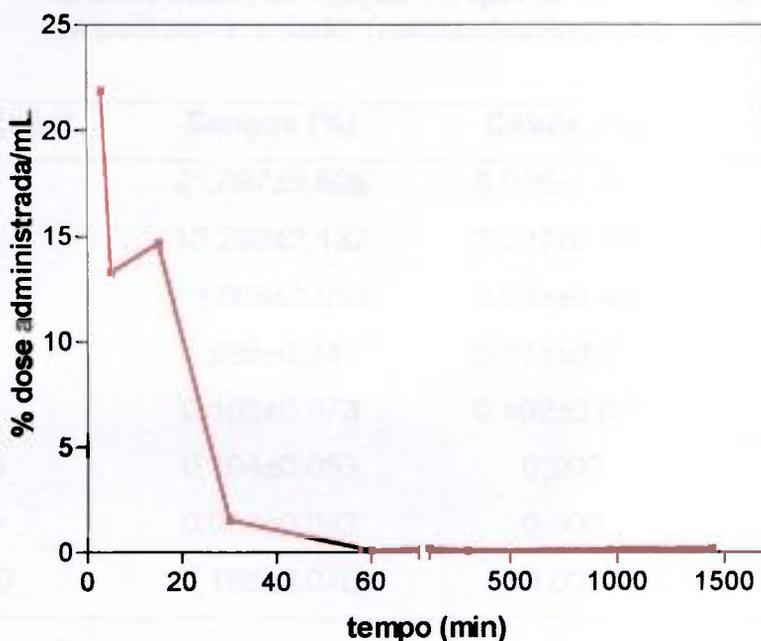


FIGURA 46 – Clareamento sanguíneo da dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxiantimoniato de potássio irradiado em camundongos BALB/c sadios (desvio-padrão, n=5).

Os dados mostrados neste estudo corroboram com os dados encontrados na literatura, onde foi verificado que o antimônio trivalente apresenta afinidade com os eritrócitos, sendo encontrada maior concentração de antimônio nas células sanguíneas que no plasma, por outro lado, o antimônio pentavalente mostrou pouca ou nenhuma afinidade com os eritrócitos, enquanto sua concentração plasmática foi bastante alta (Otto *et al.*, 1947). Desde que somente o antimônio trivalente demonstra ter uma afinidade com os eritrócitos, é sugerido que uma porção considerável de antimônio pentavalente foi reduzida para a forma trivalente, já que após a administração de antimônio pentavalente foi observado parte do antimônio presente na região celular sanguínea. Mostrando a

necessidade da conversão do antimônio pentavalente para a forma trivalente, logo que, foi demonstrado que a sua atividade biológica e terapêutica somente é conseguida após sua redução, por outro lado é visto que o antimônio pentavalente é menos tóxico que o antimônio trivalente tanto para o hospedeiro como para o parasita, e sua ação é mais lenta, então, é necessário uma maior exposição a droga (Otto & Maren, 1950).

TABELA 17 - Porcentagem da dose administrada no sangue de camundongo BALB/c sadio, de injeção intraperitoneal do hexahidroxi antimoniato de potássio irradiado, (média±desvio-padrão, n=5).

Tempo (min)	Sangue (%)	Célula (%)	Plasma (%)
3	21,897±5,626	6,059±1,468	15,838±4,157
5	13,298±2,132	3,201±0,347	10,098±1,785
15	14,668±2,038	3,643±0,449	11,024±1,590
30	1,535±0,341	0,313±0,158	1,222±0,183
60	0,102±0,073	0,102±0,073	0,000±0,000
120	0,194±0,053	0,000	0,194±0,053
300	0,088±0,042	0,000	0,088±0,042
1440	0,186±0,070	0,000	0,186±0,070

Com a impossibilidade do presente estudo de distinguir a presença de antimônio trivalente e pentavalente, não é possível inferir sua localização sangüínea, mas sabe-se que devido a afinidade do antimônio trivalente com os eritrócitos e a afinidade do antimônio com alguns tecidos periféricos, podem ser fatos responsáveis pelo seu lento clareamento sangüíneo (Valladares *et al.*, 1996).

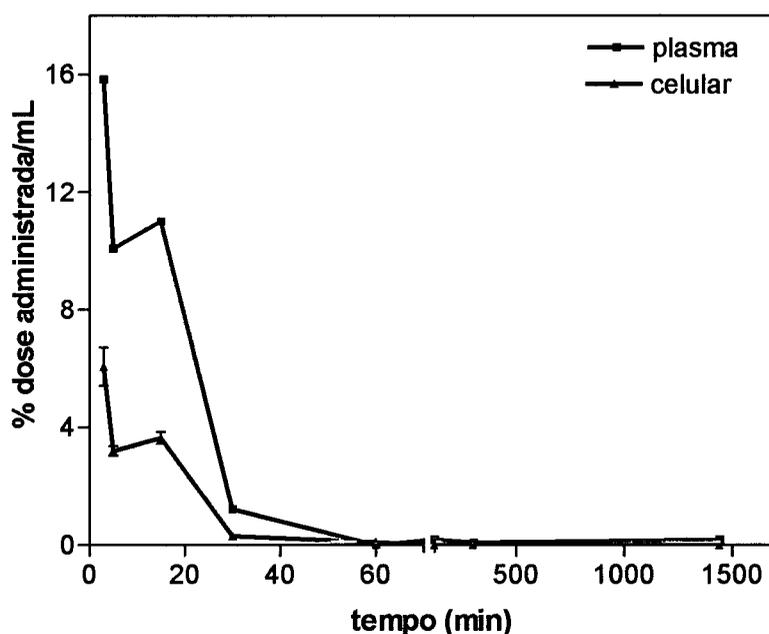


FIGURA 47 – Clareamento sanguíneo da dose administrada após injeção intraperitoneal do hexahidroxi antimônio de potássio irradiado em camundongos BALB/c saudáveis (média \pm desvio-padrão, n=5).

Após os estudos de biodistribuição do antimônio pentavalente livre, foi possível verificar que sua curva de decaimento é similar entre todos os órgãos, apresentando clareamento bastante rápido, mostrando o maior nível de antimônio no tempo inicial de sua administração e não permanecendo acumulado em nenhum órgão. Assim, sugere-se que a sua utilização não seja suficiente para suprimir a infecção e também, salienta a diferença da biodistribuição do antimônio de meglumina (antimônio pentavalente complexado), confirmando a manutenção da sua molécula, após o processo de irradiação.

É necessário ressaltar que diferenças metodológicas entre os inúmeros trabalhos relacionados à terapia e análise farmacocinética dos fármacos empregados no tratamento da leishmaniose, acarretam dificuldades quando se comparam os dados de efetividade dos fármacos e de sua biodistribuição (Hunter *et al.*, 1988). Modificações na via de administração da droga, na concentração da droga, tipo de formulação estudada, estágio de infecção, espécie usada, entre outros são alguns dos fatores que provocam estas alterações entre os dados apresentados na literatura.

Nos estudos apresentados, utilizando radiotraçadores de antimônio facilmente desenvolvidos pela irradiação por nêutrons mostrou que o seu uso

apresenta alta sensibilidade de detecção, além de ser uma análise simples e relativamente rápida. Enquanto, a metodologia analítica descrita na literatura para a determinação de antimônio baseia-se, principalmente em métodos colorimétricos, espectrometria de fluorescência atômica, voltametria anódica e espectrometria de absorção atômica que são demorados e de elevado custo, sendo inviáveis para o estudo de um grande número de amostras (Petit de Peña *et al.*, 1990).

Desta forma, a metodologia empregada no presente trabalho apresentou-se adequada, permitindo realizar novos estudos do antimônio, visto que são utilizados para o tratamento da leishmaniose, desde o início do século passado, e pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação, estrutura, composição química além de sua farmacocinética ainda não estar bem estabelecida. Não obstante os resultados acadêmicos obtidos, este estudo contribui para uma terapia mais eficaz, evitando relapsos, falhas no tratamento e a diminuição dos efeitos colaterais, pela determinação de uma dose e um período de administração mais efetivo.

A utilização de radiotraçadores pela irradiação com nêutrons mostrou ser uma ferramenta interessante para esclarecer algumas características dos antimoniais. Esta abordagem apresenta, além dos resultados diretos para a leishmaniose, significativos avanços indiretos para o estudo farmacocinético de compostos contendo átomos cuja irradiação por nêutrons permita a construção de radiotraçadores.

6. CONCLUSÕES

Geral:

Nesse trabalho, foi utilizado um radiotraçador de antimoniato de meglumina, a partir da irradiação por nêutrons. O composto apresentou uma eficiência biológica similar ao nativo e sua biodistribuição mostrou uma excreção êntero-hepática, nunca antes descrita para esta droga utilizada na terapia antileishmania.

Especificamente:

1. A irradiação do fármaco antimoniato de meglumina resultou na produção de dois radiotraçadores isotópicos de antimônio: ^{122}Sb e ^{124}Sb . O composto irradiado apresentou alta pureza radionuclídica, com boa atividade específica e com características fisiológicas para realizar os estudos de biodistribuição;

2. A análise química do antimoniato de meglumina irradiado indicou a presença de ligeiras alterações espectrofotométricas, provavelmente devido à formação de polímeros de meglumina;

3. As análises químicas e biológicas do antimoniato de meglumina irradiado indicaram que as amostras irradiadas por 7 minutos apresentam a menor taxa de alterações e manutenção da atividade biológica;

4. O antimoniato de meglumina irradiado apresentou eficácia similar ao fármaco nativo tanto no tratamento *in vitro* de macrófagos peritoneais infectados com *L.(L.) chagasi* como no tratamento *in vivo* de animais infectados com *L.(L.) chagasi*, comprovando a manutenção de sua atividade biológica, após o processo de irradiação;

5. A distribuição biológica do antimoniato de meglumina irradiado, por via intraperitoneal, revelou que o órgão de maior captação é representado pelo fígado, tanto nos animais sadios como nos infectados;

6. Órgãos como fígado e rins de animais sadios apresentaram uma maior captação que os mesmos órgãos de animais infectados;

7. O mesmo perfil de biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado foi verificado entre os animais sadios e infectados com *L.(L.) chagasi*;

8. O antimoniato de meglumina irradiado apresentou eliminação preferencialmente pela via hepática por excreção biliar, e uma pequena e rápida eliminação renal;

9. A curva de decaimento sérico do antimoniato de meglumina irradiado é representada por um modelo bicompartimental;

10. O antimônio pentavalente livre irradiado apresentou eliminação bastante rápida predominantemente pela via renal, com grande participação da eliminação pela via biliar; não permanecendo acumulado em nenhum órgão;

11. O antimônio pentavalente livre irradiado apresentou-se predominantemente no plasma, com clareamento lento, em relação à parte celular do sangue;

12. A diferença entre a biodistribuição do antimoniato de meglumina (antimônio pentavalente complexado) com a do antimônio pentavalente livre irradiado foi demonstrada, confirmando a preservação da molécula do antimoniato de meglumina após o processo de irradiação;

APÊNDICE 01 – Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em camundongos Balb/c sadios, % dose administrada/órgão (média±desvio-padrão, n=6).

Tempo (min)	Baço	Cérebro	Coração	Estômago	Fígado	Int. delgado	Int. grosso
3	1,935 ± 0,620	0,061 ± 0,017	0,220 ± 0,043	3,435 ± 2,849	26,415 ± 2,523	13,593 ± 2,140	5,666 ± 1,233
5	1,770 ± 0,225	0,073 ± 0,012	0,255 ± 0,043	2,150 ± 0,395	39,273 ± 3,766	10,792 ± 1,848	4,647 ± 1,388
15	0,953 ± 0,349	0,087 ± 0,029	0,288 ± 0,039	1,338 ± 0,420	49,978 ± 9,901	7,176 ± 0,720	2,216 ± 0,459
30	0,752 ± 0,213	0,043 ± 0,007	0,182 ± 0,070	0,635 ± 0,126	49,113 ± 3,532	6,601 ± 0,870	1,172 ± 0,506
60	0,719 ± 0,212	0,051 ± 0,012	0,195 ± 0,020	1,470 ± 0,537	44,850 ± 6,186	7,997 ± 1,429	1,695 ± 0,487
120	0,438 ± 0,123	0,029 ± 0,010	0,122 ± 0,033	1,264 ± 0,263	40,854 ± 3,734	6,786 ± 1,252	3,536 ± 1,761
300	0,149 ± 0,064	0,021 ± 0,004	0,052 ± 0,013	0,328 ± 0,133	25,306 ± 10,015	3,642 ± 0,940	17,494 ± 3,083
1440	0,170 ± 0,058	0,037 ± 0,007	0,040 ± 0,008	0,234 ± 0,045	22,009 ± 1,676	1,127 ± 0,230	1,598 ± 0,277
2880	0,078 ± 0,039	0,036 ± 0,017	0,030 ± 0,004	0,115 ± 0,017	10,926 ± 0,932	0,487 ± 0,029	0,968 ± 0,264
4320	0,099 ± 0,021	0,023 ± 0,005	0,021 ± 0,008	0,091 ± 0,056	7,221 ± 3,242	0,327 ± 0,043	0,553 ± 0,050

Tempo (min)	Músculo	Pulmão	Rins	Útero
3	8,604 ± 5,518	0,654 ± 0,228	1,372 ± 0,312	1,711 ± 0,645
5	16,481 ± 8,290	0,510 ± 0,058	1,770 ± 0,204	1,745 ± 0,881
15	9,523 ± 3,117	0,643 ± 0,164	2,180 ± 0,119	0,523 ± 0,140
30	9,404 ± 4,849	0,322 ± 0,135	1,761 ± 0,152	0,236 ± 0,082
60	9,448 ± 3,168	0,455 ± 0,103	1,535 ± 0,115	0,344 ± 0,135
120	4,943 ± 1,023	0,308 ± 0,137	1,118 ± 0,107	0,209 ± 0,030
300	3,968 ± 1,570	0,107 ± 0,036	0,416 ± 0,137	0,172 ± 0,146
1440	2,028 ± 0,512	0,078 ± 0,008	0,235 ± 0,048	0,058 ± 0,008
2880	1,488 ± 0,629	0,048 ± 0,012	0,149 ± 0,022	0,046 ± 0,007
4320	1,126 ± 0,365	0,034 ± 0,011	0,126 ± 0,014	0,023 ± 0,003

APÊNDICE 02 - Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em camundongos Balb/c infectados com *L. (L.) chagasi*, % dose administrada/órgão, (média±desvio-padrão, n=6).

Tempo (min)	Baço	Cérebro	Coração	Estômago	Fígado	Int. delgado	Int. grosso
3	1,877 ± 0,104	0,051 ± 0,011	0,146 ± 0,028	1,998 ± 0,264	21,118 ± 4,522	9,140 ± 1,791	4,222 ± 0,576
5	1,681 ± 0,510	0,054 ± 0,033	0,217 ± 0,019	1,477 ± 0,209	32,232 ± 2,884	9,884 ± 1,985	2,881 ± 0,317
15	1,099 ± 0,231	0,060 ± 0,012	0,305 ± 0,115	1,606 ± 0,333	38,766 ± 3,857	7,947 ± 1,004	2,921 ± 1,092
30	0,927 ± 0,175	0,037 ± 0,006	0,174 ± 0,026	0,820 ± 0,339	45,749 ± 10,158	9,292 ± 0,949	1,365 ± 1,297
60	0,750 ± 0,155	0,035 ± 0,011	0,184 ± 0,061	1,269 ± 0,262	34,942 ± 4,787	9,770 ± 1,112	1,947 ± 0,495
120	0,625 ± 0,187	0,030 ± 0,008	0,234 ± 0,100	1,277 ± 0,259	35,546 ± 3,554	6,573 ± 0,676	7,336 ± 3,153
300	0,340 ± 0,073	0,033 ± 0,007	0,073 ± 0,011	0,480 ± 0,157	29,841 ± 2,605	4,780 ± 1,315	18,087 ± 4,717
1440	0,236 ± 0,100	0,027 ± 0,005	0,036 ± 0,011	0,193 ± 0,042	16,591 ± 1,966	1,198 ± 0,183	2,613 ± 0,737
2880	0,199 ± 0,084	0,029 ± 0,004	0,030 ± 0,005	0,119 ± 0,023	12,411 ± 2,306	0,597 ± 0,191	1,371 ± 0,319
4320	0,123 ± 0,042	0,025 ± 0,005	0,026 ± 0,008	0,145 ± 0,038	7,101 ± 0,604	0,298 ± 0,035	0,877 ± 0,246

Tempo (min)	Músculo	Pulmão	Rins	Útero
3	7,180 ± 5,415	0,314 ± 0,088	1,043 ± 0,155	1,240 ± 0,566
5	8,865 ± 3,821	0,431 ± 0,066	1,657 ± 0,364	1,143 ± 0,317
15	6,702 ± 1,129	0,745 ± 0,199	1,910 ± 0,147	0,491 ± 0,125
30	4,885 ± 1,109	0,311 ± 0,078	1,655 ± 0,402	0,315 ± 0,122
60	5,614 ± 2,274	0,428 ± 0,095	1,428 ± 0,190	0,341 ± 0,112
120	5,583 ± 2,687	0,504 ± 0,255	1,043 ± 0,072	0,249 ± 0,119
300	3,516 ± 0,539	0,136 ± 0,055	0,475 ± 0,032	0,129 ± 0,044
1440	2,033 ± 0,418	0,060 ± 0,018	0,188 ± 0,025	0,053 ± 0,018
2880	1,624 ± 0,505	0,046 ± 0,005	0,152 ± 0,019	0,049 ± 0,004
4320	1,536 ± 0,3529	0,038 ± 0,011	0,121 ± 0,011	0,031 ± 0,010

APÊNDICE 03 – Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em camundongos Balb/c sadios, % dose administrada/grama de órgão, (média±desvio-padrão, n=6).

Tempo (min)	Baço	Cérebro	Coração	Estômago	Fígado	Int. delgado	Int. grosso
3	24,198 ± 6,182	0,144 ± 0,035	2,807 ± 0,595	17,129 ± 12,847	32,961 ± 6,091	13,893 ± 4,522	9,094 ± 2,469
5	35,740 ± 14,146	0,224 ± 0,031	7,113 ± 3,934	16,073 ± 4,804	54,775 ± 6,895	11,398 ± 2,714	6,777 ± 2,250
15	11,570 ± 4,611	0,241 ± 0,044	3,532 ± 0,870	7,583 ± 2,750	62,477 ± 13,107	6,880 ± 1,171	2,808 ± 0,467
30	10,766 ± 5,111	0,120 ± 0,019	3,039 ± 0,495	3,952 ± 1,140	60,960 ± 5,253	7,350 ± 1,615	1,538 ± 0,462
60	8,626 ± 1,267	0,143 ± 0,031	2,606 ± 0,301	6,981 ± 1,714	56,568 ± 6,715	7,862 ± 0,980	2,303 ± 0,739
120	6,470 ± 2,413	0,077 ± 0,026	2,191 ± 0,580	6,492 ± 1,042	51,957 ± 6,719	6,613 ± 0,668	5,013 ± 2,244
300	1,452 ± 0,563	0,047 ± 0,010	0,504 ± 0,163	1,354 ± 0,531	24,065 ± 10,923	3,521 ± 0,853	19,311 ± 6,362
1440	1,624 ± 0,572	0,077 ± 0,011	0,380 ± 0,085	0,911 ± 0,155	21,050 ± 4,942	0,968 ± 0,165	1,543 ± 0,220
2880	0,711 ± 0,385	0,078 ± 0,037	0,270 ± 0,026	0,344 ± 0,113	10,115 ± 1,752	0,344 ± 0,058	1,008 ± 0,276
4320	0,838 ± 0,284	0,050 ± 0,011	0,175 ± 0,051	0,292 ± 0,153	6,248 ± 2,829	0,243 ± 0,034	0,511 ± 0,050

Tempo (min)	Músculo	Pulmão	Rins	Útero
3	0,140 ± 0,069	3,590 ± 0,999	6,012 ± 1,291	18,431 ± 2,743
5	0,107 ± 0,017	4,600 ± 1,480	10,677 ± 2,659	15,199 ± 2,847
15	0,083 ± 0,008	4,150 ± 1,650	9,979 ± 2,352	4,758 ± 1,160
30	0,065 ± 0,028	2,379 ± 0,839	8,440 ± 0,775	3,708 ± 1,177
60	0,081 ± 0,027	2,663 ± 0,502	6,744 ± 0,646	3,222 ± 1,978
120	0,059 ± 0,019	2,099 ± 0,812	5,033 ± 0,794	2,679 ± 1,043
300	0,053 ± 0,020	0,463 ± 0,166	1,373 ± 0,485	1,495 ± 0,819
1440	0,029 ± 0,006	0,363 ± 0,095	0,819 ± 0,170	0,601 ± 0,148
2880	0,025 ± 0,007	0,211 ± 0,037	0,492 ± 0,109	0,260 ± 0,077
4320	0,016 ± 0,003	0,140 ± 0,029	0,393 ± 0,036	0,142 ± 0,059

APÊNDICE 04 – Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em camundongos Balb/c infectados com *L. (L.) chagasi*, % dose administrada/grama de órgão, (desvio-padrão, n=6).

Tempo (min)	Baço	Cérebro	Coração	Estômago	Fígado	Int. delgado	Int. grosso
3	19,620 ± 4,433	0,108 ± 0,017	1,810 ± 0,191	11,875 ± 1,602	23,199 ± 4,554	8,911 ± 1,191	6,281 ± 1,293
5	13,389 ± 4,490	0,149 ± 0,084	2,362 ± 0,333	7,896 ± 1,700	31,505 ± 5,877	7,219 ± 1,398	3,777 ± 0,161
15	9,147 ± 1,4243	0,167 ± 0,033	3,169 ± 0,846	8,322 ± 1,515	37,023 ± 9,986	8,498 ± 1,344	3,013 ± 0,345
30	7,660 ± 1,510	0,090 ± 0,015	1,919 ± 0,337	3,823 ± 1,043	51,979 ± 12,220	9,224 ± 2,119	1,591 ± 1,064
60	6,382 ± 1,233	0,091 ± 0,027	2,309 ± 0,662	6,865 ± 1,213	37,305 ± 6,806	9,677 ± 2,492	2,501 ± 0,516
120	4,989 ± 0,832	0,078 ± 0,021	2,567 ± 1,027	6,525 ± 1,190	39,921 ± 5,937	7,005 ± 1,190	7,434 ± 1,578
300	2,439 ± 0,535	0,068 ± 0,013	0,660 ± 0,083	2,096 ± 0,488	27,067 ± 2,602	4,224 ± 0,784	19,595 ± 4,61
1440	1,601 ± 0,792	0,069 ± 0,015	0,302 ± 0,072	0,787 ± 0,274	13,516 ± 2,409	0,961 ± 0,227	2,375 ± 0,462
2880	1,246 ± 0,568	0,079 ± 0,014	0,259 ± 0,040	0,455 ± 0,076	9,613 ± 1,835	0,440 ± 0,112	1,063 ± 0,348
4320	0,646 ± 0,222	0,067 ± 0,011	0,209 ± 0,070	0,391 ± 0,125	5,310 ± 0,838	0,251 ± 0,049	0,663 ± 0,291

Tempo (min)	Músculo	Pulmão	Rins	Útero
3	0,105 ± 0,102	1,929 ± 0,432	4,152 ± 0,827	13,521 ± 5,633
5	0,104 ± 0,059	2,177 ± 0,409	5,942 ± 0,886	5,899 ± 1,511
15	0,076 ± 0,012	3,278 ± 0,888	6,619 ± 0,560	4,490 ± 1,070
30	0,051 ± 0,005	1,657 ± 0,441	5,951 ± 1,031	2,453 ± 0,553
60	0,075 ± 0,018	2,144 ± 0,503	5,168 ± 0,730	2,985 ± 0,515
120	0,051 ± 0,020	2,371 ± 0,938	3,978 ± 0,444	2,805 ± 1,203
300	0,054 ± 0,007	0,623 ± 0,176	1,599 ± 0,055	1,099 ± 0,193
1440	0,035 ± 0,005	0,284 ± 0,026	0,627 ± 0,101	0,344 ± 0,066
2880	0,030 ± 0,009	0,212 ± 0,022	0,411 ± 0,063	0,263 ± 0,072
4320	0,022 ± 0,009	0,161 ± 0,029	0,354 ± 0,037	0,163 ± 0,056

APÊNDICE 05 – Biodistribuição do antimoniato de meglumina irradiado em camundongos Balb/c sadios e infectados com *L. (L.) chagasi*, % dose administrada/órgão, (desvio-padrão, n=6), * = diferença estatisticamente significativa (P<0,05).

Tempo (min)	Baço Sadio	Baço Infectado	Cérebro Sadio	Cérebro Infectado	Coração Sadio	Coração Infectado
3	1,935 ± 0,620	1,877 ± 0,104	0,061 ± 0,017	0,051 ± 0,011	0,220 ± 0,043	0,146 ± 0,028 *
5	1,770 ± 0,225	1,681 ± 0,510	0,073 ± 0,012	0,054 ± 0,033	0,255 ± 0,043	0,217 ± 0,019
15	0,953 ± 0,349	1,099 ± 0,231	0,087 ± 0,029	0,060 ± 0,012	0,288 ± 0,039	0,305 ± 0,115
30	0,752 ± 0,213	0,927 ± 0,175	0,043 ± 0,007	0,037 ± 0,006	0,182 ± 0,070	0,174 ± 0,026
60	0,719 ± 0,212	0,750 ± 0,155	0,051 ± 0,012	0,035 ± 0,011 *	0,195 ± 0,020	0,184 ± 0,061
120	0,438 ± 0,123	0,625 ± 0,187	0,029 ± 0,010	0,030 ± 0,008	0,122 ± 0,033	0,234 ± 0,100 *
300	0,149 ± 0,064	0,340 ± 0,073 *	0,021 ± 0,004	0,033 ± 0,007 *	0,052 ± 0,013	0,073 ± 0,011 *
1440	0,170 ± 0,058	0,236 ± 0,100	0,037 ± 0,007	0,027 ± 0,005	0,040 ± 0,008	0,036 ± 0,011
2880	0,078 ± 0,039	0,199 ± 0,084 *	0,036 ± 0,017	0,029 ± 0,004 *	0,030 ± 0,004	0,030 ± 0,005
4320	0,099 ± 0,021	0,123 ± 0,042	0,023 ± 0,005	0,025 ± 0,005	0,021 ± 0,008	0,026 ± 0,008

Tempo (min)	Estômago Sadio	Estômago Infectado	Fígado Sadio	Fígado Infectado	Int. delgado Sadio	Int. delg.Infectado
3	3,435 ± 2,849	1,998 ± 0,264	26,415 ± 2,523	21,118 ± 4,522 *	13,593 ± 2,140	9,140 ± 1,791 *
5	2,150 ± 0,395	1,477 ± 0,209 *	39,273 ± 3,766	32,232 ± 2,884 *	10,792 ± 1,848	9,884 ± 1,985
15	1,338 ± 0,420	1,606 ± 0,333	49,978 ± 9,901	38,766 ± 3,857 *	7,176 ± 0,720	7,947 ± 1,004
30	0,635 ± 0,126	0,820 ± 0,339	49,113 ± 3,532	45,749 ± 10,158	6,601 ± 0,870	9,292 ± 0,949 *
60	1,470 ± 0,537	1,269 ± 0,262	44,850 ± 6,186	34,942 ± 4,787 *	7,997 ± 1,429	9,770 ± 1,112 *
120	1,264 ± 0,263	1,277 ± 0,259	40,854 ± 3,734	35,546 ± 3,554 *	6,786 ± 1,252	6,573 ± 0,676
300	0,328 ± 0,133	0,480 ± 0,157	25,306 ± 10,015	29,841 ± 2,605	3,642 ± 0,940	4,780 ± 1,315
1440	0,234 ± 0,045	0,193 ± 0,042	22,009 ± 1,676	16,591 ± 1,966 *	1,127 ± 0,230	1,198 ± 0,183
2880	0,115 ± 0,017	0,119 ± 0,023	10,926 ± 0,932	12,411 ± 2,306	0,487 ± 0,029	0,597 ± 0,191
4320	0,091 ± 0,056	0,145 ± 0,038	7,221 ± 3,242	7,101 ± 0,604	0,327 ± 0,043	0,298 ± 0,035

Tempo (min)	Int. grosso Sadio	Int. grosso Infectado	Músculo Sadio	Músculo Infectado	Pulmão Sadio	Pulmão Infectado
3	5,666 ± 1,233	4,222 ± 0,576 *	8,604 ± 5,518	7,180 ± 5,415	0,654 ± 0,228	0,314 ± 0,088 *
5	4,647 ± 1,388	2,881 ± 0,317 *	16,481 ± 8,290	8,865 ± 3,821	0,510 ± 0,058	0,431 ± 0,066
15	2,216 ± 0,459	2,921 ± 1,092	9,523 ± 3,117	6,702 ± 1,129	0,643 ± 0,164	0,745 ± 0,199
30	1,172 ± 0,506	1,365 ± 1,297	9,404 ± 4,849	4,885 ± 1,109 *	0,322 ± 0,135	0,311 ± 0,078
60	1,695 ± 0,487	1,947 ± 0,495	9,448 ± 3,168	5,614 ± 2,274 *	0,455 ± 0,103	0,428 ± 0,095
120	3,536 ± 1,761	7,336 ± 3,153 *	4,943 ± 1,023	5,583 ± 2,687	0,308 ± 0,137	0,504 ± 0,255
300	17,494 ± 3,083	18,087 ± 4,717	3,968 ± 1,570	3,516 ± 0,539	0,107 ± 0,036	0,136 ± 0,055
1440	1,598 ± 0,277	2,613 ± 0,737 *	2,028 ± 0,512	2,033 ± 0,418	0,078 ± 0,008	0,060 ± 0,018
2880	0,968 ± 0,264	1,371 ± 0,319 *	1,488 ± 0,629	1,624 ± 0,505	0,048 ± 0,012	0,046 ± 0,005
4320	0,553 ± 0,050	0,877 ± 0,246 *	1,126 ± 0,365	1,536 ± 0,3529	0,034 ± 0,011	0,038 ± 0,011

Tempo (min)	Rins Sadio	Rins Infectado	Útero Sadio	Útero Infectado
3	1,372 ± 0,312	1,043 ± 0,155 *	1,711 ± 0,645	1,240 ± 0,566
5	1,770 ± 0,204	1,657 ± 0,364	1,745 ± 0,881	1,143 ± 0,317
15	2,180 ± 0,119	1,910 ± 0,147	0,523 ± 0,140	0,491 ± 0,125
30	1,761 ± 0,152	1,655 ± 0,0402	0,236 ± 0,082	0,315 ± 0,122
60	1,535 ± 0,115	1,428 ± 0,190	0,344 ± 0,135	0,341 ± 0,112
120	1,118 ± 0,107	1,043 ± 0,072	0,209 ± 0,030	0,249 ± 0,119
300	0,416 ± 0,137	0,475 ± 0,032	0,172 ± 0,146	0,129 ± 0,044
1440	0,235 ± 0,048	0,188 ± 0,025	0,058 ± 0,008	0,053 ± 0,018
2880	0,149 ± 0,022	0,152 ± 0,019	0,046 ± 0,007	0,049 ± 0,004
4320	0,126 ± 0,014	0,121 ± 0,011	0,023 ± 0,003	0,031 ± 0,010

APÊNDICE 06 – Biodistribuição do hexahidroxi antimônio de potássio irradiado em camundongos Balb/c sadios, % dose administrada/órgão, (média±desvio-padrão, n=6).

Tempo (min)	Baço	dp	Cérebro	dp	Coração	dp	Estômago	dp	Fígado	dp	Int. delgado	dp
3	0,710	0,212	0,098	0,007	0,313	0,051	1,519	0,659	4,873	1,975	18,348	5,890
5	0,673	0,131	0,077	0,012	0,191	0,013	1,735	0,233	4,880	0,906	9,801	2,975
15	0,235	0,054	0,080	0,005	0,185	0,036	0,611	0,122	2,182	0,363	4,845	0,548
30	0,045	0,013	0,047	0,006	0,022	0,005	0,122	0,010	0,379	0,018	0,890	0,079
60	0,021	0,004	0,006	0,003	0,015	0,006	0,029	0,008	0,082	0,011	0,154	0,031
120	0,020	0,004	0,011	0,004	0,014	0,005	0,022	0,007	0,097	0,019	0,176	0,040
300	0,021	0,005	0,020	0,012	0,010	0,004	0,019	0,010	0,052	0,009	0,183	0,129
1440	0,022	0,005	0,015	0,003	0,008	0,004	0,037	0,009	0,235	0,038	0,154	0,045
2880	0,022	0,002	0,034	0,001	0,000	0,000	0,071	0,029	0,194	0,029	0,203	0,016

Tempo (min)	Int. grosso	dp	Músculo	dp	Pulmão	dp	Rins	dp	Útero	dp
3	6,135	1,186	35,821	8,506	1,032	0,094	7,730	1,105	1,720	0,722
5	6,129	1,224	17,638	2,816	0,646	0,017	4,031	0,605	2,163	0,414
15	1,876	0,457	14,965	2,390	0,611	0,088	4,235	0,481	0,434	0,199
30	0,403	0,040	3,463	1,834	0,098	0,015	0,453	0,096	0,098	0,012
60	0,135	0,026	0,833	0,656	0,013	0,002	0,036	0,011	0,037	0,004
120	0,097	0,013	1,022	0,130	0,009	0,000	0,017	0,009	0,020	0,008
300	0,062	0,018	1,388	0,437	0,020	0,014	0,015	0,006	0,013	0,003
1440	0,252	0,068	1,067	0,481	0,029	0,011	0,139	0,022	0,017	0,002
2880	0,517	0,097	0,000	0,000	0,010	0,004	0,080	0,008	0,008	0,004

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL JASSER, M.; EL-YAZIGI, A.; KOJAN, M.; CROFT, S.L. Skin uptake, distribution and elimination of antimony following administration of sodium stibogluconate to patients with cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, v.39, p.516-519, 1995.
2. ARAUJO, ELAINE B. DE. *Conjuntos de reativos liofilizados de compostos diaminoditiólicos para marcação com tecnécio-99m .Estudo farmacocinético e elaboração de modelos compartimentalizados dos respectivos complexos*. 1995. Tese (Doutoramento) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
3. BAILLIE, A.J.; DOLAN, T.F.; ALEXANDER, J.; CARTER, K.C. Visceral leishmaniasis in the BALB/c mouse: sodium stibogluconate treatment during acute and chronic stages of infection. *Int. J. Pharm.*, v.57, p.23-28, 1989.
4. BAILLY, R.; LAUWERYS, R.; BUCHET, J.P.; MAHIEU, P.; KONINGS, J. Experimental and human studies on antimony metabolism: their relevance for the biological monitoring of workers exposed to inorganic antimony. *Br. J. Ind. Méd.*, v.48, p.93-97, 1991.
5. BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, J.C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharmac.*, v.30, p. 435-443, 1998.
6. BERMAN, J. D.; GALLALEE, J.F.; GALLALEE, J.V. Pharmacokinetics of pentavalent antimony (Pentostan) in hamsters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.39, p.41-45, 1988.
7. BERMAN, J.D. & FLECKENSTEIN, L. Pharmacokinetic justification of antiprotozoal therapy: a US perspective. *Clin. Pharmacokinetic.*, v.21, p.479-493, 1991.
8. BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.*, v.24, p.684-703, 1997.
9. BRITO, C.; RAVEL, C.; BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGÉS, M.; DEDET, J.-P.; WINCKER, P. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*, v.222, p. 107-117, 1998.
10. BROWNELL, G.L.; BERMAN, M.; ROBERTSON, J.S. Nomenclature for tracer kinetics. *Int. J. Appl. Radiat. Isto.*, v.19, p.249-262, 1968.

11. BYRN, S.R.; ANN, W.; Newman, W. Chemical reactivity in solid-state pharmaceuticals: formulation implications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.48, p.115-136, 2001.
12. CÁRCAMO, E.C. Introduction a la farmacocinetica. Washington, D.C., 1982.
13. CARTER, K.C.; BAILLIE, A.J.; ALEXANDER, J.; DOLAN, T.F. The therapeutic effect of sodium stibogluconate in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani* is organ-dependent. *J.Pharm.Pharmacol.*, v.40, p.370-373, 1988.
14. CENTRO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE), Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_auto9904. Acessado em 23/05/2005.
15. CHAKRAVARTI, R.N. & SEM GUPTA, P.C. Urinary excretion of antimony after administration of methyl glucamine antimoniate. *Ind. Méd. Gaz.*, p.388-391, 1950.
16. CHULAY, J.D.; FLECKENSTEIN, L.; SMITH, D.H. 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.
17. COHEN, Y. Transport function of the blood. Pharmacological studies using radioisotopes. *J.Nucl.Biol.Med.*, v.12, p.26-34, 1968.
18. COLLINS, M.; CARTER, K.C.; BAILLIE, A.J. Visceral leishmaniasis in the BALB/c mouse: antimony tissue disposition and parasite suppression after the administration of free stibogluconate. *Ann.Trop.Med.Parasitol.*, v.86, p.35-40, 1992.
19. COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN). Disponível em: <<http://www2.cnem.gov.br/ensino/apostilas.asp>>. Acesso em: 09/10/2003.
20. CONTIJO, B. & CARVALHO, M.L.R. de. American cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, p.71-80, 2003.
21. CROFT, S.L. & COOMBS, G.H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.*, v.19, p.502-508, 2003.
22. CROFT, S.L.; NEAME, K.D.; HOMEWOOD, C.A. Accumulation of [125Sb] sodium stibogluconate by *Leishmania mexicana amazonensis* and *Leishmania donovani* in vitro. *Comp. Biochem.Physiol C.*, v.68C, p.95-98, 1981.

23. CURL, J.L.; PETERS, L.L. Ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride anesthesia in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Labor. Anim.* v.17, p.290-293, 1983.
24. DAVIES, C.R.; KAYE, P.; CROFT, S.L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ*, v.326, p.377-382, 2003.
25. DEMICHELI, C.; OCHOA, R.; LULA, I.S.; GOZZO, F.C.; EBERLIN, M.N.; FREZARD, F. Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimoniate. *Appl. Organometal. Chem.*, v.17, p.226-231, 2003.
26. DENTON, H.; MCGREGOR, J.C.; COOMBS, G.H. Reduction of pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol dependent antileishmanial reductase TDR1. *Biochem. J.*, v.1, p.405-12, 2004.
27. DESJEUX, P. Leishmaniasis, public health aspects and control. *Clin. Dermatol.*, v. 14, p.417-423, 1996.
28. DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: BRASILEIRO FILHO, G. *Patologia*. 6.ed. Rio de Janeiro, R.J.: Guanabara Koogan, 2000, p.1215-1227.
29. FLORIO, J.C. Absorção, distribuição, biotransformação e eliminação. In: SPINOSA, H. DE S.; GORNIK, S.Z.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária*. 3.ed. Rio de Janeiro, RJ.: Guanabara Koogan, 2002.
30. FRANCO, M.A.; BARBOSA, A.C.; RATH, S.; DOREA, J.G. Antimony oxidation states in antileishmanial drugs. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.*, v.52, p.435-437, 1995.
31. FREZARD, F.; DEMICHELI, C.; FERREIRA, C.S.; COSTA, M.A. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.45, p.913-916, 2001.
32. FRIES, J. & GETROST, H. Organic reagents for trace analysis. *E. Merck Darmstadt*, p.33-34, 1977.
33. GARNHAM, P.C.C. Introduction. In: PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, v.1, London: Academic Press Inc., 1987.
34. GELLHORN, A. & VAN DYKE, H.B. The correlation between distribution of antimony in tissues and chemotherapeutic effect in experimental leishmaniasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 88, p.162-172, 1946.

35. GOODWIN, L.G.; PAGE, J.E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem. Jour.*, v.37, p.198-209, 1943.
36. GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.; BRYCESON, A.D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.*, v.2, p.494-501, 2002.
37. HEADLEY, J.V.; YONG, M.S.; BROOKS, P.W.; PHILLIPS, A. G. Fast-atom bombardment mass spectrometry of the organometallic parasiticide, meglumine antimoniate. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, v.9, p.372-376, 1995.
38. HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis: an overview. *J. Postgrad. Méd.*, v.49, p.50-4, 2003.
39. HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. *Lancet.* , v.354, p.1191-99, 1999.
40. HUNTER, C.A.; DOLAN, T.F.; COOMBS, G.H.; BAILLIE, A.J. Vesicular systems (niosomes and liposomes) for delivery of sodium stibogluconate in experimental murine visceral leishmaniasis. *J.Pharm.Pharmacol.*, v.40, p.161-165, 1988.
41. JONES, D.E.; ELLOSO M.M.; SCOTT, P. Host susceptibility factors to cutaneous leishmaniasis. *Front. in Biosci.*, v.3, p.1171-1180, 1998.
42. LUGO DE YARBUH, A.; PETIT DE PEÑA, Y.; BURGUERA, J.L.; BURGUERA, M. Antimony determination in tissues and serum of hamster infects with *Leishmania garnhami* and treated with meglumine antimoniate. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.88, p.37-41, 1994.
43. MAGILL, A.J. Leishmaniasis. In: STICKLAND, G.T. *Hunter's Tropical Medicine and Emergins Infections Diseases*. 8. ed., 2000.
44. MARSDEN, P. D.; NONATA, R. R. Mucocutaneous Leishmaniasis - A review of clinical aspects. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.9, p. 309-326, 1975.
45. MARSDEN, P.D. Pentavalent antimonials: old drug for news diseases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.18, p.187-198, 1985.
46. MEIKLE S.R.; EBERL S.; IIDA, H. Instrumentation and methodology for quantitative pre-clinical imaging studies. *Curr. Pharm. Des.*, v. 7, p. 1945-66, 2001.

47. MICHAELS, H.B. & HUNT, J.W. A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. *Radiat. Res.*, v.74, p.23-34, 1978.
48. MISHA, M.; BISWAS, U.K.; JHA, A.M.; KHAN, A. B. Amphotericin versus stibogluconate in first line treatment of Indian Kala- Azar. *Lancet.*, v.344, p.1599-1600, 1994.
49. MURRAY, H. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.45, p.2185-2197, 2001.
50. MURPHY, C.A. DE. *Manual de Radiofarmacocinetica*. 1. ed. México.: Departamento de Medicina Nuclear, 1992.
51. NEVES, M.; KLING, A.; LAMBRECHT, R.M. Radionuclide production for therapeutic radiopharmaceuticals. *Appl. Radiat. Isot.*, v.57, p.657-664, 2002.
52. OLIVEIRA, C.C.G.; LACERDA, H.G.; MARTINS, D.; BARBOSA, J.D.A.; MONTEIRO, G.R.; QUEIROZ, J.W.; SOUSA, J.M.A.; XIMENES, M.F.F.M.; JERONIMO, S.M.B. Changing epidemiology of american cutaneous leishmaniasis (acl) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Trop.*, v.90, p.155-162, 2004.
53. OTTO, G.F. & MAREN, T.H. VI. Studies on the excretion and concentration of antimony in blood and other tissues following the injection of trivalent and pentavalent antimonials into experimental animals. *Am. J. Hyg.*, v.51, p.370-385, 1950.
54. OTTO, G.F.; MAREN, T.H.; BROWN, H.W. Blood levels and excretion rates of antimony in persons receiving trivalent and pentavalent antimonials. *A. J. H.*, v.46, p.193-211, 1947.
55. OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.* v.7, p.257-266, 2004.
56. PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. *Introduction to spectroscopy*. a guide for students of organic chemistry. 3. ed. Brooks/Cole, Thomson Learning, 2001.
57. PAMPLIN, C.L.; DESJARDINS, R.; CHULAY, J.D.; TRAMONT, E.; HENDRICKS, L.; CANFIELD, C. Pharmacokinetics of antimony during sodium stibogluconate therapy for cutaneous leishmaniasis. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.29, p.270-271, 1981.

58. PAREDES, R.; MUÑOZ, J.; DIAZ, I.; DOMINGO, P.; GURGUI, M.; CLOTET, B. Leishmaniasis in HIV infection. *J. Postgrad. Méd.*, v. 49, p.39-49, 2003.
59. PAUMGARTTEN, F.J.R. & CHAHOUD, I. Embryotoxicity of meglumine antimoniate in the rat. *Reprod. Toxicol.*, v. 15, p.327-331, 2001.
60. PAYTON, A.J.; FORSYTHE, D.B.; DIXON, D.; MYERS, P.H.; CLARK, J.A.; SNIPE, J.R. Evaluation of ketamine –xylazine in syrian hamsters. *Cornell. Vet.*, v.83, p.153-161, 1993.
61. PETIT DE PEÑA, Y.; GALLIGNANI, M.; BURGUERA, M.; BURGUERA, J.L.; AÑEZ, A.; LUGOY., A. Selective determination of antimony (III) and antimony(V) in blood serum and urine by hydride generation and atomic absorption spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.1, p.72-75, 1990.
62. PETIT DE PENA, Y; VIELMA, O.; BURGUERA, J.L.; BURGUERA, M.; RONDOÑ, C.; CARRERO, P. On-line determination of antimony(III) and antimony(V) in liver tissue and whole blood by flow injection – hydride generation – atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 55, p.743–754, 2001.
63. PLOUX, L. & MASTRIPPOLITO, R. In vivo radiolabel quantification in small-animal models. *Nucl. Med. Biol.*, v. 25, p.737–742, 1999.
64. RATH, S.; JARDIM, F.W.; DOREA, J.G. A simple spectrophotometric procedure for the determination of antimony (III) and (V) in antileishmanial drugs. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 358, p. 548-550, 1997.
65. RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N. DE; MARZAL, P.C.; ANDRADE JR., H.F. DE; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim. Nova*, v.26, p.550-555, 2003.
66. REES, P.H.; KEATING, M.I.; KAGER, P.A.; HOCKMEYER, W.T. Renal clearance of pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Lancet*, v.2, p.226-229, 1980.
67. ROBERTS, W.; MCMURRAY, W.J.; RAINEY, P.M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimoniate (glucantime). *Antimicrob. Agents. Chemother.*, v.42, p.1076-1082, 1998.
68. ROBERTS, W.L. & RAINEY, P.M. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.37, p.1842-1846, 1993.

69. ROBERTS, W.L.; BERMAN, J.D.; RAINEY, P.M. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. ***Antimicrob. Agents Chemother.***, v.39, p.1234-1239, 1995.
70. ROMERO, G.A.S.; OLIVEIRA, M.R.F.; DALMO, C.; MARSDEN, P.D. Características físico-químicas do antimoniato de meglumina em diferentes condições de armazenamento. ***Rev. Soc. Bras. Med. Trop.***, v.29, p.461-465, 1996.
71. SALEEM, A.; ABOAGYE, E.O.; PRICE, P.M. In vivo monitoring of drugs using radiotracer techniques. ***Adv. Drug Deliv. Rev.***, v.41, p.21-39, 2000.
72. SANTOS FERREIRA, C.; MARTINS, P.S.; DEMICHELI, C.; BROCHU, C.; OUELLETTE, M.; FREZARD, F. Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. ***Biomaterials***, v.16, p. 441-446, 2003.
73. SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; ZEMZOUMI, K.; MAQUAIRE, S.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J.L. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. ***Antimicrob. Agents Chemother.***, v.42, p.3097-3102, 1998.
74. SHAKED-MISHAN, P.; ULRICH, N.; EPHROS, M.; ZILBERSTEIN, D. Novel intracellular Sb V reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. ***J. Biol. Chem.***, v.276, p.3971-3976, 2001.
75. SILVER, J.A.; WORSNOP, D.R.; FREEDMAN, A.; KOLB, C.E. Absolute photodissociation cross section of gas phase sodium chloride at room temperature. ***J. Chem. Phys.***, v.84, p. 4378-4384, 1986.
76. SINGH, S. & SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. ***J. Infect. Chemother.***, v.10, p.307-315, 2004.
77. STAUBER, L.A.; FRANCHINO, E.M.; GRUN, J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golden hamsters. ***J. Protozool.***, v.5, p.269-273, 1958.
78. STEMMER, K.L. Pharmacology and toxicology of heavy metals: antimony. ***Pharmac. Ther. A.***, v.1, p.157-160, 1976.
79. SUNDAR, S. & RAÍ, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. ***Curr. Opin. Infect. Dis.***, v.15, p.593-98, 2002.

80. TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYOMA, M.; TSUKAMOTO, M. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods*, v.93, p.157-165, 1986.
81. TASSI, P.; ORMAS, P.; MADONNA, M.; CARLI, S.; BELLOLI, C.; DE NATALE, G.; CECI, L.; MARCOTRIGIANO, G.O. Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res. Vet. Sci.*, v.56, p.144-150, 1994.
82. TEMPONE, A.G.; SILVA, A.C.M.P. DA; BRANDT, C.A.; MARTINEZ, F.S.; BORBOREMA, S.E.T.; SILVEIRA, M.A.B. DA; ANDRADE JR, H.F. DE. Synthesis and antileishmanial activities of novel 3-substituted quinolines. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, v.49, p. 1076-1080, 2005.
83. TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; ANDRADE JR, H.F. DE; GUALDA, N.C.A, YOGI, A.; CARVALHO, C.S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid- producing families. *Phytomedicine*, v.12, p. 382-390, 2005.
84. TROUILLER, P.; OLLIARO, P. L.; TIRRELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and public health policy failure. *Lancet*, v.359, p.2188-2194, 2002.
85. 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.181-3, 1996.
86. VALLADARES, J.E.; FREIXAS, J.; ALBEROLA, J.; FRANQUELO, C.; CRISTOFOL, C.; ARBOIX, M. Pharmacokinetics of liposome-encapsulated meglumine antimoniate after intramuscular and subcutaneous administration in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.57, p.403-406, 1997.
87. VALLADARES, J.E.; RIERA, C.; GONZALEZ-ENSENYAT, P.; DÍEZ-CASCÓN, A.; RAMOS, G.; SOLANO-GALLEGO, L.; GALLEGO, M.; PORTÚS, M.; FREIXAS, J.; ALBEROLA, J.; ARBOIX, M. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniasis using an antimony liposomal formulation. *Vet. Parasitol.*, v.97, p.15-21, 2001.
88. WEAST, R.C. *Handbook of chemistry and physics*. 59.ed. Florida: CRC Press, Inc, 1978-79.
89. WILKINSON, R.G. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: GOODMAN & GILMAN'S. *The pharmacological basis of therapeutics* 10.ed. New York. N.Y.:Mc Graw-Hiel, 2001.

90. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Division of Control of Tropical Diseases. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>>. Acessado em 28/10/2003.
91. YAN, S.; LI, F.; DING, K.; SUN, H. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony (III) and trypanothione. *J. Biol. Inorg. Chem.*, v.8, p.689-697, 2003.