

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAROLINA SOUZA ANDRADE LICIO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO ANTIMÔNIO TRIVALENTE:
FORMAS LIVRE OU LIPOSSOMAL ASSOCIADAS OU NÃO À ADMINISTRAÇÃO
DE ÁCIDO ASCÓRBICO**

Ouro Preto – Minas Gerais

2013

CAROLINA SOUZA ANDRADE LICIO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO ANTIMÔNIO TRIVALENTE:
FORMAS LIVRE OU LIPOSSOMAL ASSOCIADAS OU NÃO À ADMINISTRAÇÃO
DE ÁCIDO ASCÓRBICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma) da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas

Orientadora: Dra. Neila Márcia Silva Barcellos

Co-orientadora: Dra. Mônica Cristina Teixeira

Ouro Preto – Minas Gerais

2013

L711e Licio, Carolina Souza Andrade.

Avaliação da Toxicidade Aguda do Antimônio Trivalente: formas livres ou Lipossomal associadas ou não à administração de ácido ascórbico. [manuscrito] / Carolina Souza Andrade Licio – 2013.

115 f. : il. color.; grafs.; tabs.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Neila Márcia Silva Barcellos.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mônica Cristina Teixeira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma).

Área de concentração: Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas.

1. Antimônio 2. Toxicidade aguda 3. Vitamina C. 4. Camundongo.

I. Universidade Federal de Ouro Preto II. Título.

CDU: 615

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



MINISTERIO DA EDUCACAO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



Sessão de defesa da 80ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a CAROLINA SOUZA ANDRADE LÍCIO com a defesa da dissertação intitulada: "Avaliação da Toxicidade Aguda do Antimônio Trivalente: Formas Livre ou Lipossomal Associadas ou não à Administração de Ácido Ascórbico", avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 02 de dezembro de 2013.

Prof. Dr. Nádia Rezende Barbosa Raposo
UFJF

Prof. Dr. Simone Aparecia Rezende
UFOP

Prof. Dr. Neila Márcia Silva Barcellos
UFOP

Aos meus pais, **João e Vera** e ao meu amor **Thiago**,
que me fizeram acreditar que as pessoas podem mudar o imutável
e enfrentar todos os golpes da vida com coragem.
Felicidade é mesmo mérito de quem não desiste!

AGRADECIMENTOS

Do processo seletivo até aqui, foi um longo caminho. Nada foi fácil, nem tranquilo. Agradeço a Deus por ser tão maravilhoso comigo, colocando pessoas tão especiais em minha vida. E ainda que haja pedras no meu caminho, confio. Todas as vezes que eu achei que não suportaria, Ele sempre me fez levantar de novo.

Aos meus pais, João e Vera, pela presença constante em minha vida. Obrigada por acreditarem em mim e em meus sonhos. No fundo, há coisas bonitas esperando a gente lá na frente. Os caminhos têm sido árduo, mas a chegada é certa. Obrigada pela coragem imensurável que deram. Amo vocês!

Às minhas irmãs, Juliana e Patrícia, pelo incentivo e torcida por todas as minhas realizações.

A todos meus tios, primos, tias e primas. Em especial, às Tias, Stela e Lelena e ao Tio Fausto, pela amizade única, conversas, compreensão nos momentos difíceis e por serem meus segundos pais.

As minhas avós, Maria Custódia e Dulce, saudades eternas. Que continuem me impulsionando em direção às vitórias dos meus desafios.

À professora Neila, agradeço por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Mesmo com todos os imprevistos, sempre estive de portas abertas, como uma mãe que abre os braços para receber um filho. Você me faz acreditar que os bons são a maioria. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e grande amizade. Você é um ser humano ímpar e tenho orgulho em dizer que um dia fui sua orientada.

Aos professores: Camila Megale, Ruth, Andrea, Mônica, Simone, Roney, Bete, Jacqueline e Claudia agradeço pela convivência durante esses anos, pelo incentivo, apoio, por toda contribuição científica e pela amizade.

À professora Elaine Amaral Leite pela colaboração imprescindível durante a realização das análises estatísticas e constante atenção.

Ao professor e amigo Wanderson Geraldo Lima pelo grande auxílio nas análises histológicas e por sempre, desde a graduação, conduzir meus passos, abrindo-me portas e iluminando o meu caminho.

À Maria, pela paciência e gentileza em me ensinar seus conhecimentos técnicos em épocas de iniciação científica (IC).

Aos Laboratórios de Pesquisas Clínicas, ao Adão, Cássio e LAPAC pela gentileza de disponibilizar equipamentos para as análises hematológicas e bioquímicas.

Ao Mário e a todos os colegas da Policlínica da Prefeitura Municipal de Mariana-MG pela atenção, disponibilidade em ajudar, amizade e sugestões dispensadas no decorrer desse trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia Experimental da UFOP (FE) e aos amigos da UFMG, em especial: Kamila, Dani, Mariana, Alessandra, Gisele, Kelly, Priscila, agradeço pela amizade, ensinamentos, ajuda e convivência nesses anos de trabalho.

Agradeço de maneira especial às grandes amigas e alunas de IC: Liviane e Laryssa, o que seria de mim sem vocês? Obrigada por tudo e principalmente pela companhia durante os experimentos.

Às grandes amigas: Pollyana, Thais e Ana Paula Battisti, pela amizade, horas e horas de conversas, convívio e acima de tudo pelos inúmeros momentos de dias divertidos e sofridos, festinhas inesquecíveis e grandes conquistas!

Ao Sr. Wilson, técnico responsável do FE, obrigada pela paciência, presteza e por todas as vezes que me socorreu quando alguma coisa dava errado.

À Adriana Trópia, a todos os técnicos e auxiliares do de Geoquímica Ambiental (DEGEO/UFOP) pela presteza e pela colaboração dispensada na execução desse trabalho.

Aos funcionários do Biotério, em especial à Érica, por estarem sempre disponíveis com muita alegria e paciência. A gente precisa de mais pessoas como vocês!

Aos demais amigos e mestres da Escola de Farmácia da UFOP pelos inúmeros momentos compartilhados e grandes aprendizados.

À FAPEMIG, à Rede Mineira de Nanotecnologia e CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu amor Thiago, Dora, Milton, Alba e Cristiano por estarem sempre à disposição, me incentivando a acreditar que tudo daria certo. Realmente, deu certo, e vocês fazem parte essencial desse trabalho.

A todos aqueles que não desistiram de mim, muito obrigada!



“Deveríamos ser lembrados pelas coisas que fazemos. Elas sobrevivem a nós. São como monumentos que as pessoas erguem em honra de heróis depois que eles morrem. Como as pirâmides que os egípcios construíram para homenagear os faraós. Só que, em vez de pedra, são feitas das lembranças que as pessoas têm. Por isso nossos feitos são nossos monumentos. Construídos com memória em vez de pedras.”

R. J. Palacio

RESUMO

Compostos antimoniais são utilizados no tratamento das Leishmanioses, porém há lacunas importantes a respeito dos seus mecanismos de ação e toxicidade. Formulações lipossomais foram desenvolvidas objetivando promover menor toxicidade e maior eficácia desses compostos. Visando dar continuidade aos trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa com o SbIII na forma lipossomal e com a potencial ação cardioprotetora do ácido ascórbico (AA) quando associado ao SbIII, este trabalho avaliou a toxicidade aguda não clínica de duas formulações lipossomais de SbIII, convencional (LCSbIII) e peguilada (LPSbIII) associadas ou não à administração de AA, após sua administração por via intraperitoneal (IP), em camundongos *Swiss*. As preparações lipossomais foram realizadas pelo método de congelamento/descongelamento, seguido de extrusão. Para quantificação do SbIII nessas formulações realizou-se a revalidação de um método analítico por ICP-OES. O percentual de encapsulação obtido foi de, aproximadamente, 15% para LCSbIII e de 14% para LPSbIII. Em média, os tamanhos das partículas foram de 170 a 230 nm, para ambas as formulações, com índice de polidispersão inferior a 0,3. LPSbIII foi mais estável por 30 dias e apresentou perfil de liberação *in vitro* mais lento. Para determinação da dose limite (DL) de SbIII utilizou-se o método do “Teste de Doses Fixas” (TDF), no qual foram utilizadas as doses: 17, 18, 19 e 20 mg.kg⁻¹. A dose única de 18 mg.kg⁻¹ (DL) de SbIII livre induziu claros sinais de toxicidade e alterações histopatológicas qualitativas. No estudo de toxicidade aguda, as administrações de SbIII livre e SbIII+AA induziram perda de peso corporal nos animais, mortalidade significativa e sinais clínicos de toxicidade, como: ataxia, piloereção, tremores, convulsões e elevados níveis de ALT, AST e fosfatase alcalina. Nesses grupos, observou-se degeneração celular, presença de pigmentos de hemossiderina e necrose tecidual no fígado. Também foram observadas esclerose glomerular nos rins e necrose no baço. Em geral, os lipossomas reduziram a frequência e a intensidade dos sinais clínicos de toxicidade, além de não ter sido observada a presença de mortalidade. Lesões histológicas de maior gravidade também não foram observadas nos tratamentos lipossomais. Nos diferentes grupos estudados não foram observadas alterações importantes nas análises de hemácias, hematócrito, monócitos e neutrófilos. A associação da administração de AA com SbIII, nas formas livre ou lipossomais, não produziu efeito protetor em fígado, baço e rins contra a toxicidade desse semimetal nas condições experimentais avaliadas. Porém, os seus efeitos tóxicos foram reduzidos com a utilização dos lipossomas convencionais e peguilados.

Palavras-chave: antimônio, lipossomas, toxicidade aguda, ácido ascórbico, camundongos.

ABSTRACT

Antimony compounds are used in the treatment of Leishmaniasis but there are important gaps concerning their mechanisms of action and toxicity. Liposomal formulations were developed aiming to promote greater efficiency and lower toxicity of these compounds. Aiming to continue the previous work of our research group with SbIII in liposomal form and the potential cardioprotective effect of ascorbic acid (AA) when associated SbIII, this study evaluated the non-clinical acute toxicity in two liposomal formulations of SbIII: conventional (CLSbIII) and PEGylated (PLSbIII), associated or not with administration of AA, after its administration intraperitoneally (IP) in *Swiss* mice. Liposomal preparations were performed by the freeze/thaw method followed by extrusion. For quantification of SbIII of these formulations, a revalidation of an analytical method by ICP-OES was carried. The percentage of encapsulation was obtained in approximately 15% and 14% for CLSbIII to PLSbIII, respectively. The average particle sizes were 170 and 230 nm for both formulations, with an index of polydispersity less than 0.3. PLSbIII was more stable for 30 days and showed in vitro release profile slower. To determine the limit dose (LD) of SbIII used the method "Test of fixed doses" (TFD) in which the doses were used: 17, 18, 19 and 20 mg.kg⁻¹. A single dose of 18 mg.kg⁻¹ (LD) free SbIII induced clear signs of toxicity and qualitative histopathological changes. In acute toxicity study, the administrations of free and SbIII and SbIII+AA induced weight loss in animals, significant mortality and clinical signs of toxicity, such as ataxia, piloerection, tremors, seizures and high levels of ALT, AST and alkaline phosphatase. In these groups, we observed a cell degeneration, the presence of hemosiderin pigment and liver necrosis. Glomerular sclerosis were also observed in the kidneys and also was spleen necrosis. In general, liposomes decreased the frequency and intensity of clinical toxicity signs, and the presence of mortality was not observed in mice treated with liposomes. More severe histological lesions were also not observed in liposomal treatments. In the different groups, significant alterations were observed in analysis of hematocrit, monocytes and neutrophils. The association with the administration of SbIII+AA, in free or liposomal form produced no protective effect in the liver, spleen and kidneys against this semi-metal toxicity in our experimental conditions. However, its toxic effects were minimized by the use of conventional and PEGylated liposomes.

Keywords: antimony, liposomes, acute toxicity, ascorbic acid, mice.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Método de preparação dos lipossomas através de congelamento/descongelamento, seguido de extrusão com membranas de policarbonato de 200 nm | 32 |
| Figura 2. Leitura da emissão de radiação eletromagnética por ICP-OES de amostras de lipossomas convencionais contendo ou não SbIII. | 37 |
| Figura 3. Curva analítica de SbIII em matriz lipossomal convencional por ICP-OES. | 38 |
| Figura 4. Curva analítica de SbIII em matriz lipossomal peguilada por ICP-OES. | 39 |
| Figura 5. Cinética de liberação <i>in vitro</i> do SbIII das formulações lipossomais | 46 |
| Figura 6. Fórmula estrutural do ácido ascórbico (AA) ou vitamina C ($C_6H_8O_6$)..... | 57 |
| Figura 7. Protocolo experimental do estudo de toxicidade aguda em dose única do SbIII nas formas livre, lipossomal convencional (LC) ou lipossomal peguilada (LP), associadas ou não à administração de ácido ascórbico (AA). | 63 |
| Figura 8. Fotomicrografia de fígado (A e B), rins (C) e baço (D) de camundongos <i>Swiss</i> depois de 14 dias de tratamento (IP) de SbIII na sua forma livre na dose de 18 mg.kg^{-1} | 69 |
| Figura 9. Variações do peso corporal observadas em camundongos <i>Swiss</i> , fêmeas (A) e machos (B), após a administração (IP) de SbIII nas formas livre ou lipossomais (18 mg.kg^{-1}), associadas ou não à administração de AA (300 mg.kg^{-1})..... | 73 |
| Figura 10. Fotomicrografia de fígado de camundongos <i>Swiss</i> machos tratados com PBS (A), AA (B), SbIII livre (C), SbIII+AA (D), LCSbIII (E), LCSbIII+AA (F), LPSbIII (G) e LPSbIII+AA (H)..... | 82 |
| Figura 11. Níveis de ureia e creatinina em camundongos <i>Swiss</i> , fêmeas (A e B) e machos (C e D), avaliados 14 dias após tratamento por via IP, dose única, de SbIII nas formas livre ou lipossomais (18 mg.kg^{-1}), com ou sem a administração de AA (300 mg.kg^{-1}). | 84 |
| Figura 12. Fotomicrografia de rins de camundongos <i>Swiss</i> machos tratados com PBS (A), AA (B), SbIII livre (C), SbIII+AA (D), LCSbIII (E), LCSbIII+AA (F), LPSbIII (G) e LPSbIII+AA (H)..... | 86 |
| Figura 13. Fotomicrografia de baço de camundongos <i>Swiss</i> machos tratados com PBS (A), AA (B), SbIII livre (C), SbIII+AA (D), LCSbIII (E), LCSbIII+AA (F), LPSbIII (G) e LPSbIII+AA (H)..... | 87 |

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Métodos alternativos para a estimativa da dose letal preconizados nos protocolos OECD e sugeridos pelo Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos da Anvisa (2010).54
- Quadro 2.** Sinais clínicos observados com maior incidência em camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, após administração de dose única (IP) de SbIII.67

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Alguns métodos analíticos aplicados na quantificação de antimônio..... | 27 |
| Tabela 2. Resultados médios obtidos da emissão de radiação eletromagnética por ICP-OES e concentração calculada de SbIII nas amostras contendo matriz lipossomal convencional. | 38 |
| Tabela 3. Resultados médios obtidos da emissão de radiação eletromagnética por ICP-OES e concentração calculada de SbIII nas amostras contendo matriz lipossomal peguilada..... | 39 |
| Tabela 4. Resultados obtidos no estudo de repetibilidade do método de quantificação de SbIII em lipossomas por ICP-OES. | 40 |
| Tabela 5. Resultados obtidos no estudo de precisão intermediária do método de quantificação de SbIII em lipossomas por ICP-OES. | 40 |
| Tabela 6. Concentração de SbIII ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) nos lipossomas antes e após diálise e percentual de encapsulação (PE%). Medidas realizadas por ICP-OES. | 41 |
| Tabela 7. Diâmetro médio dos lipossomas e índice de polidispersão das partículas medidos por espectroscopia de correlação de fótons. | 43 |
| Tabela 8. Cinética de liberação do SbIII dos lipossomas convencionais (LCSbIII) em condições experimentais (37°C). | 45 |
| Tabela 9. Cinética de liberação do SbIII dos lipossomas peguilados (LPSbIII) em condições experimentais (37°C). | 45 |
| Tabela 10. Estabilidade da formulação lipossomal convencional (LCSbIII) estocada a 4°C por até 30 dias. | 47 |
| Tabela 11. Estabilidade da formulação lipossomal peguilada (LPSbIII) estocada a 4°C por até 30 dias..... | 48 |
| Tabela 12. Letalidade em camundongos <i>Swiss</i> ($n=6$, 3 machos e 3 fêmeas), sob tratamento agudo, dose única (IP) de SbIII na forma livre..... | 66 |
| Tabela 13. Mortalidade de camundongos <i>Swiss</i> , machos e fêmeas, tratados com SbIII nas formas livre ou lipossomais ($18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), associadas ou não à administração de AA ($300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)..... | 72 |

Tabela 14. Parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, avaliados 14 dias após tratamento por via IP, dose única de 18 mg.kg⁻¹, de SbIII nas formas livre ou lipossomais, com ou sem a administração de AA (300 mg.kg⁻¹).76

Tabela 15. Leucograma de camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, avaliados 14 dias após tratamento por via IP, dose única de 18 mg.kg⁻¹, de SbIII nas formas livre ou lipossomais, com ou sem a administração de AA (300 mg.kg⁻¹).77

Tabela 16. Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática avaliados em camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, submetidos aos tratamentos por via IP com SbIII nas formas livre ou lipossomais (18 mg.kg⁻¹), com ou sem a associação da administração de AA.80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ASC – Monohidroascorbil ácido
- AA - Ácido ascórbico
- ALA – Alanina aminotransferase
- ANOVA – Análise de variância
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- As – Arsênio
- AST – Aspartato aminotransferase
- CCA – Centro de Ciência Animal
- COL – Colesterol
- DEGEO – Departamento de Geologia
- DHA - Ácido dehidroascórbico
- DL – Dose limite
- DL₅₀ – Dose letal mediana
- DSPC – Distearoilfosfatidilcolina
- DSPE-PEG – Distearoilfosfatidiletanolamina acoplado a polietilenoglicol (2000)
- ECG - Eletrocardiograma
- EMA - *European Medicines Agency*
- FAL – Fosfatase alcalina
- FDA - *Food and Drug Administration*
- GSH – Glutathione
- HDL – *High density lipoproteins*
- HE – Coloração por hematoxilina e eosina
- ICH - *International Conference on Harmonisation*
- ICP/OES – Espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado
- IP – Intraperitoneal
- IV – Intravenoso
- LAPAC – Laboratório Piloto de Análises Clínicas
- LCSbIII – Lipossoma convencional de antimônio trivalente
- LCSbIII+AA – Lipossoma convencional de antimônio trivalente associado ao ácido ascórbico
- LPSbIII+AA – Lipossoma peguilado de antimônio trivalente associado ao ácido ascórbico
- LCV – Lipossoma convencional vazio
- LGqA – Laboratório de Geoquímica Ambiental
- LPC – Laboratório de Pesquisas Clínicas
- LPSbIII – Lipossoma peguilado de antimônio trivalente
- LPV – Lipossoma peguilado vazio
- LTA – Leishmaniose tegumentar americana
- LUV – Lipossoma unilamelar grande
- LV – Leishmaniose visceral
- MLV – Lipossoma multilamelar

OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PE% - Percentual de encapsulação

PEG - Polietilenoglicol

pH – Potencial hidrogeniônico

Rpm – Rotações por minuto

Sb - Antimônio

SbIII – Antimônio trivalente

SbIII+AA – Antimônio trivalente associado ao ácido ascórbico

SbV – Antimônio pentavalente

SC – Subcutâneo

SFM – Sistema fagocítico mononuclear

SUV - Lipossoma unilamelar pequeno

TA - Tartarato de antimônio e potássio ou tártato emético

TAC - Toxicidade aguda de classe

TDF - Teste da dose fixa

TGI - Trato gastrointestinal

TUD - Teste *Up and Down*

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 19 |
| <i>CAPÍTULO I REVALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ICP/OES E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS</i> | 22 |
| 1 INTRODUÇÃO | 23 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 25 |
| 3 OBJETIVOS | 30 |
| 3.1 Geral..... | 30 |
| 3.2 Específicos | 30 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 4.1 Material | 31 |
| 4.2 Método analítico | 31 |
| 4.3 Composição dos lipossomas | 31 |
| 4.4 Preparação dos lipossomas | 31 |
| 4.5 Revalidação Analítica | 32 |
| 4.5.1 Solução estoque de SbIII | 32 |
| 4.5.2 Soluções intermediárias de SbIII..... | 33 |
| 4.5.3 Seletividade | 33 |
| 4.5.4 Linearidade | 33 |
| 4.5.5 Precisão..... | 34 |
| 4.5.6 Exatidão | 34 |
| 4.5.7 Análise Estatística..... | 34 |
| 4.6 Caracterização físico-química dos lipossomas | 34 |
| 4.6.1 Percentual de encapsulação (PE%)..... | 34 |
| 4.6.2 Determinação do tamanho e índice de polidispersão | 35 |
| 4.6.3 Perfil de liberação <i>in vitro</i> | 35 |
| 4.6.4 Estabilidade | 36 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 5.1 Revalidação Analítica | 36 |
| 5.1.1 Seletividade | 36 |
| 5.1.2 Linearidade | 37 |
| 5.1.3 Precisão..... | 39 |
| 5.1.4 Exatidão | 40 |
| 5.2 Caracterização físico-química dos lipossomas | 41 |
| 5.2.1 Percentual de encapsulação (PE%)..... | 41 |
| 5.2.2 Determinação do tamanho e índice de polidispersão | 42 |
| 5.2.3 Perfil de liberação <i>in vitro</i> | 44 |
| 5.2.4 Estabilidade dos lipossomas | 47 |

| | | |
|---|---|------------|
| 6 | CONCLUSÕES..... | 49 |
| <i>CAPÍTULO II AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA LIPOSSOMAS DE SbIII ASSOCIADOS OU NÃO À ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO.....</i> | | |
| 1 | INTRODUÇÃO | 51 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 53 |
| 3 | OBJETIVOS | 59 |
| | 3.1 Geral | 59 |
| | 3.2 Específicos..... | 59 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 60 |
| | 4.1 Material..... | 60 |
| | 4.2 Solução de SbIII..... | 60 |
| | 4.3 Lipossomas | 60 |
| | 4.4 Experimentos <i>in vivo</i> | 60 |
| | 4.4.1 Animais..... | 60 |
| | 4.4.2 Determinação da Dose Limite (DL) | 61 |
| | 4.4.3 Obtenção de sinais cardiovasculares através de ECG | 61 |
| | 4.4.4 Toxicidade Aguda..... | 62 |
| | 4.4.5 Investigações bioquímicas e hematológicas | 63 |
| | 4.4.6 Avaliação histológica | 64 |
| | 4.4.6.1 Cortes histológicos e microscopia óptica | 64 |
| | 4.4.6.2 Análise histológica qualitativa..... | 65 |
| | 4.5 Análise Estatística..... | 65 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 66 |
| | 5.1 Dose Limite de toxicidade (DL) | 66 |
| | 5.2 Obtenção de sinais cardiovasculares através de ECG..... | 69 |
| | 5.3 Toxicidade aguda..... | 70 |
| | 5.3.1 Avaliação de mortalidade, peso corporal e sinais clínicos. | 71 |
| | 5.3.2 Investigações hematológicas..... | 75 |
| | 5.3.3 Investigações de química clínica e histológicas..... | 78 |
| | 5.3.3.1 Função hepática e análise histológica do fígado | 78 |
| | 5.3.3.2 Função renal e análises histológicas dos rins e do baço..... | 83 |
| | 5.3.4 O papel do ácido ascórbico..... | 88 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 91 |
| | CONCLUSÃO GERAL | 92 |
| | REFERÊNCIAS..... | 94 |
| | ANEXO..... | 113 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Conhecido pelos assírios e egípcios desde 4000 a.C., o antimônio (Sb) foi utilizado no tratamento de várias doenças, dentre elas, a sífilis, a lepra e a peste (McCALLUM, 1997). Em 1912, Gaspar Vianna, médico e pesquisador brasileiro, foi o primeiro a relatar sucesso no tratamento da leishmaniose tegumentar americana, usando tártaro emético (TA, complexo de antimônio trivalente e potássio) (VIANNA, 1912). Três anos mais tarde, na Itália, também foi comprovada a sua eficácia no tratamento da leishmaniose visceral (DI CHRISTINA, G.; CARONIA, G., 1915) e, em 1918, foi demonstrada a sua atividade esquistossomicida (CHRISTOPHERSON *et al.*, 1918). No entanto, devido aos efeitos tóxicos e efeitos colaterais associados com a sua utilização, como intolerância gastrointestinal e cardiotoxicidade, o antimônio trivalente (SbIII) foi substituído por compostos de antimônio pentavalente (SbV) no tratamento das leishmanioses e por fármacos ativos por via oral, como a oxamniquina e o praziquantel, na esquistossomose (FRÉZARD *et al.*, 2005).

A toxicidade induzida pelo Sb também não é bem conhecida, mas pode estar relacionada com a sua elevada afinidade pelos grupos sulfidrilas, composição estrutural essencial das proteínas (DE WOLFF, 1995). As espécies trivalentes quando submetidas à hidrólise não apresentam carga elétrica, ($[Sb(OH)_3]^0$), o que facilita sua passagem através das membranas celulares, sendo a toxicidade do Sb dependente do seu estado de oxidação e o SbIII considerado dez vezes mais tóxico do que o SbV (GEBEL, 1997; EMONS; KRACHLER, 2001).

A enzima glutatona redutase (GSH), responsável pelos mecanismos de defesa contra danos oxidativos no organismo, contém grupo sulfidrilas e é o tiol predominante no meio intracelular, sendo considerada uma forte candidata a agente redutor do Sb (FRÉZARD *et al.*, 2001, FERREIRA *et al.*, 2003). Em comparação com o metabolismo em humanos descrito para o arsênio (As), análogo químico do Sb, Mortari (2001) apresentou evidências da biorredução e conversão *in vivo* do Sb, sendo o SbIII descrito como o responsável pela sua atividade terapêutica, porém, também pelos seus efeitos adversos.

Efeito tóxico acumulativo já foi descrito para o antimoniato de meglumina (complexo de SbV) e foi observada elevada afinidade do Sb pelo sangue e baço, bem como sua acumulação em órgãos vascularizados, especialmente no fígado (FERRONI *et al.*, 1987). A ocorrência de insuficiência renal e de necrose tubular aguda também já foram observadas durante a terapia com compostos de Sb, podendo levar o paciente ao óbito (RODRIGUES *et al.*, 1999, DIAMENT *et al.*, 2003). As manifestações gastrointestinais que ocorrem no

tratamento com compostos de SbV são parcialmente explicadas por presença de pancreatite química (GASSER JÚNIOR *et al.*, 1994) e a hepatotoxicidade pode ocorrer em até 50% dos pacientes tratados (DIETZE, 2003).

O ácido ascórbico (AA), a vitamina C, é uma substância hidrossolúvel encontrada naturalmente na forma de L-isômero. Possui reconhecida ação antioxidante, agindo como redutor de espécies reativas de oxigênio no organismo (WEBER; BENDICH; SCHALCH, 1996). Quando células normais e neoplásicas foram expostas ao As associado ao AA, observou-se que a mortalidade das células neoplásicas estava correlacionada com a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) extracelular, sendo esta produção dependente da concentração de AA (CHEN *et al.*, 2005). Apesar do As por si só ser capaz de matar células leucêmicas, quando associado ao AA há um aumento significativo dessa atividade (QAZILBASH *et al.*, 2008).

Uma possível ação protetora do AA sobre os efeitos adversos de As tem sido descrita. Já foram relatados aumento de atividade e redução dos efeitos tóxicos do As quando associado AA em pacientes com mieloma múltiplo refratário (BAHLIS *et al.*, 2002; SINGH; RANA, 2007). Sohini e Rana (2007) observaram efeito protetor do AA sobre o estresse oxidativo induzido pelo As no fígado e rins de ratos. Devido às semelhanças químicas dos semimetais, As e Sb, nosso grupo de pesquisa avaliou a possibilidade de redução da cardiotoxicidade do SbIII associado à administração de AA (REIS, 2010). O AA foi capaz de reduzir as alterações histológicas e eletrocardiográficas em ratos, demonstrando potencial ação cardioprotetora.

A busca por terapias alternativas para as leishmanioses têm resultado no desenvolvimento de formulações lipossomais. Entretanto, apesar da necessidade de aprimoramento da quimioterapia antimonial atual e dos resultados extremamente promissores obtidos com os lipossomas em modelos experimentais, atualmente nenhuma formulação lipídica ainda está disponível comercialmente. Este fato pode ser justificado, em parte, pelas dificuldades tecnológicas inerentes à obtenção de formulações mais estáveis (FRÉZARD *et al.*, 2005).

Apesar dos longos anos da utilização de compostos de Sb, existem lacunas importantes no conhecimento de sua ação, toxicidade e farmacocinética (FRANKE, 1990; ROBERTS; McMURRAY, RAINEY, 1998). Na tentativa de auxiliar o preenchimento dessas lacunas, estudos com o SbIII nas formas livre e lipossomal tem têm sido realizados por nosso grupo de pesquisa. De Melo e colaboradores (2003) demonstraram, no modelo murino de esquistossomose, um aumento de eficácia e redução dos efeitos adversos do SbIII através do

seu encapsulamento em lipossomas. Maciel e colaboradores (2010) demonstraram a redução da cardiotoxicidade aguda do SbIII encapsulado em lipossomas peguilados. Reis (2010) observou a redução nas alterações nos parâmetros de ECG e pressão arterial em ratos tratados com lipossomas peguilados de SbIII em comparação com SbIII na forma livre. Castro (2013) observou, no modelo murino de leishmaniose, reduções significativas na carga parasitária e em alterações histológicas em fígado, baço e medula óssea após tratamento com lipossomas convencionais de SbIII.

Nesse contexto, este trabalho avaliou os aspectos de toxicidade aguda não clínica destas formulações de SbIII após sua administração, por via intraperitoneal (IP), em camundongos *Swiss*. Com a intenção também de avaliar a possibilidade de redução da toxicidade deste semimetal, foi avaliada a associação de AA com SbIII nas formas livre ou lipossomais.

CAPÍTULO I

REVALIDAÇÃO DE MÉTODO

ANALÍTICO POR ICP/OES E

CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

1 INTRODUÇÃO

Para garantir que um método analítico forneça informação viável e fidedigna sobre uma amostra, este deve sofrer uma avaliação designada por validação. Deve-se demonstrar que o método é apropriado para a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

Podem-se definir diferentes níveis de validação, dentre eles o termo validação parcial, que pode ser utilizado quando ocorrem modificações introduzidas em uma técnica já previamente validada, como por exemplo, alterações nos intervalos de concentrações, mudanças no sistema de detecção, redução do volume de amostra, alterações de matriz (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). No entanto, alguns autores preferem designar esse termo como revalidação ou validação cruzada (DADGAR *et al.*, 1995; BRESSOLE *et al.*, 1996).

Todos os processos e procedimentos analíticos devem sofrer revalidações periódicas para que seja assegurado que os mesmos permaneçam capazes de atingir os resultados esperados. Mudanças que requerem revalidação devem ser bem definidas e podem incluir alterações de materiais de partida, incluindo propriedades físicas como densidade, viscosidade, tamanho de partículas, que afetem o processo ou produto (CAUSON, 1997). A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição selecionada, os quais podem aumentar ou reduzir um sinal, e a magnitude desse efeito também pode depender da sua concentração (RIBANI *et al.*, 2004).

Para garantir a confiabilidade de resultados utilizando um método analítico já previamente validado, porém com a utilização de matrizes lipídicas com alterações na composição e na concentração foi considerada imprescindível a sua revalidação.

O pré-requisito para o uso de lipossomas como carreadores de fármacos é a utilização de métodos que permitam a caracterização e controle de fatores tais como: o processo de preparação, tamanho das vesículas, composição, estabilidade e teor de encapsulação dos fármacos (LASIC, 1998). A caracterização detalhada da estrutura dos lipossomas é importante porque fornece informações sobre diferenças estruturais que possam afetar o seu comportamento *in vitro* e *in vivo* (JOUSMA *et al.*, 1987).

Neste capítulo, é apresentada uma revalidação do método de quantificação do SbIII em matriz lipossomal peguilada, com concentração lipídica de 76,9 g.l⁻¹, por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), desenvolvido e validado por nosso grupo de pesquisa (REIS *et al.*, 2013), bem como a caracterização físico-

química das formulações lipossomais obtidas no presente trabalho. O ICP-OES é um tipo de espectroscopia de emissão que utiliza o plasma indutivamente acoplado para a excitação de íons e átomos que emitem radiação eletromagnética em comprimentos de onda característicos de um elemento em particular.

Com o objetivo de utilizar o mesmo equipamento e método analítico, realizou-se a sua revalidação, visando quantificar com segurança, o SbIII em matriz lipossomal peguilada ou convencional, ambas com concentração lipídica de 120 g.l^{-1} para garantir, assim, a não interferência das alterações ocorridas nas matrizes lipídicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O Sb, também chamado de *Stibium*, está localizado no grupo 15 (VA) da Classificação Periódica dos Elementos. Possui número atômico 51, massa atômica 121,75 u e a sua configuração eletrônica, $[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^2 5p^3$, mostra a presença de elétrons desemparelhados em cada um dos três orbitais, permitindo o Sb apresentar vários estados de oxidação (-3, 0, +3 e +5) (HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, 2012). Em ambientes redutores, as espécies SbV podem ser convertidas nas espécies SbIII. Apesar de estar presente em diversos minérios, a sua abundância na crosta terrestre é de $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (KRACHLER *et al.*, 2005).

Compostos de antimônio também podem ser encontrados em amostras ambientais, alimentícias, farmacológicas e industriais. Uma variedade ampla de métodos analíticos para a determinação de antimônio está disponível na literatura, tais como: a espectrofotometria (TIWARI *et al.*, 2006), espectrometria de absorção atômica (FAN, 2007), voltametria de redissolução anódica (RENEDO; MARTINEZ, 2007), cromatografia a líquido de alta eficiência (ZHENG *et al.*, 2001), potenciometria (MOSTAFA, 2007), extração líquido-líquido em sistema automatizado de análise em fluxo (TRIVELIN *et al.*, 2006), entre outros.

Técnicas hífenadas têm sido empregadas no desenvolvimento de metodologias analíticas, entre as quais se destaca a cromatografia a líquido de alta eficiência com espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS), devido ao alto poder de separação provido pelo HPLC e a alta seletividade oferecida pelo ICP-MS, tornando, assim, possível a determinação de SbIII e SbV simultaneamente (ZHENG *et al.*, 2001).

Os métodos que empregam as técnicas hífenadas são promissores para a especiação de antimônio, porém, são pouco viáveis para serem empregados no controle de qualidade de medicamentos nas indústrias e, muitas vezes, na quantificação de fármacos em formulações em desenvolvimento laboratorial como, por exemplo, lipossomas, onde se requer métodos mais simples e fácil acesso. Na determinação de SbV, através de método espectrofotométrico, têm sido empregados reagentes cromogênicos, como rodamina B (TRIVELIN *et al.*, 2006), e verde brilhante (BURNS *et al.*, 1993). Os métodos baseiam-se na formação de um par iônico entre o corante catiônico e o ânion hexacloroantimoniato (SbCl_6^-) e posterior determinação do cromóforo por espectrofotometria na região do UV.

Para a determinação direta de SbIII em solução aquosa, reagentes específicos têm sido empregados, tais como: iodeto, molibdato e vermelho de bromopirogalol. O método que

emprega o vermelho de bromopirogalol necessita de redução prévia do SbV e já foi aplicado na determinação de SbIII e SbV no antimoniato de N-metilglucamina (RATH *et al.*, 1997).

A especiação de Sb por meio de técnicas eletroquímicas também tem sido relatada. Na maioria dos eletrodos de trabalho disponíveis, apenas o SbIII é eletroativo. Portanto, métodos voltamétricos, no geral, envolvem a quantificação de SbIII e Sb total, através da redução prévia de SbV a SbIII, com a utilização de agentes redutores.

A especiação do antimônio em antimoniato de N-metilglucamina é importante, visto os seus efeitos terapêuticos e toxicidade, os quais estão intimamente relacionados com o estado de oxidação desse elemento. A contaminação do medicamento antimoniato de N-metilglucamina por SbIII já foi relatada empregando-se diversos métodos analíticos (FRANKE *et al.*, 1990, RATH *et al.*, 1997, BORBOREMA, 2010). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) incluiu a monografia para o antimoniato de N-metilglucamina na quinta edição da Farmacopéia Brasileira, onde sugere-se o doseamento do antimônio total por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos em batelada, com atomização em cela de quartzo, sendo o SbV previamente reduzido por uma solução de tetraidroborato de sódio (NaBH_4) em hidróxido de sódio (BRASIL, 2010).

Tiwari e colaboradores (2006) descreveram uma metodologia para determinação de antimônio total em amostras ambientais e biológicas, utilizando espectrofotometria (UV) por leucocristal violeta. Neste método também foi relatada a necessidade de redução do SbV para SbIII. O mesmo procedimento foi conduzido por Borborena (2010), porém o método não foi seletivo, uma vez que não foi possível a quantificação em amostras contendo SbV. A Tabela 1 apresenta alguns métodos analíticos utilizados na quantificação de Sb em diferentes matrizes.

É importante salientar que já foram observados níveis significativos de SbIII em amostras do medicamento antimoniato de meglumina. Considerando que o medicamento tem uma concentração de SbV de 81,0 mg/ml, o teor de SbIII determinado variou, aproximadamente, de 7% a 15,8% do teor de SbV (FRANCO *et al.*, 1995, RATH *et al.*, 1997, DORETTO, 2008, BORBOREMA, 2010). Isto poderia explicar a variabilidade observada na eficácia e nos efeitos colaterais em indivíduos tratados com este medicamento.

Tabela 1. Alguns métodos analíticos aplicados na quantificação de antimônio.

| Matriz | Método | Limite de Quantificação mol.l ⁻¹ | Limite de Detecção mol.l ⁻¹ | Referência |
|------------------------------|----------------------------|--|---|----------------------------------|
| Água de oceano e Glucantime® | ASV ^(a) | | 9,44 x 10 ⁻¹⁰ (SbIII) | RENEDO; MARTINEZ, 2007. |
| Águas | ET-AAS ^(b) | 4,1 x 10 ⁻¹⁰ (SbIII) 8,2 x 10 ⁻¹⁰ (SbV) | 6,6 x 10 ⁻¹¹ (SbIII) 7,55 x 10 ⁻¹¹ (Sb) | FAN, 2007. |
| Águas e Glucantime® | DPAdSV ^(c) | | 1,03 x 10 ⁻¹⁰ (SbIII) 9,48 x 10 ⁻⁹ (SbV) | GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2007. |
| Algas | HPLC-HG-AFS ^(d) | | | DE GREGORI <i>et al.</i> , 2001. |
| Antimoniato de Meglumina | LLE-FA ^(e) | | 2,9 x 10 ⁻⁵ (SbV) | TRIVELIN <i>et al.</i> , 2006. |
| Águas e cabelo humano | AdSV ^(f) | | 1,0 x 10 ⁻⁹ (SbIII) | GUO <i>et al.</i> , 2005. |
| Soro e Urina | Espectrofotometria | | 4,9 x 10 ⁻⁸ (SbIII) | TIWARI <i>et al.</i> , 2006. |

Notas: ^(a)ASV: Voltametria de redissolução anódica, ^(b)ET-AAS: Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, ^(c)DPAdSV: Voltametria adsortiva de redissolução com pulso diferencial, ^(d)HPLC-HG-AFS: Cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de fluorescência com geração de hidreto, ^(e)LLE-FA: Extração líquido-líquido em sistema automatizado de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica e ^(f)AdSV: Voltametria adsortiva de redissolução.

Um método analítico é considerado revalidado, desde que sejam avaliados os parâmetros de precisão, especificidade/seletividade e linearidade (BRASIL, 2003).

Fosfolipídios em soluções aquosas podem formar estruturas fechadas em bicamadas e serem utilizados como carreadores terapêuticos para numerosas aplicações clínicas (TORCHILIN, 2005). Lipossomas são vesículas esféricas, constituídas de fosfolipídios, que podem veicular substâncias hidrofílicas em seu interior, hidrofóbicas em suas bicamadas lipídicas e anfífilas na interface lipídio/água (LASIC, 1998). Podem conferir distribuição corporal diferenciada, lenta liberação, maior estabilidade e modificadas interações com células hospedeiras e patogênicas (BLUME; CEVC, 1990). Permitem, ainda, o direcionamento a alvos específicos, aumento da potência e/ou redução da toxicidade da substância encapsulada (LASIC, 1998).

Existe uma ampla variedade de lipossomas no que diz respeito à composição, estrutura e tamanho. Assim, de acordo com a lamelaridade e tamanho, os lipossomas são classificados em: unilamelares pequenos (SUV, *Small Unilamellar Vesicles*); unilamelares grandes (LUV, *Large Unilamellar Vesicles*); multilamelares (MLV, *Multilamellar Vesicles*) (LASIC, 1998). Em relação à composição e ao mecanismo de liberação intracelular, os lipossomas podem ser classificados como: convencionais, de circulação prolongada ou peguados e os polimórficos (BATISTA *et al.*, 2007). O tipo de lipossoma utilizado para uma determinada finalidade está diretamente relacionado à sua composição e estrutura e, dependendo da forma de administração, pode alcançar diferentes sítios no organismo (LASIC, 1998).

As principais vias de administração dos lipossomas são: intravenosa (IV), IP e subcutânea (SC). A administração de lipossomas por via oral é dificultada pelas condições agressivas do trato gastrointestinal (TGI), dentre elas: baixo pH estomacal, presença de enzimas e ação dos sais biliares no intestino, que tendem a induzir a transição da fase lamelar para a fase micelar (FRÉZARD *et al.*, 2005). Outra via utilizada para administração de lipossomas é a via tópica, especialmente em cosmética. A utilização de lipossomas pode favorecer a concentração do fármaco na derme e epiderme e diminuir a sua absorção sistêmica (LIGADE *et al.*, 2007; BARBA *et al.*, 2008). Existem ainda outras vias de administração, como a via pulmonar, utilizada especialmente para veicular de fármacos de ação local (HOESEL *et al.*, 2008).

Estudos *in vivo* têm demonstrado que os lipossomas de primeira geração, denominados convencionais, são rapidamente opsonizados por proteínas plasmáticas e, posteriormente, capturados pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) após administração sistêmica, acumulando-se em tecidos ricos em macrófagos, limitando sua ação em outros tecidos (ALLEN; HANSEN, 1991). A remoção desses lipossomas da corrente sanguínea depende do seu tamanho, carga de superfície e estabilidade e, geralmente, as vesículas grandes e carregadas positivamente são fagocitadas mais rapidamente do que àquelas com carga negativa (PATEL, 1992). A incorporação de polietilenoglicol (PEG), um polímero hidrofílico, à superfície lipossomal origina estruturas furtivas, estericamente estabilizadas, as quais escapam do SFM devido à redução da opsonização dessas vesículas, proporcionando maior tempo de circulação (KLIBANOV *et al.*, 1990; WOODLE, 1995).

O desenvolvimento bem sucedido de uma formulação lipossomal depende de fatores, tais como: seleção dos lipídios, natureza da substância encapsulada e método de obtenção. Existem vários métodos descritos para a preparação de lipossomas, os quais, de modo geral, são compostos por três etapas básicas: 1) diluição dos fosfolipídios em solvente orgânico,

seguido de evaporação para obtenção do filme lipídico; 2) hidratação do filme lipídico em meio aquoso; 3) redução do tamanho da vesícula e/ou do número de camadas, quando necessário (HOPE *et al.*, 1986).

Frézard e colaboradores (2000) desenvolveram um método para encapsulação do SbV em lipossomas que consiste em liofilizar lipossomas pequenos vazios e em reidratar o liofilizado, com solução do antimonial. Quando avaliada em *hamsters* infectados por *L. chagasi*, a preparação administrada IP, em dose única, induziu o decréscimo médio de 50 vezes da carga parasitária no baço e fígado dos animais.

Adicionalmente, ao estudar a biodistribuição dessa formulação após administração IV em cães, Schettini e colaboradores (2003) observaram presença de concentrações significativas do fármaco no baço e fígado. Os autores sugeriram que as baixas concentrações de SbV obtidas na medula poderiam estar relacionadas à dose ou ao tamanho das vesículas utilizadas. Schettini e colaboradores (2005) também avaliaram os efeitos farmacocinéticos e parasitológicos desta mesma formulação, após administração de múltiplas doses em cães. Concluíram que embora o protocolo de tratamento utilizado tenha sido capaz de aumentar os níveis de Sb na medula e reduzir a intensidade da infecção, a preparação não foi capaz de eliminar completamente o parasito. Além disso, no momento da injeção dos lipossomas foram observados efeitos colaterais transitórios como taquicardia, sialorréia, bradicardia, defecação e cianose, os quais podem ser atribuídos ao tamanho elevado dos lipossomas utilizados e a uma consequente obstrução transitória dos capilares pulmonares.

Diante deste quadro, Schettini e colaboradores (2006) desenvolveram uma nova formulação de SbV encapsulado em lipossomas, com tamanho nanométrico, que culminou com a elevação da concentração de Sb na medula óssea.

Os lipossomas podem, portanto, modificar a distribuição tecidual do fármaco encapsulado, sendo esse comportamento dependente das características físico-químicas das vesículas (FERRARI, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Revalidar metodologia analítica desenvolvida e validada por Reis e colaboradores (2013) para quantificação de SbIII em formulações lipossomais, convencional e peguilada, ambas com concentração lipídica de 120 g.l^{-1} , preparar e caracterizar essas formulações lipossomais.

3.2 Específicos

- Avaliar os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão, segundo os critérios estabelecidos pela Resolução nº 899 da ANVISA (BRASIL, 2003) e normas do *Harmonised Tripartite Guideline* (ICH, 2005);
- Determinar o percentual de encapsulação dos lipossomas obtidos;
- Determinar o tamanho das vesículas lipídicas e o índice de polidispersão das partículas nas preparações;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do SbIII e estabilidade *in vitro* das formulações lipossomais obtidas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Tartarato emético (TA, $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$, código: 383376) e colesterol (COL, código: C8667) foram adquiridos da Sigma (EUA). L- α -distearoilfosfatidilcolina (DSPC) e PEG (2000)-distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE-PEG) foram fornecidos pela Lipoid GmbH (Alemanha). Água ultrapura (*Symlicity System 185*, Millipore, EUA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Metanol e clorofórmio foram adquiridos da Synth (Brasil).

4.2 Método analítico

O equipamento utilizado para quantificação de SbIII nos lipossomas foi o espectrômetro ótico Ciros CCD (Spectro) com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) do Laboratório de Geoquímica (LGqA) do Departamento de Geologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

A amostra foi nebulizada em plasma de argônio através de um nebulizador *cross-flow* para ICP e as leituras da radiação eletromagnética emitida pelo SbIII foi realizada em linha específica. Os demais parâmetros utilizados pelo aparelho foram os mesmos utilizados no desenvolvimento e validação do método analítico realizado por Reis e colaboradores (2013), dentre eles: fluxo de refrigeração de $12,0 \text{ l.min}^{-1}$, fluxo de gás auxiliar de $1,0 \text{ l.min}^{-1}$, potência do plasma de 1350 W e fluxo de gás nebulizador de $0,9 \text{ l.min}^{-1}$.

4.3 Composição dos lipossomas

Lipossomas convencionais foram compostos pelos lipídios DSPC e COL, na relação molar 5:4 respectivamente, em um total de lipídeos de 120 g.l^{-1} . Os lipossomas peguados foram compostos pelos lipídeos DSPC, COL e DSPE-PEG, na relação molar 5:4:0,3 respectivamente, em um total de lipídeos de 120 g.l^{-1} .

4.4 Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram obtidos por congelamento/descongelamento, método proposto por Mayer e colaboradores (1985), seguido de extrusão através de membranas de policarbonato de 200 nm, como proposto por Nayar e colaboradores (1989).

Os lipídeos foram solubilizados em clorofórmio e este evaporado com auxílio de um evaporador rotatório até à formação de um fino filme lipídico nas paredes do balão. O filme lipídico foi hidratado com solução tampão PBS (150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7.2) para obtenção de MLV's brancos ou vazios ou por solução aquosa de SbIII (31,8 g.l⁻¹, equivalente a 80 g.l⁻¹ de TA), isoosmótica em relação ao plasma, para obtenção de lipossomas contendo a substância ativa. As soluções obtidas foram submetidas a dez ciclos de congelamento e descongelamento utilizando nitrogênio líquido e banho-maria a 60°C. Em seguida, para obtenção de LUV's, a solução de lipossomas foi submetida a dez ciclos de extrusão através de duas membranas de policarbonato de 200 nm de diâmetro, sob pressão de 250 psi e temperatura controlada a 60°C. A separação do antimônio não encapsulado foi realizada mantendo-se a preparação em diálise em PBS durante 24 horas, com a realização de troca do meio de 12/12 horas. A Figura 1 representa o processo de preparação dos lipossomas descrito.

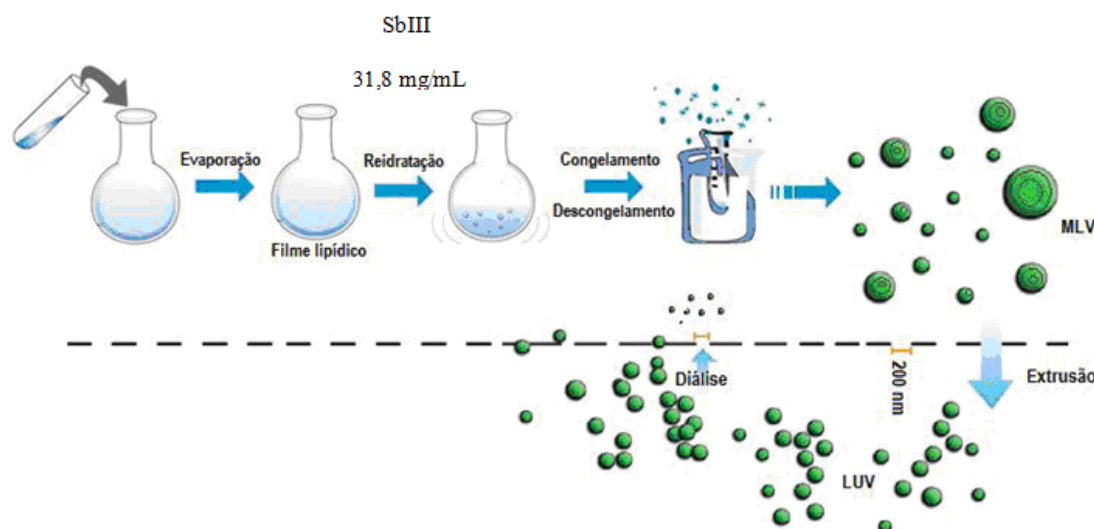


Figura 1. Método de preparação dos lipossomas através de congelamento/descongelamento, seguido de extrusão com membranas de policarbonato de 200 nm. Fonte: adaptado de VIDAL (2009), com permissão.

4.5 Revalidação Analítica

4.5.1 Solução estoque de SbIII

A solução estoque de SbIII de concentração final 1 g.l⁻¹ foi preparada pesando-se 4,36 g de TA, diluindo-se em um béquer com água ultrapura, transferindo-se o conteúdo para um balão volumétrico de 50 ml e completando-se o volume do balão com água ultrapura.

4.5.2 Soluções intermediárias de SbIII

As soluções intermediárias foram preparadas através da transferência de uma alíquota da formulação de lipossomas brancos ou vazios, convencional ou peguilado, para um balão volumétrico de 10 ml. Em seguida, adicionou-se 0,5 ml de metanol, alíquotas de solução estoque de SbIII para obtenção das concentrações: 3; 5; 7,5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 mg.l⁻¹ e completou-se o volume do balão com água ultrapura. A solução foi submetida à agitação manual para romper a estrutura lamelar dos lipossomas. Para obtenção da solução sem SbIII (amostra branco), apenas não se adicionou, ao balão volumétrico, a alíquota de solução estoque de SbIII.

4.5.3 Seletividade

Para identificar a capacidade do método de medir SbIII na presença de matriz lipídica de concentração diferente da previamente validada, observou-se se a linha de base obtida pela leitura de amostras de lipossomas brancos coincidia com a linha de base do equipamento.

Foram analisadas amostras sem SbIII e amostras com concentração de 50 mg.l⁻¹ de SbIII.

4.5.4 Linearidade

Treze diferentes concentrações (3; 5; 7,5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 mg.l⁻¹) foram obtidas através de diluições apropriadas da solução estoque de SbIII. Cada solução foi preparada em triplicata (n=3). A linearidade foi avaliada através de análise de regressão linear, para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y e coeficiente angular.

A faixa de trabalho escolhida foi ampliada em relação à anteriormente validada (3,0 a 50,0 mg.l⁻¹), pois há possibilidade de grandes variações nas concentrações de SbIII em relação as amostras lipossomais testes usuais. As concentrações testadas correspondem a 7,5 a 100% da concentração teste, visando sempre a concentração mais esperada da amostra usual se situar no centro da faixa (cerca de 40 a 50 mg.l⁻¹).

4.5.5 Precisão

No estudo de precisão foram avaliadas a repetibilidade (intra-dia) e a precisão intermediária (inter-dia). Ambas foram obtidas através da determinação de três concentrações de SbIII (20, 40 e 60 mg.l⁻¹), as quais abrangem o intervalo linear do método, em triplicatas, totalizando nove determinações. A repetibilidade foi realizada em um curto intervalo de tempo, por um mesmo analista e a precisão intermediária, em dois dias diferentes, por dois analistas diferentes. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR), segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

sendo, DP desvio padrão e CMD concentração média determinada.

4.5.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação do SbIII adicionado em quantidades conhecidas às matrizes lipossomais em três diferentes concentrações: 20,0; 40,0 e 60,0 mg.l⁻¹, em triplicatas, correspondendo a 50, 100 e 150% da concentração teste. Todas as amostras foram preparadas em triplicata (n = 9). Para avaliar a exatidão, utilizou-se a equação:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{CMD}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

sendo CMD concentração média determinada.

4.5.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média e, os cálculos do desvio padrão relativo e regressão linear, foram realizados com auxílio do programa Microsoft Office Excel 2010.

4.6 Caracterização físico-química dos lipossomas

4.6.1 Percentual de encapsulação (PE%)

A quantificação do SbIII nas formulações lipossomais foi realizada por ICP-OES. As amostras foram preparadas através da transferência de uma alíquota de 100 µl da formulação lipossomal de SbIII, convencional ou peguilada, para um balão volumétrico de 10 ml. Em seguida, adicionou-se 0,5 ml de metanol. A solução foi então submetida à agitação manual para romper a estrutura lamelar dos lipossomas e liberar o conteúdo encapsulado. Em seguida, o volume do balão volumétrico foi completado com água ultrapura. O PE% foi calculado como o teor de SbIII presente na formulação após diálise de 24 horas, em relação ao teor de SbIII presente na formulação antes da diálise, conforme equação:

$$PE\% = \left(\frac{[\text{SbIII}] \text{ nos lipossomas após diálise}}{[\text{SbIII}] \text{ nos lipossomas antes da diálise}} \right) \times 100$$

4.6.2 Determinação do tamanho e do índice de polidispersão

O tamanho dos lipossomas e o índice de polidispersão das partículas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando o equipamento Nanosizer N5 (EUA). Alíquotas das preparações lipossomais contendo SbIII ou PBS foram diluídas na proporção de 1:250 em água ultrapura. O tamanho e o índice de polidispersão foram avaliados efetuando-se as leituras de três amostras em quintuplicatas, para cada tipo de formulação.

O *software* utilizado como ferramenta para a análise estatística foi o GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Software*, EUA). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A diferença entre as formulações lipossomais experimentais foi testada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey e por teste *t* de Student.

4.6.3 Perfil de liberação *in vitro*

Para avaliar a capacidade dos lipossomas reterem o SbIII em condições que simulassem às fisiológicas, alíquotas das formulações lipossomais de SbIII foram diluídas 1:10 (v/v) em PBS, mantidas à temperatura de 37 °C e após 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas, foram colocadas em ultra filtros de celulose (Amicon[®] Ultra-0,5; 50,000 NMWL) e submetidas à centrifugação (15,520 g, por 20 minutos), de modo a permitir que a fração livre passasse pela membrana de filtração e a fração encapsulada ficasse retida sob o filtro. As amostras coletadas (fração livre e fração retida), nos diferentes tempos, foram submetidas à

dosagem por ICP/OES, sendo os valores obtidos comparados àqueles referentes à preparação inicial, a fim de determinar o perfil de liberação *in vitro* do SbIII dos lipossomas.

4.6.4 Estabilidade

Para estabelecer o percentual de SbIII liberado do interior das vesículas em condições de armazenamento e em função do tempo, as formulações lipossomais contendo SbIII e PBS foram armazenadas em geladeira, à temperatura de 4,0°C e ao abrigo da luz, por 30 dias. Nos tempos 3, 7, 15, 21 e 30 dias, alíquotas das formulações lipossomais contendo SbIII foram colocadas em ultrafiltros de celulose (Amicon[®] Ultra-0,5; 50,000 NMWL) e submetidas a centrifugação (15,520 g por 20 minutos), de modo a permitir que a fração não encapsulada passasse pela membrana de filtração e a fração encapsulada ficasse retida. As amostras coletadas (fração livre e fração retida) nos diferentes tempos foram quantificadas por ICP-OES, sendo os valores obtidos comparados àqueles referentes à preparação inicial. Calculou-se a porcentagem de liberação de SbIII dos lipossomas nos diferentes tempos estabelecidos conforme a equação:

$$\text{Liberação\%} = \left(\frac{[\text{SbIII}] \text{ na preparação armazenada}}{[\text{SbIII}] \text{ na preparação inicial}} \right) \times 100$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Revalidação Analítica

No desenvolvimento do método, as linhas de emissão identificadas como as melhores foram 187,115 e 206,833. Como na validação do método realizada por Reis e colaboradores (2013) utilizou-se a linha 206,833, optou-se pela manutenção desta linha de emissão na sua revalidação.

5.1.1 Seletividade

A leitura de amostras compostas somente por matriz de lipossomas convencionais brancos ou vazios representada pela linha azul coincidiu com a linha de base do equipamento (Figura 2). A leitura da amostra composta por lipossomas peguilados brancos (120 g.l⁻¹),

também coincidiu com a linha de base do equipamento e foi semelhante à encontrada por Reis e colaboradores (2013) para a mesma composição, porém com concentração total lipídica de 76,9 g/l.

O método demonstrou ser seletivo ao ser capaz de quantificar o SbIII nas matrizes lipídicas testadas.

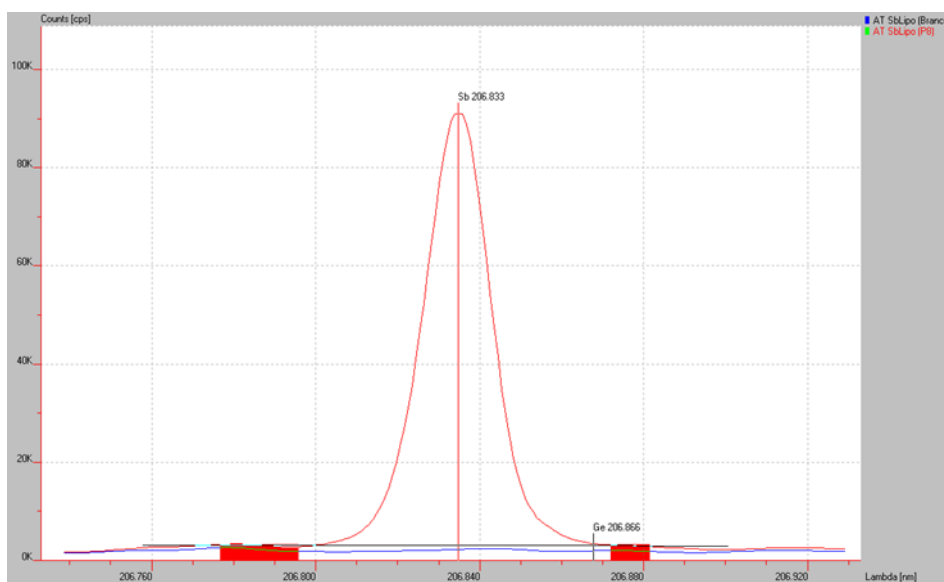


Figura 2. Leitura da emissão de radiação eletromagnética por ICP-OES de amostras de lipossomas convencionais contendo ou não SbIII. A linha azul representa a emissão da amostra de lipossomas convencionais brancos e a linha vermelha a emissão da amostra de lipossomas convencionais contendo SbIII.

5.1.2 Linearidade

A linearidade do método foi obtida por média de três determinações de amostras contendo matriz convencional ou peguilada de lipossomas em treze diferentes concentrações de SbIII. Os dados foram ajustados através de regressão de análise linear (Tabelas 2 e 3). A equação da reta de lipossomas convencionais (LipoConvencional) foi dada por: Emissão Média = 1884,7 [SbIII] – 1032,7, com coeficiente de correlação de 0,9999, significando que 99,99% da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear, com os resíduos (erro) de apenas 0,01 % (Figura 3). O DPR foi inferior a 2% para todas as concentrações. Portanto, o método analítico apresentou faixa de linearidade entre as concentrações de SbIII de 3 a 100 mg.l⁻¹, para a matriz convencional.

Tabela 2. Resultados médios obtidos da emissão de radiação eletromagnética por ICP-OES e concentração calculada de SbIII nas amostras contendo matriz lipossomal convencional.

| Concentração de SbIII (mg.l ⁻¹) | Média de Emissão (± DP)* | Concentração média calculada de SbIII (mg.l ⁻¹) (± DP)* | DPR (%)** |
|--|-----------------------------|--|-----------|
| 3,0 | 5087 ± 34,93 | 3,24 ± 0,01 | 0,30 |
| 5,0 | 8688 ± 116,52 | 5,15 ± 0,06 | 1,16 |
| 7,5 | 13294 ± 71,06 | 7,60 ± 0,03 | 0,39 |
| 10,0 | 17650 ± 143,25 | 9,91 ± 0,07 | 0,70 |
| 20,0 | 36469 ± 121,26 | 19,89 ± 0,06 | 0,30 |
| 30,0 | 55207 ± 143,25 | 29,84 ± 0,18 | 0,60 |
| 40,0 | 73834 ± 357,00 | 39,72 ± 0,10 | 0,25 |
| 50,0 | 92994 ± 199,76 | 49,88 ± 0,03 | 0,06 |
| 60,0 | 110635 ± 70,23 | 59,24 ± 0,13 | 0,21 |
| 70,0 | 132304 ± 258,93 | 70,74 ± 0,20 | 0,28 |
| 80,0 | 150686 ± 377,02 | 80,50 ± 0,09 | 0,11 |
| 90,0 | 168238 ± 185,07 | 89,81 ± 0,03 | 0,03 |
| 100,0 | 187260 ± 71,89 | 99,90 ± 0,19 | 0,19 |

*DP = desvio padrão, n = 3. **DPR = desvio padrão relativo.

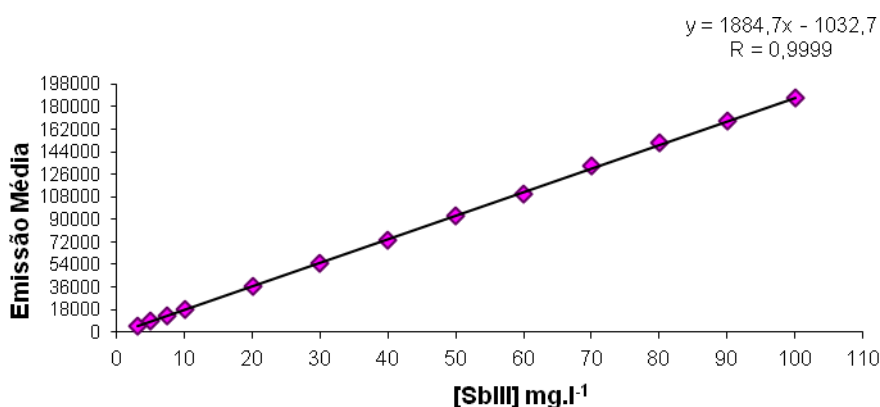


Figura 3. Curva analítica de SbIII em matriz lipossomal convencional por ICP-OES.

A equação da reta de lipossomas peguilados (LipoPeguilado) foi dada por: Emissão Média = 1864,6 [SbIII] – 2168,9, com coeficiente de correlação de 0,9996, significando que 99,96 % da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear, com os resíduos (erro) de apenas 0,04 % (Figura 4). O DPR foi inferior a 2% para todas as concentrações. Portanto, método analítico apresentou faixa de linearidade entre as concentrações de SbIII de 3 a 100 mg.l⁻¹ para a matriz peguilada.

Tabela 3. Resultados médios obtidos da emissão de radiação eletromagnética por ICP-OES e concentração calculada de SbIII nas amostras contendo matriz lipossomal pegulada.

| Concentração de SbIII (mg.l ⁻¹) | Média de Emissão (± DP)* | Concentração média calculada de SbIII (mg.l ⁻¹) (± DP)* | DPR (%)** |
|---|--------------------------|---|-----------|
| 3,0 | 4253 ± 23,67 | 3,39 ± 0,01 | 0,29 |
| 5,0 | 7987 ± 45,23 | 5,39 ± 0,02 | 0,37 |
| 7,5 | 12288 ± 227,49 | 7,70 ± 0,12 | 1,55 |
| 10,0 | 17639 ± 261,55 | 10,57 ± 0,14 | 1,32 |
| 20,0 | 35083 ± 79,56 | 19,93 ± 0,04 | 0,20 |
| 30,0 | 52132 ± 114,58 | 29,08 ± 0,06 | 0,20 |
| 40,0 | 71806 ± 171,20 | 39,64 ± 0,09 | 0,22 |
| 50,0 | 90153 ± 87,29 | 49,49 ± 0,04 | 0,08 |
| 60,0 | 106900 ± 1645,49 | 58,48 ± 0,88 | 1,50 |
| 70,0 | 128001 ± 1067,20 | 69,80 ± 0,57 | 0,81 |
| 80,0 | 147841 ± 659,60 | 80,45 ± 0,35 | 0,43 |
| 90,0 | 165510 ± 194,35 | 89,93 ± 0,10 | 0,11 |
| 100,0 | 186662 ± 340,37 | 101,28 ± 0,18 | 0,17 |

*DP = desvio padrão, n = 3. **DPR = desvio padrão relativo.

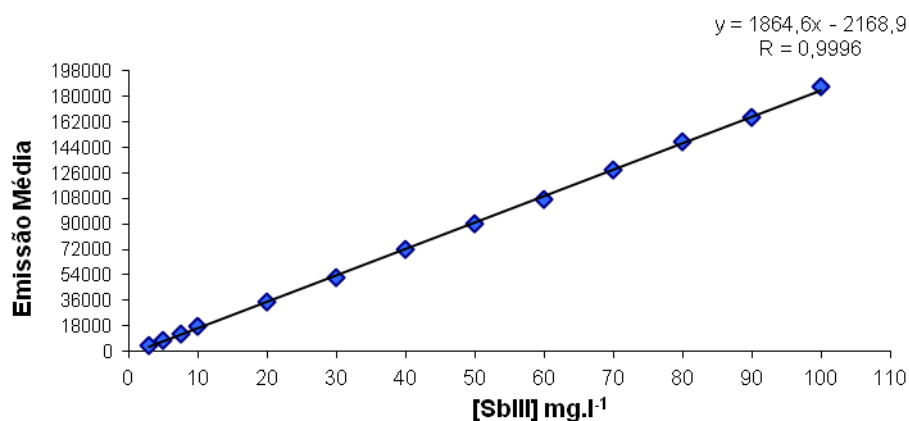


Figura 4. Curva analítica de SbIII em matriz lipossomal pegulada por ICP-OES.

5.1.3 Precisão

A repetibilidade apresentou DPR entre 0,31 e 1,08 para o SbIII em matriz lipossomal convencional e entre 0,92 e 2,37 para o SbIII em matriz lipossomal pegulada (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados obtidos no estudo de repetibilidade do método de quantificação de SbIII em lipossomas por ICP-OES.

| | Concentração teórica (mg.l ⁻¹) | Concentração Experimental | | DPR (%)* | Exatidão (%) | |
|--------------|---|------------------------------|-------|----------|--------------|--------|
| Matriz | 20,0 | 20,14 | 19,86 | 20,29 | 1,08 | 100,48 |
| lipossomal | 40,0 | 39,99 | 40,13 | 39,83 | 0,37 | 99,95 |
| convencional | 60,0 | 60,94 | 61,10 | 61,32 | 0,31 | 101,86 |
| Matriz | 20,0 | 20,50 | 20,41 | 19,63 | 2,37 | 100,90 |
| lipossomal | 40,0 | 40,67 | 39,77 | 38,83 | 2,31 | 99,39 |
| peguilada | 60,0 | 59,72 | 60,81 | 60,05 | 0,92 | 100,32 |

*DPR = desvio padrão relativo.

Ao avaliar a variação entre ensaios analíticos realizados em dias diferentes, o estudo de precisão intermediária apresentou DPR entre 0,45 e 1,82 para SbIII em matriz lipossomal convencional e entre 0,65 e 2,28 para SbIII matriz lipossomal peguilada (Tabela 5). Todos os valores obtidos estão dentro do limite exigido em validação analítica (DPR < 5%).

Tabela 5. Resultados obtidos no estudo de precisão intermediária do método de quantificação de SbIII em lipossomas por ICP-OES.

| | Concentração teórica (mg.l ⁻¹) | Média de emissão | | Média de concentração calculada (\pm DP)* | DPR(%)** |
|--------------|--|------------------|--------|---|----------|
| | | Dia 1 | Dia 2 | | |
| Matriz | 20,0 | 36721 | 37710 | 20,29 \pm 0,37 | 1,82 |
| lipossomal | 40,0 | 76164 | 75092 | 40,67 \pm 0,40 | 0,98 |
| convencional | 60,0 | 114927 | 114190 | 61,33 \pm 0,28 | 0,45 |
| Matriz | 20,0 | 36831 | 36036 | 20,70 \pm 0,30 | 1,45 |
| lipossomal | 40,0 | 71590 | 72279 | 39,74 \pm 0,26 | 0,65 |
| peguilada | 60,0 | 112745 | 109087 | 60,64 \pm 1,39 | 2,28 |

*DP = desvio padrão; **DPR = desvio padrão relativo.

5.1.4 Exatidão

A exatidão foi verificada para três níveis de concentração: 20, 30 e 60 mg.l⁻¹. Os dados experimentais obtidos revelaram uma recuperação média do analito de 100,76 % (99,95 -

101,86 %) para o SbIII em matriz lipossomal convencional e de 100,37% (99,39 - 100,90 %) para o SbIII em matriz lipossomal peguilada, todas dentro dos limites aceitáveis (95-105%) (Tabela 5). Os resultados do estudo de exatidão demonstram que variações da concentração de SbIII, podem ser prontamente quantificadas pelo método, bem como não há interferência dos componentes, das duas matrizes lipossomais, na quantificação do analito. Portanto, o método analítico é suficientemente exato para ambas as formulações.

5.2 Caracterização físico-química dos lipossomas

5.2.1 Percentual de encapsulação (PE%)

A quantidade de fármaco encapsulada nos lipossomas foi determinada para permitir a administração de doses equivalentes de SbIII encapsulado ou não, proporcionando, assim, a comparação da toxicidade das formulações lipossomais com o fármaco livre e, ainda, para conhecer o percentual de SbIII encapsulado das diferentes preparações. Na Tabela 6 são apresentados os resultados de eficiência de encapsulação de lipossomas convencionais e peguilados após as preparações.

Tabela 6. Concentração de SbIII ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) nos lipossomas antes e após diálise e percentual de encapsulação (PE%). Medidas realizadas por ICP-OES. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3).

| Lipossomas | [SbIII] antes da diálise | [SbIII] pós diálise | PE% |
|----------------------|--------------------------|---------------------|------------------|
| LCSbIII ^a | 28,44 \pm 0,90 | 4,23 \pm 0,16 | 14,86 \pm 0,28 |
| LPSbIII ^b | 18,64 \pm 0,07 | 2,58 \pm 0,01 | 13,78 \pm 0,02 |

Notas: ^alipossomas convencionais de antimônio, ^blipossomas peguilados de antimônio.

A encapsulação de uma substância pode variar dependendo do tamanho dos lipossomas, do peso molecular das moléculas encapsuladas, composição lipídica das vesículas e do seu procedimento de preparação (MONNARD; OBERHOLZER; LUISI, 1997). Lipossomas peguilados de SbIII (LPSbIII) não apresentaram diferença estatística de PE% em relação os lipossomas convencionais de SbIII (LCSbIII). Borborema (2010) observou que a encapsulação do SbV, por diferentes métodos, em vesículas lipídicas que continham um fosfolipídio negativamente carregado, como a fosfatidilserina, o percentual de encapsulação

foi cerca de 13% superior às que não continham esse fosfolipídio. O DSPE-PEG é um fosfolipídio carregado negativamente.

Schettini e colaboradores (2003) obtiveram eficiência de encapsulação de 38% em lipossomas de SbV utilizando liofilização. Quando foi adicionado um crioprotetor nesse mesmo processo de preparação dos lipossomas, o mesmo grupo de pesquisa obteve eficiência de encapsulação de até 47% (SCHETTINI *et al.*, 2006).

As formulações lipossomais de SbIII obtidas no presente trabalho foram consideradas satisfatórias para utilização no estudo de toxicidade aguda. Permitiu-se, portanto, utilizar um volume não superior a 0,3 ml a ser injetado por animal (DE PAIVA *et al.*, 2005). Os resultados obtidos de encapsulação do SbIII estão em acordo com os obtidos por nosso grupo de pesquisa, os quais variaram de 6,5 a 15,08% para formulações convencionais (DE MELO *et al.*, 2003; CASTRO, 2013) e de 6,5 a 14,5% para formulações peguiladas (DE MELO *et al.*, 2003; MACIEL *et al.*, 2010).

5.2.2 Determinação do tamanho e do índice de polidispersão

Na Tabela 7 são apresentados os resultados do diâmetro médio e o índice de polidispersão do tamanho da população dos lipossomas convencionais e peguilados estudados.

Tabela 7. Diâmetro médio dos lipossomas e índice de polidispersão das partículas medidos por espectroscopia de correlação de fótons.

| Amostra | Diâmetro médio (nm) | Índice de polidispersão |
|----------------------|---------------------------------|-------------------------|
| LCV ^a | 228,1 ± 8,37 | 0,198 ± 0,041 |
| | 228,9 ± 23,37 | 0,176 ± 0,081 |
| | 217,4 ± 3,26 | 0,109 ± 0,051 |
| LCSbIII ^b | 207,2 ± 7,68 | 0,061 ± 0,037 |
| | 206,8 ± 0,96 | 0,062 ± 0,021 |
| | 198,0 ± 1,80 | 0,071 ± 0,030 |
| LPV ^c | 207,4 ± 2,41 | 0,073 ± 0,025 |
| | 225,7 ± 9,08 | 0,135 ± 0,085 |
| | 216,5 ± 1,53 | 0,048 ± 0,049 |
| LPSbIII ^d | 172,6 ± 1,73 ^{*,&} | 0,019 ± 0,014 |
| | 177,7 ± 8,12 ^{*,&} | 0,118 ± 0,075 |
| | 169,5 ± 3,68 ^{*,&} | 0,088 ± 0,048 |

Notas: ^alipossomas convencionais brancos ou vazios; ^blipossomas convencionais de SbIII; ^clipossomas peguados brancos ou vazios; ^dlipossomas peguados de SbIII. *Representa a diferença significativa entre LPV e LPSbIII. &Representa a diferença significativa entre LPSbIII e LCSbIII. Dados foram expressos como média ± desvio padrão (n=5).

Verificou-se que os tamanhos das partículas foi homogêneo para todas as formulações. O índice de polidispersão das preparações obtidos foi inferior a 0,3, sendo, portanto, todas consideradas monodispersas (HUNTER; FRISKEN, 1998).

Em média, o tamanho das partículas foi condizente com o esperado, pois se utilizou o processo de múltiplas extrusões através de membranas com poros de tamanhos determinados (200 nm). Os resultados apresentados para os lipossomas de SbIII corroboram com os achados de De Melo e colaboradores (2003) e Maciel e colaboradores (2010), onde após a realização de extrusão sequencial de MLV's, através de membrana de policarbonato, verificou-se a redução do tamanho médio e da heterogeneidade das vesículas lipídicas.

A determinação do tamanho das vesículas lipídicas serve também como um indicador de alterações na sua estabilidade física, pois os lipossomas podem sofrer agregação, fusão e ruptura membranar, com o decorrer do tempo e dependendo da constituição lipídica, bem como do meio envolvente (FERREIRA *et al.*, 2005). A extrusão de lipossomas através de membranas de policarbonato representa uma abordagem vantajosa para a produção de vesículas unilamelares, como distribuição de tamanho bem caracterizado e definido. O

processo de extrusão é reprodutível e não induz o colapso dos fosfolipídios (BORBOREMA, 2010).

Neste trabalho foram produzidas formulações lipossomais convencionais e peguiladas apresentando tamanho médio de aproximadamente 230 e 170 nm, respectivamente. O tamanho das vesículas lipídicas é uma abordagem importante no direcionamento ao SFM. Como demonstrado por Schettini e colaboradores (2006), lipossomas de 400 nm contendo antimoniato de meglumina levaram a um maior direcionamento do fármaco para a medula óssea de cães experimentais com LV. Carter e colaboradores (1989) demonstraram que lipossomas pequenos (100 nm) contendo composto antimonial foram mais eficazes na redução do número de parasitos na medula óssea de camundongos experimentais com LV. O uso de lipossomas com tamanho médio de 0,1 a 1 µm e compostos por fosfolipídios de carga negativa são mais eficientes para serem utilizados como agentes terapêuticos direcionados a parasitos que residem em células do SFM (MAYER *et al.*, 1986). LPSbIII apresentou tamanho menor em relação a sua formulação branca ou vazia e em relação a formulação LCSbIII. Os resultados obtidos foram contrários aos esperados pela hipótese relacionada ao aumento do volume aquoso do lipossoma causado por um lipídio carregado negativamente, resultante da separação das bicamadas lipídicas adjacentes (UHUMWANGHO; OKOR, 2005). As causas para o entendimento desses resultados obtidos ainda permanecem desconhecidas.

5.2.3 Perfil de liberação *in vitro*

O perfil de liberação de um fármaco em lipossomas é um importante fator no desenvolvimento e caracterização de um sistema nanocarreador efetivo. Para a análise do perfil de liberação *in vitro* do SbIII do interior das vesículas lipossomais, utilizou-se condições experimentais visando a manutenção de condições *sink* (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8. Cinética de liberação do SbIII dos lipossomas convencionais (LCSbIII) em condições experimentais (37°C).

| Incubação (horas) | LCSbIII retido (mg.ml⁻¹) | % liberação |
|--------------------------|--|--------------------|
| 0 | 4,41 | - |
| 1 | 1,84 | 58,47 |
| 3 | 1,54 | 65,28 |
| 6 | 1,50 | 66,19 |
| 12 | 1,26 | 71,64 |
| 24 | 1,17 | 73,68 |
| 36 | 1,11 | 75,04 |
| 48 | 1,01 | 77,31 |
| 72 | 0,73 | 83,66 |

Tabela 9. Cinética de liberação do SbIII dos lipossomas peguilados (LPSbIII) em condições experimentais (37°C).

| Incubação (horas) | LPSbIII retido (mg.ml⁻¹) | % liberação |
|--------------------------|--|--------------------|
| 0 | 2,56 | - |
| 1 | 2,28 | 11,14 |
| 3 | 2,27 | 11,41 |
| 6 | 2,26 | 11,73 |
| 12 | 2,26 | 11,75 |
| 24 | 2,25 | 11,80 |
| 36 | 2,24 | 11,82 |
| 48 | 1,91 | 25,52 |
| 72 | 1,67 | 34,94 |

Uma rápida liberação do SbIII ocorreu de 1 a 6 horas para a formulação convencional. Após, uma fase de liberação constante seguiu por um período de 12 a 48h. Já com a formulação peguilada, observou-se uma liberação lenta e constante do SbIII nas primeiras 36 horas (Figura 5).

A liberação do SbIII *in vitro*, em solução PBS a 37°C, foi inferior a 50% nos lipossomas pegulados durante 72 horas. Já os lipossomas convencionais apresentaram uma cinética de liberação, no mesmo intervalo de tempo, superior a 80%.

A cinética de liberação do princípio ativo de uma substância encapsulada no compartimento aquoso interno dos lipossomas é regida por um equilíbrio termodinâmico, sendo que a liberação do princípio ativo para o meio externo ocorrerá até que se atinja esse equilíbrio (FRÉZARD *et al.*, 2005). A pressão osmótica do meio interno dos lipossomas é um fator importante quando expostos a meios aquosos. A existência de uma diferença de pressão osmótica entre os meios, interno e externo, induz um movimento de água por osmose através da membrana sendo possível maior liberação do conteúdo encapsulado (FRÉZARD *et al.*, 2005).

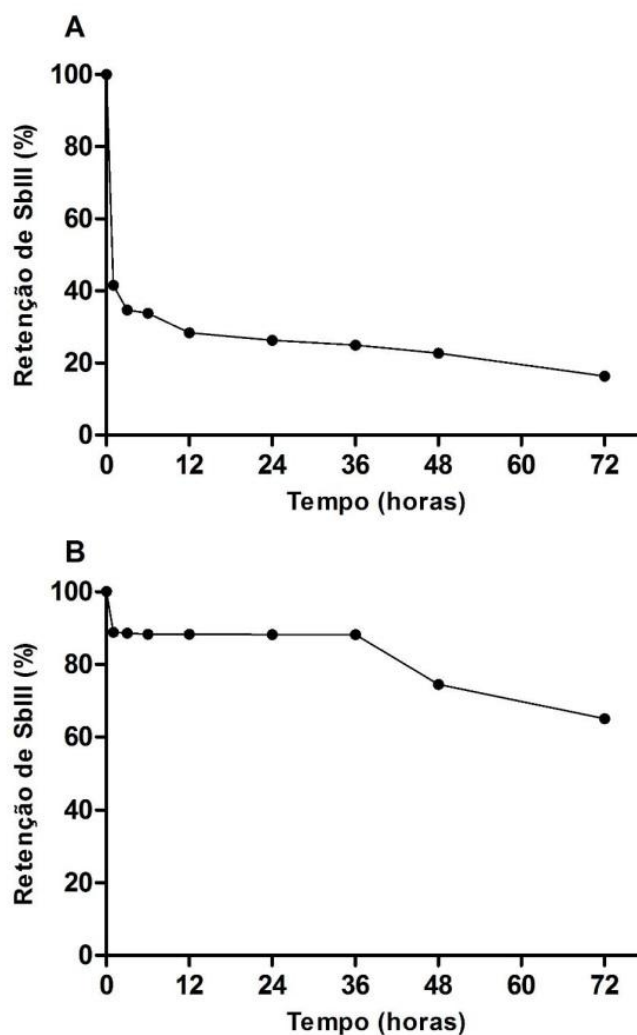


Figura 5. Cinética de liberação *in vitro* do SbIII das formulações lipossomais. A = lipossomas convencionais de SbIII (LCSbIII) e B = lipossomas pegulados de SbIII (LPSbIII).

É crucial ressaltar que se deve identificar a localização adequada do fármaco nas vesículas para prever sua real liberação e ação (LACOWICZ, 1999; FERREIRA *et al.*, 1995). Também é necessário um melhor conhecimento das propriedades químicas, como o caráter ácido-base e a polaridade dos fármacos, os quais permitem descrever melhor o efeito da ligação destes nas propriedades eléctricas da membrana fosfolipídica (FERREIRA *et al.*, 1995)

Do exposto, posteriormente se depreende a necessidade de um estudo da interação do SbIII com os lipossomas utilizados, com o objetivo de auxiliar a compreensão de alguns parâmetros fundamentais ao desenvolvimento de formulações e medicamentos. Neste contexto, pretende-se que este trabalho contribua com uma detalhada caracterização físico-química das formulações, a qual permita auxiliar a elucidação da interação e localização do SbIII nos lipossomas. Ainda não há comprovação do processo de adsorção do SbIII nesses nanocarreadores.

5.2.4 Estabilidade dos lipossomas

Os valores obtidos na avaliação da estabilidade das formulações lipossomais de SbIII, convencionais e peguiladas, armazenadas em geladeira (4,0°C), são apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Estabilidade da formulação lipossomal convencional (LCSbIII) estocada a 4°C por até 30 dias.

| Armazenamento (dias) | [SbIII] (mg.ml ⁻¹) nos lipossomas | % liberação |
|----------------------|---|-------------|
| 0 | 4,407 | - |
| 3 | 2,78 | 36,95 |
| 7 | 1,94 | 56,07 |
| 15 | 1,86 | 57,98 |
| 21 | 1,59 | 64,09 |
| 30 | 1,03 | 76,84 |

Tabela 11. Estabilidade da formulação lipossomal peguilada (LPSbIII) estocada a 4°C por até 30 dias.

| Armazenamento (dias) | [SbIII] (mg.ml ⁻¹) nos lipossomas | % liberação |
|----------------------|---|-------------|
| 0 | 2,56 | - |
| 3 | 2,32 | 9,30 |
| 7 | 2,29 | 10,56 |
| 15 | 2,18 | 14,71 |
| 21 | 1,42 | 45,49 |
| 30 | 1,19 | 54,25 |

A estabilidade dos lipossomas está diretamente relacionada ao tamanho das vesículas lipídicas, composição, temperatura de transição de fase e carga dos fosfolipídios (ANDERSON;OMRI, 2004). O armazenamento de lipossomas na forma de suspensão aquosa é, muitas vezes, incompatível com a estabilidade requerida para produtos farmacêuticos (FRÉZARD *et al.*, 2005). Ao avaliar a estabilidade das formulações lipossomais em condições de armazenamento por até dia 30 dias, observou-se que a formulação peguilada reteve em 30 dias, maior percentual SbIII, aproximadamente 50%, demonstrando assim, maior estabilidade de armazenamento, quando comparada à formulação convencional. Esta foi pouco estável, uma vez que em 7 dias, verificou-se que mais de 50% do SbIII havia sido liberado para o exterior das vesículas. Seguindo o mesmo padrão de liberação rápida inicial identificada nos estudos de liberação.

Para garantir a confiabilidade dos resultados no estudo de toxicidade aguda dessas formulações preparadas, utilizou-se ambas imediatamente após o preparo e a quantificação do SbIII por ICP-OES.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O método analítico demonstrou ser linear, seletivo, preciso e exato. Todos os parâmetros necessários para a sua revalidação preencheram os critérios das orientações internacionais e brasileiras, sendo, portanto, revalidado.
- ✓ O método utilizado nas preparações dos lipossomas proporcionou um PE% do SbIII de, aproximadamente, 15% para a formulação convencional e 14% para a formulação peguilada.
- ✓ Os resultados obtidos de tamanhos das partículas, entre 170 e 230 nm e dos índices de polidispersão, inferiores a 0,3, foram condizentes com o esperado, para ambas as formulações.
- ✓ A formulação peguilada foi considerada mais estável durante armazenamento a 4°C por 30 dias e apresentou perfil de liberação do SbIII mais lento, durante 72 horas a 37°C.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA LIPOSSOMAS DE SbIII ASSOCIADOS OU NÃO À ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

1 INTRODUÇÃO

Os estudos não clínicos são utilizados para avaliação de efeitos potenciais e riscos relacionados à administração de novos fármacos, novas formulações e/ou associações medicamentosas. A função dos dados não clínicos de segurança é, essencialmente, de antecipar riscos, quando a experiência clínica é nula ou limitada, e a de complementar a informação obtida na clínica (BRASIL, 2010).

Os estudos de avaliação não clínica de segurança são constituídos por estudos de toxicidade de dose única (toxicidade aguda) e de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local, carcinogenicidade e toxicocinética. A avaliação da toxicidade aguda é realizada por exposição a elevadas doses de determinado fármaco em estudo, tendo como propósito principal identificar uma dose claramente tóxica, os órgãos alvo da substância e gerar um guia para seleção de doses em testes subsequentes. Do ponto de vista da pesquisa científica, um adequado desenho do estudo de toxicidade aguda pode proporcionar indícios do mecanismo de toxicidade e a relação estrutura-atividade para uma classe particular de substâncias químicas (HAYES; DiPASQUALE, 2001).

Diferentes regulamentações e guias preconizados por órgãos e agências oficiais são encontrados para a realização de estudos não clínicos de toxicidade, tais como os da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, *European Medicines Agency* (EMA), *Food and Drug Administration* (FDA), *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) e *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). Em relação à toxicidade aguda, todos condizem em que as investigações devem ser conduzidas em duas espécies de animais, uma roedora e outra não roedora, visando uma base para melhor extrapolação dos dados obtidos de toxicidade para seres humanos. Preconiza-se que o período de acompanhamento dos animais seja de no mínimo quatorze dias após administração da dose do fármaco, ou associação em estudo, em um período não superior a 24 horas. Deve ser determinada a dose máxima tolerada e/ou dose limite e avaliados os sinais clínicos, como peso corporal e patologia clínica; bem como que todos os animais sejam necropsiados e que seja avaliada a toxicidade em órgãos-alvo.

Como mencionado anteriormente, apesar dos antimoniais serem empregados no tratamento das leishmanioses há décadas, ainda não se conhece claramente a toxicidade seletiva e mecanismo de ação desses compostos. Sendo assim, estudos de segurança são imprescindíveis para a melhor compreensão do seu comportamento tóxico, propiciando

atualizações na terapêutica, determinação de menores doses a serem utilizadas, reduzindo casos de resistência e efeitos colaterais.

O presente trabalho possui caráter interdisciplinar e interinstitucional, com o objetivo principal de subsidiar o preenchimento de lacunas existentes sobre os compostos antimoniais e seu comportamento biológico. Seu enfoque é predominantemente toxicológico, sendo os aspectos relacionados à eficácia das formulações lipossomais utilizadas, descritos em outros trabalhos (De MELO, 2003; CASTRO, 2013), porém todos realizados em estreita colaboração, complementando-se mutuamente.

Neste contexto e levando-se em consideração: a potencial possibilidade de rejuvenescimento do SbIII na forma lipossomal que minimizaria a toxicidade associada a este semimetal; a continuidade de estudos prévios que geraram resultados interessantes e inéditos, dentre eles a potencial ação cardioprotetora do SbIII na forma lipossomal e quando associado ao ácido ascórbico (AA) (MACIEL *et al.*, 2010; REIS, 2010; CASTRO 2013); o presente trabalho avaliou em estudo não clínico, a toxicidade aguda do SbIII na sua forma livre e lipossomais, associados ou não à administração de AA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Testes toxicológicos são realizados para se ter dados sobre as condições em que as entidades químicas produzem efeitos tóxicos, qual a natureza desses efeitos e quais os níveis seguros de exposição (LOOMIS; HAYES, 1996). Assim, a função dos dados não clínicos de segurança é essencialmente a de antecipar riscos e a de complementar a informação obtida na clínica (BRASIL, 2010).

Por motivos éticos, morais e legais, a obtenção de dados toxicológicos em seres humanos é bastante limitada (WHO, 1992). Assim, as informações toxicológicas não clínicas, ou seja, com animais de laboratórios, em condições previamente padronizadas, submetidas e aprovadas pelos Conselhos de Ética em Experimentação Animal, devem ser avaliadas (MORTON, 1998; BOELSTERLI, 2003).

Os animais selecionados para um experimento devem ser de espécie e qualidade apropriadas e devem apresentar boas condições de saúde, utilizando-se um número mínimo necessário para obtenção de resultados válidos. Baseando-se nas facilidades de manutenção e observação, na possibilidade de utilização de um maior número de indivíduos, com ciclos vitais curtos, alta prolificidade, padronização genética e do ambiente de laboratório, podem ser utilizados camundongos, *Mus musculus* e, ratos, *Rattus norvegicus* (BRASIL, 1996).

A dose letal mediana, DL_{50} , é definida pela OECD como o valor obtido estatisticamente de uma dose única de uma substância em que se espera causar morte em 50% dos animais de uma população estudada (KLAASSEN; WATKINS, 2001). O teste para determinação da DL_{50} foi introduzido em 1927 por Trevan e tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para a aprovação de novos fármacos por várias agências reguladoras, como a americana *Food and Drug Administration* (FDA) (VALADARES, 2006). Para a realização do teste da DL_{50} eram empregados muitos animais, mais de 300 animais para cada espécie estudada e para cada substância testada (STAMMATI *et al.*, 2005).

Em 1984, Purchase e colaboradores propuseram um novo método para a avaliação da toxicidade aguda oral, o qual evitava utilizar o critério morte dos animais como o objetivo final e propôs a observação do aparecimento de sinais claros de toxicidade decorrentes da exposição a uma série de doses fixas. Este método ficou conhecido como o Teste da Dose Fixa (TDF), o qual permite classificar substâncias de forma compatível com o sistema empregado pela União Europeia, que utilizava os valores de DL_{50} . (VAN DEN HEUVEL *et al.*, 1990). O TDF também fornece a informação necessária sobre tempo de início, duração e desfecho dos sinais de toxicidade e induz redução de dor e sofrimento nos animais

(VALADARES, 2006). Posteriormente, surgiram os métodos da Toxicidade Aguda de Classe (TAC) e o Teste *Up and Down* (TUD) recomendados pela OECD. Em dezembro de 2002, o teste da DL₅₀ foi finalmente banido (VALADARES, 2006).

Quadro 1. Métodos alternativos para a estimativa da DL₅₀ preconizados nos protocolos OECD e sugeridos pelo Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos da ANVISA (2010).

| Testes | Protocolo OECD | Princípio |
|----------------------------------|---------------------------|---|
| Teste da Dose Fixa (TDF) | OECD n° 420 (2001) | Menor dose que cause toxicidade evidente |
| Toxicidade Aguda de Classe (TAC) | OECD n° 423 (2001) | Menor dose que cause letalidade |
| Teste <i>Up and Down</i> (TUD) | OECD n° 425 (2001) | Doses testadas (para cima ou para baixo) em animais individuais conforme resultado anterior |

Evidências toxicológicas demonstram que toda substância química é um agente tóxico em potencial, dependendo das condições de exposição, principalmente da dose administrada, do tempo, da frequência e via de administração (CASTRO, 1993). Na avaliação da toxicidade aguda, parâmetros não letais que afetem o bem-estar geral do animal, como sinais clínicos de toxicidade e achados patológicos devem ser considerados na avaliação (KLAASSEN, 2001).

Na década de 40 foram realizados os primeiros estudos de segurança dos compostos antimoniais (KIRK; SATI, 1940). A comprovação da maior eficácia e segurança do SbV, levou ao abandono do uso do SbIII no tratamento das leishmanioses e ao estabelecimento de doses do SbV, tendo em vista não somente o percentual de cura, mas o aparecimento de efeitos adversos (KIRK; SATI, 1940; CHULAY *et al.*, 1988).

O antimônio é considerado um agente clastogênico, mas não mutagênico no seu estado trivalente. A sua carcinogenicidade ainda não foi comprovada em humanos. Porém, há relatos da ocorrência de câncer pulmonar em animais de laboratório, principalmente ratas, que receberam antimoniais (RATH *et al.*, 2003).

A razão da toxicidade e o mecanismo de ação dos antimoniais ainda não estão bem esclarecidos. Em 1943, surgiu a hipótese de que o SbV atue como um pró-fármaco (GOODWIN; PAGE, 1943). A enzima glutathiona redutase (GSH), responsável pelos

mecanismos de defesa contra danos oxidativos no organismo, contém grupo sulfidril e é o tiol predominante no meio intracelular sendo, portanto, um forte candidato a redutor de SbV a SbIII (FRÉZARD *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2003). Outros autores também sugeriram que, para exercer a função leishmanicida, o SbV deveria ser convertido a SbIII, a espécie química considerada mais tóxica seria, no entanto, a efetiva (MOTTRAM; COOMBS, 1985; SERENO *et al.*, 1998).

Em relação à cardiotoxicidade, há relatos de alterações de eletrocardiograma (ECG) em pacientes em tratamento com antimoniais. Achatamento ou inversão da onda T, a qual representa a repolarização ventricular e é normalmente ascendente, prolongamento do intervalo QT (sístole elétrica total ventricular, compreendendo o tempo desde a despolarização até a repolarização dos ventrículos direito e esquerdo), difusa repolarização ventricular, isquemia subepicárdica, traçado sugestivo de pericardite aguda e Torsades de pointes têm sido descritos (DIETZE, 2003; OWENS JÚNIOR; NOLIN, 2006; LIMA, 2007).

A anemia e a hiperpotassemia são fatores que podem predispor às alterações cardíacas. Pacientes que apresentam alterações, mesmo leves, da condução elétrica devem ser tratados com antimoniais em regime hospitalar e com monitoramento através de ECG (FALQUETO; SESSA, 2005).

Lacerda-Júnior e colaboradores (1965) demonstraram que não há correlação entre os tipos de tratamentos, SbIII ou SbV, com as alterações encontradas no ECG. Bloqueios atrioventriculares também foram descritos e a monitorização com ECG, por sua vez, é indicada também para pacientes que recebem tratamentos, mesmo curto e com baixas doses, de antimoniais (RIBEIRO *et al.*, 1999).

A eliminação do antimônio ocorre principalmente por filtração glomerular e, em seres humanos, foi observada uma fase de excreção rápida e outra lenta (VALLADARES *et al.*, 1996; HANTSON *et al.*, 2000; MIEKELEY *et al.*, 2002). Sampaio e Marsden (1997) observaram redução da taxa de filtração glomerular, aumento da fração de excreção de sódio, aumento do número de cilindros granulados e hialinos e de leucócitos no exame de urina de pacientes em uso de antimoniais. A disfunção renal, aparentemente, está relacionada a dois mecanismos principais: interferência na ação do hormônio antidiurético nos tubos coletores e ação direta do antimônio em células tubulares (VEIGA *et al.*, 1990; DIETZE, 2003; LIMA, 2007). Insuficiência renal e a necrose tubular aguda podem ocorrer durante a terapia com antimoniais e podem levar o paciente ao óbito (CUCÉ; BELDA JÚNIOR; DIAS, 1990; RODRIGUES *et al.*, 1999; DIAMENT *et al.*, 2003).

No início do tratamento da leishmaniose tem sido descrito a ocorrência de insuficiência respiratória e isto se deve, provavelmente, ao edema de vias aéreas superiores, resultante da reação inflamatória provocada pela morte da *Leishmania* (DIETZE, 2003; FALQUETO; SESSA, 2005). Artralgia, mialgia, febre, cefaleia (GONTIJO; CARVALHO, 2003; LIMA, 2007) são sintomas comumente descritos durante o tratamento com antimoniais. Prurido, insônia, choque pirogênico, exacerbação de lesões na pele também são efeitos adversos atribuídos a estes fármacos (DIETZE, 2003; BRASIL, 2007).

Aumento da fosfatase alcalina (FAL) e de enzimas pancreáticas, como amilase e lipase, também podem ser complicações do tratamento com os antimoniais (ARANA; RIZZO; DIAS, 2001; BLUM *et al.*, 2004; LIMA, 2007). As manifestações gastrointestinais, como náusea e dor abdominal, são parcialmente explicadas pela pancreatite química (GASSER JÚNIOR *et al.*, 1994). A hiperamilasemia tende a ocorrer precocemente durante a terapia com antimonial, sendo, no entanto, reduzida com a descontinuação do tratamento (BLUM *et al.*, 2004).

Reações hematológicas, como anemia, leucopenia, eosinofilia e plaquetopenia, também foram relatadas em pacientes em tratamento com fármacos antimoniais (BLUM *et al.*, 2004). Ainda são descritos, o surgimento de neuropatia periférica reversível (BLUM *et al.*, 2004; SINGH; SIVAKUMAR, 2004), pneumonite (GRÜBER; RANGEL; LUGO, 2003), tosse e cefaleia (ARANA; RIZZO; DIAS, 2001).

Alterações histológicas no fígado, baço e rim causadas por espécies inorgânicas de Sb (III e V) têm sido relatadas (DIETER, 1992; LUGO *et al.*, 1994, POON *et al.*, 1998).

Dieter (1992) avaliou a toxicidade aguda e subcrônica do TA em ratos F344/N e camundongos B6C3F1. Utilizou para administração do TA, as vias oral por 14 dias e a via intraperitoneal (IP), por 16 dias e/ou 13 semanas e concluiu ser a via IP, a melhor a ser utilizada para a sua administração. Os resultados demonstraram que o TA apresentou evidências de toxicidade em camundongos, quando administrado via IP e em doses mais elevadas.

Existem relatos de atividade antineoplásica dos compostos antimoniais e são encontrados trabalhos visando à elucidação do possível mecanismo de ação envolvido nesta atividade. Müller e colaboradores (2008) observaram que ao expor células encontradas na leucemia promielocítica aguda (LPA) ao SbIII, ocorre degradação da enzima responsável pela diferenciação das células mielóides progenitoras (PML-RAR-alfa), bem como, reorganização dos corpos nucleares e aumento de apoptose dessas células.

As vitaminas são nutrientes exigidos pelo organismo para vários processos fisiológicos. O AA (vitamina C, Figura 6) é hidrossolúvel e humanos devem proferir a sua ingestão através de dieta necessária ou suplementos exógenos. Possui reconhecida ação antioxidante, agindo como redutor de espécies reativas de oxigênio no organismo (WEBER; BENDICH; SCHALCH, 1996).

Burns, em 1959, propôs que a incapacidade humana de sintetizar o AA está relacionada com a ausência da forma ativa da enzima, L-gulonolactona oxidase, que catalisa a etapa de transformação do ácido glicurônico em AA. No organismo, o AA está relacionado à síntese do colágeno, atuando em vários tecidos, dentre eles, o ósseo, o epitelial e o fibroso. É absorvido no intestino e a sua excreção se dá pela via urinária, quando a concentração plasmática atinge cerca de $1,5 \text{ mg.dl}^{-1}$ (IQBAL; KHAN; KHATTAK, 2004).

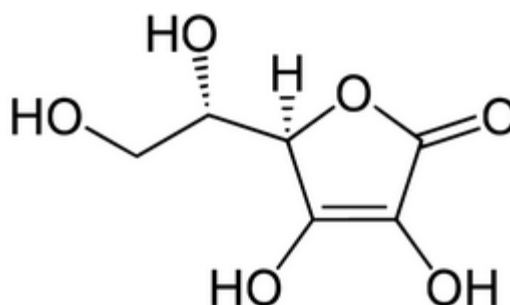


Figura 6. Fórmula estrutural do ácido ascórbico (AA) ou vitamina C ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$). Fonte: Weber; Bendich; Schalch (1996).

Estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de AA está correlacionada com a redução de incidência de doença vascular (WEBER; BENDICH; SCHALCH, 1996, ARAKAWA *et al.*, 2003). Tal atividade pode ser atribuída, além da ação antioxidante nas lipoproteínas de baixa densidade, à regulação no metabolismo de colesterol. Além disso, protege células endoteliais e do músculo liso cardíaco do estresse oxidativo (ARAKAWA *et al.*, 2003).

Segundo Cameron e colaboradores (1979), o AA é essencial para a integridade da matriz celular e resistência à infiltração de células malignas, além de permitir a produção de uma barreira fibrosa ao redor do tumor. Há ainda, fortes indícios de envolvimento do AA na inibição de enzimas neoplásicas e estimulação do sistema imunológico contra essas células malignas. Estudos têm demonstrado que o AA pode ter um papel protetor no tratamento do câncer (CHEN *et al.*, 2005). Aumento da atividade antitumoral do As foi relatado em

pacientes com mieloma múltiplo refratário tratados concomitantemente com AA (BAHLIS *et al.*, 2002; SINGH, 2007).

Chen e colaboradores (2005) investigaram, em experimento *in vitro*, a mortalidade de células neoplásicas e de células normais quando expostas ao As associado ao AA. As células normais não foram afetadas, o que não ocorreu com as células neoplásicas, sendo a morte celular destas correlacionada com a formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) extracelular, sendo esta dependente da concentração de AA. Apesar do As por si só ser capaz de matar células leucêmicas, quando associado ao AA há um aumento significativo dessa atividade (QAZILBASH *et al.*, 2008).

Além da potencialização da atividade do As, possível ação protetora do AA sobre seus efeitos adversos tem sido descrita. As administrações de vitaminas e aminoácidos, concomitantes à administração de As em ratos, resultaram em reversão do estresse oxidativo, melhora do nível de peróxido lipídico e da atividade de enzimas antioxidantes, como a glutatona (NANDI *et al.*, 2005). Rana (2006) e Singh e Rana (2007) observaram o efeito protetor do ácido ascórbico sobre o estresse oxidativo induzido pelo arsênio inorgânico em fígado, miocárdio e rins de ratos.

Ao considerar as semelhanças químicas dos semimetais As e Sb, Reis (2010) avaliou a possibilidade de redução da cardiotoxicidade do SbIII ao associá-lo ao AA. Neste trabalho, o AA demonstrou potencial ação cardioprotetora quando administrado concomitantemente com As e Sb, sendo capaz de reduzir as alterações provocadas em parâmetros histológicos, eletrocardiográficos e sobre a pressão arterial de ratos *Wistar*. Castro (2013) observou que a administração concomitante do AA e SbIII nas formas livre ou lipossomal convencional não interferiu na atividade leishmanicida do SbIII e foi capaz de preservar os tecidos do fígado, coração e rins de lesões. Em continuidade, o presente trabalho avaliou os parâmetros de segurança do SbIII, formas livre e lipossomais associados ou não à administração de AA.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os parâmetros de segurança, mediante o estudo de toxicidade aguda, no modelo murino, do SbIII nas formas livre ou lipossomal, associadas ou não à administração de AA.

3.2 Específicos

- ✓ Determinar a dose limite, com evidência de toxicidade, do SbIII administrado na sua forma livre, por via IP;
- ✓ Obter sinais cardiovasculares de ECG de camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, antes da administração e no 14º dia após a administração de SbIII nas formas livre ou lipossomais, associadas ou não à administração de ácido ascórbico;
- ✓ Avaliar em camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, sinais clínicos, mortalidade alterações de peso corporal e hematológicas indicativas de toxicidade advindos da administração IP de SbIII nas formas livre ou lipossomais, associadas ou não à administração de AA;
- ✓ Avaliar possíveis alterações bioquímicas e histológicas indicativas de toxicidade em fígado, rins e baço de camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, tratados por via IP com SbIII nas formas livre ou lipossomais, associadas ou não à administração de AA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

TA e COL foram adquiridos da Sigma (EUA). DSPC e DSPE-PEG foram adquiridos da Lipoid GmbH (Alemanha). Ampolas de ácido ascórbico (AA) (100 mg.ml⁻¹) (Hipofarma LTDA, Brasil) foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Frederic Frézard da Universidade Federal de Minas Gerais (Brasil). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Metanol e clorofórmio foram adquiridos da Synth (Brasil). Água ultrapura (Simplicity System 185, Millipore, EUA).

4.2 Solução de SbIII

A solução de SbIII, de concentração final 4,0 mg.ml⁻¹, foi preparada pesando-se 0,5483g de TA, diluindo-se o com solução tampão de concentração NaCl 150 mM, fosfatos 10 mM, pH 7,2 (PBS), transferindo-se o conteúdo para um balão volumétrico, em um volume final de 50 ml.

4.3 Lipossomas

A composição e preparação dos lipossomas convencionais e peguilados, bem como a caracterização físico-química destas formulações foram descritas no Capítulo 1.

4.4 Experimentos *in vivo*

4.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* sadios, fêmeas (25 ± 5 g) e machos (30 ± 5 g), com seis semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Criação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP). Os animais foram aclimatados às condições do Laboratório de Farmacologia Experimental (Escola de Farmácia, Cipharma, UFOP), pelo menos três dias antes do início dos experimentos, mantidos em ambiente com controle de ciclo (12 horas claro/escuro) de luz e ventilação, recebendo água potável e ração (Nuvital®) *ad libitum*. A distribuição dos mesmos aconteceu de forma aleatória, com número máximo de cinco animais por caixa. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP, sob os números 2011/53 e 2012/08.

Todas as estratégias relevantes para redução do número de animais foram identificadas e implantadas neste estudo. A sua elaboração foi baseada em documentos da ANVISA, 2010; EMEA, 1987, 2009; FDA, 1996, 2006; ICH, 1994b; OECD, 2001, 2008. Além disso, o presente estudo também teve a intenção evitar duplicidades e utilização desnecessária de animais sem que isso pudesse comprometer a obtenção e a confiabilidade de informações referentes à segurança dos compostos testados.

4.4.2 Determinação da Dose Limite (DL)

O valor de DL foi determinado aplicando-se o TDF, destinado a observação do aparecimento de sinais claros de toxicidade resultante da exposição a uma série de doses fixas (VAN DEN HEUVEL, 1990).

Camundongos *Swiss* foram divididos randomicamente em cinco grupos experimentais. Foi utilizada a menor quantidade de animais possíveis ($n=6$ /dose, 3 machos e 3 fêmeas), os quais foram testados perante 4 doses de SbIII na sua forma livre administradas em dose única via IP: 17 mg.kg^{-1} (grupo I, dose mínima), 18 mg.kg^{-1} (grupo II, dose intermediária), 19 mg.kg^{-1} (grupo III, dose intermediária) e 20 mg.kg^{-1} (grupo IV, dose máxima); e grupo controle PBS (grupo V). As doses de 17, 18, 19 e 20 mg.kg^{-1} de SbIII foram selecionadas com base em dados da literatura (DIETER, M., 1992; DE MELO *et al.*, 2003; MACIEL *et al.*, 2010).

Nos animais do grupo controle foi realizada a administração, via IP, de PBS, a mesma utilizada como veículo e em volume semelhante ao injetado nos animais de pesos equivalentes dos demais grupos, nunca ultrapassando o volume máximo a ser injetado de 0,3 ml (DE PAIVA *et al.*, 2005).

Os animais foram observados individualmente durante 14 dias ou até a morte e os sinais gerais de toxicidade, tais como: ataxia, piloereção, ptose, tremores, convulsão, foram avaliados.

4.4.3 Obtenção de sinais cardiovasculares através de ECG

Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10mg/kg) e cetamina (80mg/kg), administrada por via IP. Após a anestesia ter alcançado profundidade, agulhas hipodérmicas de aço inoxidável foram inseridas no tecido subcutâneo dos animais acomodados em mesa cirúrgica em madeira. Os sensores de ECG foram acoplados a um sistema condicionador que forneceu sinais em tempo real e processados por placa conversora

análogo-digital. Os sinais referentes às diferenças de potencial relativas às derivações DI, DII e DIII do ECG foram obtidos no 1º dia, antes da administração e no 14º dia após a administração de dose única das preparações. Os registros digitais dos experimentos foram convertidos através do *software* Matlab 7.0 (MathWorks, EUA).

4.4.4 Toxicidade Aguda

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dez grupos experimentais (n = 20, dez machos e dez fêmeas por grupo experimental) que receberam, em dose única, via IP: A - Controles: 1) PBS, 2) AA na dose de 300 mg.kg⁻¹, 3) lipossomas convencionais vazios (LCV), 4) lipossomas peguilados vazios (LPV); B - Grupos que receberam tratamento com DL de SbIII via IP: 5) SbIII livre (SbIII), 6) SbIII livre associado à administração de AA (SbIII+AA), 7) SbIII encapsulado em lipossomas convencionais (LCSbIII), 8) SbIII encapsulado em lipossomas peguilados (LPSbIII); 9) LCSbIII associados à administração de AA (LCSbIII+AA) e 10) LPSbIII associados à administração de AA (LPSbIII+AA).

As doses de lipídeos nos tratamentos controles foram equivalentes às administradas para o tratamento do SbIII nas formas lipossomais, em volume semelhante ao injetado nos animais de pesos equivalentes, nunca ultrapassando o volume máximo a ser injetado de 0,3 ml (DE PAIVA *et al.*, 2005). A dose de AA utilizada foi baseada em dados da literatura (HSU *et al.*, 1998; PRASAD *et al.*, 1999; ARZI *et al.*, 2004; LAZZARINI *et al.*, 2005; SOLTANINEJAD *et al.*, 2009; REIS, 2010, GUSMÃO *et al.*, 2012)

Os animais foram observados individualmente durante 14 dias ou até à morte. Especial atenção foi dada as primeiras 24 horas, com observação constante nas primeiras 6 horas. Os sinais gerais de toxicidade, modificações do comportamento, mortalidade e peso corporal foram monitorados. A variação de peso ao longo do período experimental foi calculada em relação ao peso inicial. Dados macroscópicos das vísceras dos animais, tais como: alterações de coloração e consistência, presença de hemorragia e alteração de peso também foram registrados. Após este período, rim, fígado e baço foram retirados de todos os animais para análises histológicas.

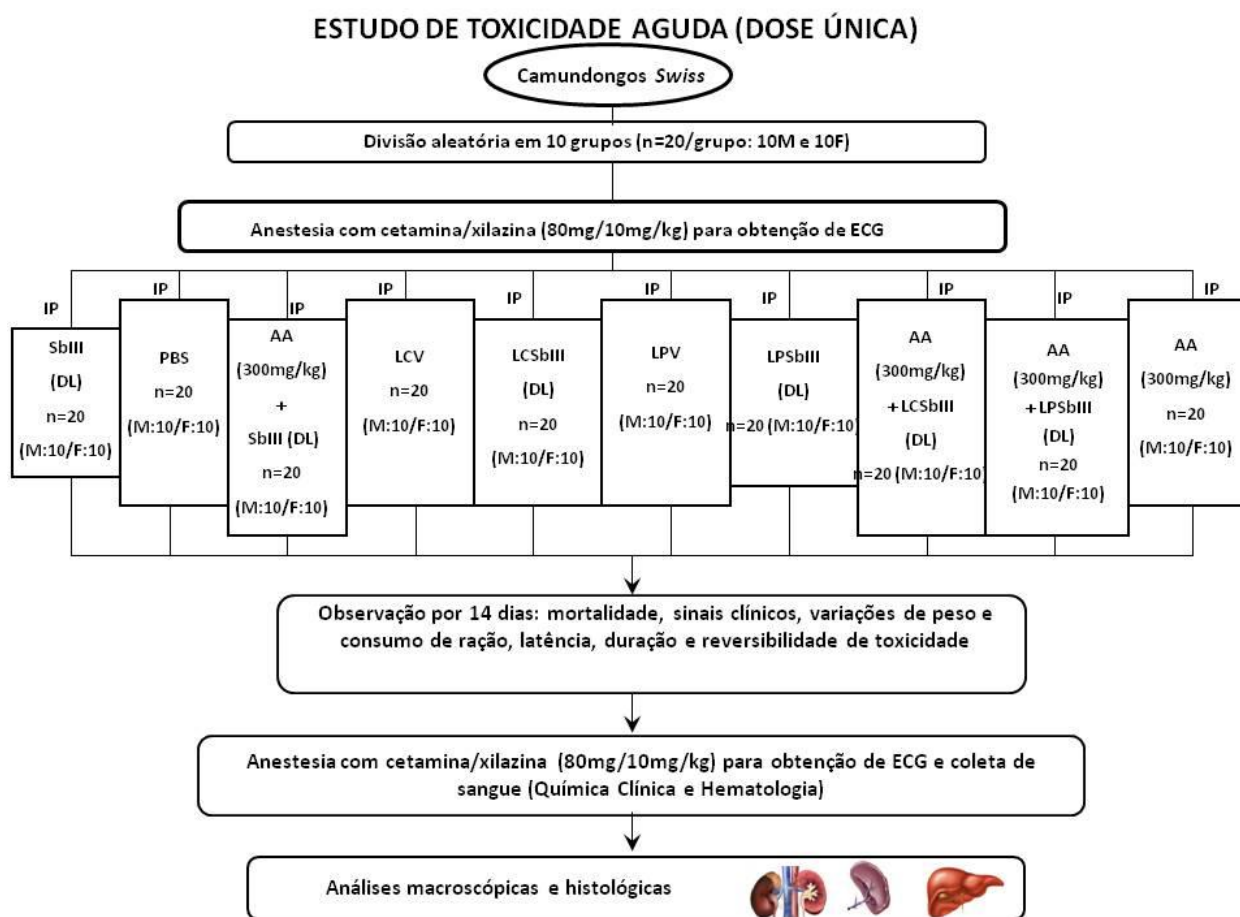


Figura 7. Protocolo experimental do estudo de toxicidade aguda em dose única do SbIII nas formas livre, lipossomal convencional (LC) ou lipossomal peguilada (LP), associadas ou não à administração de ácido ascórbico (AA).

4.4.5 Investigações de química clínica e hematológicas

Os exames bioquímicos e hematológicos foram realizados em todos os animais sobreviventes ao fim dos 14 dias após os tratamentos. Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10 mg.kg^{-1}) e de cetamina (80 mg.kg^{-1}). Amostras de sangue foram coletadas a partir do plexo braquial e transferidas para tubos contendo 0,18% (m/v) de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA (Bioclin ®) para os exames hematológicos e em tubos sem anticoagulante para exames bioquímicos. O soro foi obtido por centrifugação do sangue a 1500 rpm, durante 15 minutos, à temperatura ambiente.

As funções hepáticas e renais foram avaliadas através da quantificação das concentrações de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FAL), proteínas totais, ureia e creatinina sérica. Todos os ensaios

bioquímicas foram realizadas por espectrofotometria utilizando um analisador automático (Airone200[®], Itália), gentilmente cedido pelo Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC), Escola de Farmácia, UFOP e kits de ensaio obtidos da Companhia Bioclin-Quibasa (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

Os parâmetros hematológicos avaliados foram: contagem de hemácias (RBC), hematócrito, hemoglobina, leucócitos, plaquetas e contagem diferencial de leucócitos. Todas as análises foram realizadas utilizando-se um analisador automático (VET2800 Mindray[®], Brasil), gentilmente cedido pelo Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC), Escola de Farmácia, UFOP. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada pela análise de esfregaços de sangue corados com corantes do kit Panótico rápido da Companhia Bioclin-Quibasa (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), em microscópio óptico (Olympus CX 21[®], Brasil). Para a contagem diferencial de leucócitos, 100 células foram examinadas microscopicamente e contadas.

4.4.6 Avaliação histológica

Para todas as análises histológicas, amostras de baço, fígado e rins de 50% dos animais, coletadas aleatoriamente 14 dias após a administração das preparações, foram lavadas com solução salina (NaCl) 0,9% (m/v) e fixadas em formalina a 10% (v/v) (pH 7,2), processados através da desidratação em série de álcool etílico de concentrações crescentes – 70%, 80%, 90% e 100%, diafanizados em xilol e incluídos em bloco de parafina. Além disso, análises macroscópicas das vísceras de todos os animais, sobreviventes ou não, também foram realizadas.

4.4.6.1 Cortes histológicos e microscopia óptica

Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia para obtenção dos cortes histológicos com espessura de 4 micrômetros (μm). Após desparafinização em xilol e hidratação em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90%, 80% e 70%), os cortes foram lavados com água corrente e, após secagem, foram corados por coloração de rotina por hematoxilina e eosina (HE). As lâminas obtidas foram utilizadas para análises qualitativas e as avaliações foram feitas utilizando-se objetivas de 5x, 10x, 20x e 40x de um microscópio Olympus BX50, localizado no laboratório de Anatomia Patológica, UFOP, com

acompanhamento do Professor Wanderson Geraldo de Lima, do Laboratório de Biologia Experimental, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, UFOP.

4.4.6.2 Análise histológica qualitativa

Para análise qualitativa, foram utilizados os cortes histológicos de fígado, baço e rim, em lâminas coradas por hematoxilina e eosina (HE). A ausência ou presença das seguintes alterações histopatológicas foram avaliadas: necrose, inflamação, edema, hiperemia, hemorragia, dilatação de vasos sanguíneos, processos degenerativos, área de fibrose degeneração celular, reatividade da polpa branca no baço e esclerose glomerular.

As imagens utilizadas para composição do presente trabalho foram obtidas utilizando-se o microscópio Leica DM500&0B, digitalizadas através de microcâmera Leica DFC340 FX e do programa Leica Application Suíte (Versão 2.4.0 R1). Todos os equipamentos e programas utilizados nesta etapa pertencem ao Laboratório de Multiusuário do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da UFOP (FINEP - CT - INFRA2004).

4.5 Análise Estatística

O *software* utilizado como ferramenta para a análise estatística foi o *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software*, EUA). Os dados hematológicos e bioquímicos foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para verificar a homogeneidade e normalidade da análise de variância foram utilizados os testes Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino & Pearson.

Variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas pelas equações: $y = \log(\text{variável}+1)$, $y = \log(\text{variável}+10)$, $y = \text{raiz}(\text{variável})$ ou $y = \text{raiz}(\text{variável}+10)$. A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey. Para analisar a variação de peso corporal, foi realizada análise de covariância e os valores antes do tratamento foram considerados como covariável. Para dados que mesmo após transformações matemáticas, não seguiram a distribuição normal foram utilizados os testes Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's.

Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dose Limite de toxicidade (DL)

A Tabela 1 apresenta os dados de letalidade obtidos no experimento para determinação da DL. O maior percentual de mortes ocorreu entre as fêmeas no grupo IV (66,67%) (Tabela 12). Para o grupo III, a mortalidade foi a mesma, independentemente do sexo (33,33%) e os grupos I e II tiveram a mesma mortalidade (16,67%).

Tabela 12. Letalidade em camundongos *Swiss* (n=6, 3 machos e 3 fêmeas), sob tratamento agudo, dose única (IP) de SbIII na forma livre.

| Grupo-Dose (mg.kg ⁻¹) | Fêmeas | | Machos | |
|--------------------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| | Morte/Teste ^a | Dia de morte | Morte/Teste ^a | Dia de morte |
| SbIII | | | | |
| I - 17 | 0/3 | - | 1/3 | 4 |
| II - 18 | 1/3 | 3 | 0/3 | - |
| III - 19 | 1/3 | 2 | 1/3 | 3 |
| IV - 20 | 2/3 | 2, 3 | 1/3 | 2 |
| PBS* | | | | |
| V | 0/3 | - | 0/3 | - |

Notas: ^anúmero de camundongos mortos/número de camundongos testados. *PBS (NaCl 150 mM, fosfatos 10 mM, pH 7,2).

Sinais clínicos como piloereção, ptose, tremores e convulsões foram observados a partir de 1 hora após a administração e tiveram duração de até 96 horas, exceto no grupo I (Quadro 2). Paralisia dos membros foi o sinal mais frequente observado em momento anterior à maioria dos óbitos. Nenhum sinal clínico de toxicidade foi observado nos grupos controles (machos e fêmeas).

O teste de toxicidade aguda em dose única serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas sobre a toxicidade aguda em doses repetidas, a toxicidade subcrônica e toxicidade crônica, bem como, fornecer informações iniciais sobre o mecanismo de toxicidade da substância teste (BRITO, 1994). Por alguns anos, a DL₅₀ foi utilizada amplamente, porém, seu valor numérico não é equivalente à toxicidade de determinada substância, já que a letalidade é apenas um dos parâmetros de referência de toxicidade (KLAASSEN, 2006).

Quadro 2. Sinais clínicos observados com maior incidência em camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, após administração de dose única (IP) de SbIII.

| Grupo – Dose (mg.kg⁻¹) | Sinais clínicos | Duração |
|--|--|----------------|
| SbIII | | |
| I – 17 | Ataxia | 1 a 4 h |
| II – 18 | Piloereção, ptose, tremores | 1 a 96 h |
| III – 19 | Piloereção, ptose, tremores e convulsões | 1 a 96 h |
| IV - 20 | Piloereção, ptose, tremores e convulsões | 1 a 96 h |
| PBS | | |
| V | Ausentes | - |

Dieter (1992) observou no estudo, onde houve a administração de 12 doses de 22 mg.kg⁻¹ de TA (8,73 mg.kg⁻¹ de SbIII) em ratos F344/N, durante 16 dias, que na via IP foram observados mais efeitos tóxicos comparados com a administração oral, utilizando-se doses equivalentes, resultando na morte de um macho e duas fêmeas, no segundo dia após tratamento.

Os resultados de letalidade obtidos estão de acordo com os observados por Dieter (1992), onde em 16 dias da administração IP de TA, em camundongos B6C3F1, verificou-se óbito de 5 fêmeas e nenhum macho nos animais que receberam a dose de 50 mg.kg⁻¹ (20,0 mg.kg⁻¹ de SbIII), até o 4º dia de tratamento. Já nos animais que receberam a dose de 25 mg.kg⁻¹ (10,0 mg.kg⁻¹ SbIII), observou-se o óbito de apenas 1 macho e sobrevivência de todas as fêmeas. E na dose de 100 mg.kg⁻¹ de TA (40 mg.kg⁻¹ de SbIII) observou-se morte de todos os animais, ambos os sexos, até o 2º dia de tratamento. Apesar de terem sido utilizados espécies de animais diferentes e diante dos resultados obtidos, pode-se prever a alta variabilidade na sensibilidade, tanto para machos quanto para fêmeas, na toxicidade do SbIII livre.

Alterações significativas de perda de peso foram observadas no grupo IV, para machos e fêmeas. Para os grupos I e II, foi observada redução de peso ao final do experimento, especialmente para as fêmeas. Porém, em nenhuma das doses de SbIII administradas foram observadas variações de peso corporal superiores a 8% em relação ao peso corporal inicial.

As perdas de peso, superiores a 3%, foram observadas principalmente nos primeiros 5 dias após os tratamentos. Ao contrário do observado neste estudo, Dieter (1992) não observou variações de peso corporal após 16 dias de administração IP de TA, em camundongos B6C3F

em todas as doses utilizadas: 6, 13, 25, 50 e 100 mg.kg⁻¹, equivalentes a aproximadamente 2, 5, 10, 20 e 40 mg.kg⁻¹ de SbIII, respectivamente. A administração de doses superiores a 17 mg.kg⁻¹ de SbIII, principalmente nas fêmeas, também foram capazes de reduzir o consumo de ração e aumentar a produção de excretas nos animais (dados não apresentados).

Com o objetivo de auxiliar na seleção da DL, determinação da causa de mortes e na busca de sinais evidentes de toxicidade, realizou-se a necropsia de todos os animais, sobreviventes ou não ao teste TDF, para retirada de fígado, baço e rins para análises histológicas. Em todos os animais que evoluíram à morte, foi observada presença de hemorragia em líquido ascítico e hepatomegalia.

Para os animais do grupo II, sacrificados no 14º dia, a análise microscópica do fígado mostrou aspectos degenerativos, inflamação parenquimatosa difusa, vasculite e áreas de necrose. Segundo Dieter (1992), a aparência morfológica e a distribuição variável de lesões ocasionadas no fígado pelo SbIII quando administrado via IP, podem estar relacionadas com a posição dos lóbulos hepáticos na cavidade abdominal. Possivelmente, as porções de lobos hepáticos adjacentes à parede abdominal podem ter tido uma maior exposição às soluções injetadas de SbIII.

O baço e os rins apresentaram mudanças na reatividade da polpa branca e esclerose glomerular, respectivamente. Em ambos os órgãos, foi observada presença de hiperemia (Figura 8). As alterações histológicas observadas no grupo II, também foram observadas nos grupos III e IV, geralmente de caráter mais difuso e intenso.

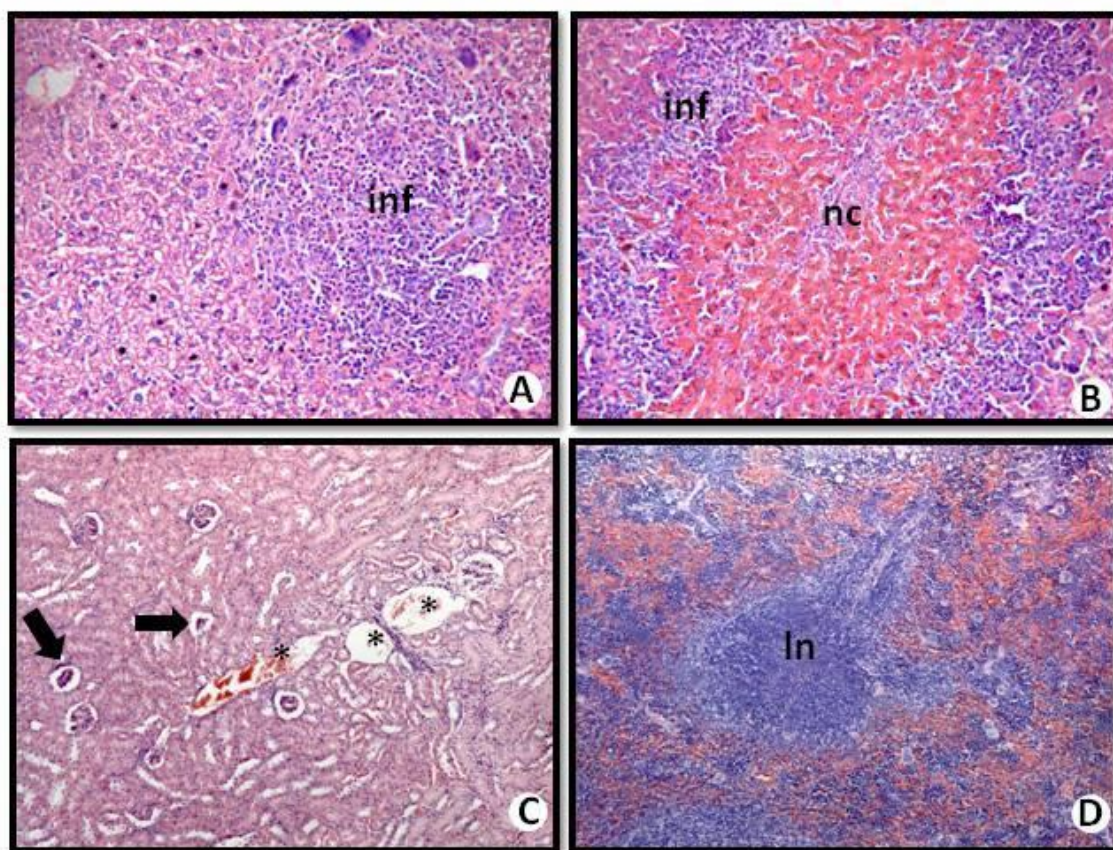


Figura 8. Fotomicrografia de fígado (A e B), rins (C) e baço (D) de camundongos *Swiss* depois de 14 dias de tratamento (IP) de SbIII na sua forma livre na dose de 18 mg.kg^{-1} . Presença de vasos sanguíneos dilatados e hiperêmicos (asterisco), reação inflamatória difusa (inf), área de necrose (nc), esclerose glomerular (setas) e hiperplasia de folículo linfoide (In). Hematoxilina-eosina (HE), aumento original $\times 200$ (A e B), $\times 50$ (C) e $\times 100$ (D).

No estudo preliminar para determinação da DL, a administração de dose única de 18 mg.kg^{-1} de SbIII livre induziu claros sinais clínicos de toxicidade, mortalidade e alterações histopatológicas. Estes resultados levaram à determinação desta dose como DL ser utilizada em estudo não clínico de toxicidade aguda (dose única). A maioria dos resultados obtidos foram semelhantes aos observados por Dieter (1992), após 16 dias da administração IP de TA, na dose de 50 mg.kg^{-1} (20 mg.kg^{-1} de SbIII), em camundongos B6C3F.

5.2 Obtenção de sinais cardiovasculares através de ECG

Os sinais referentes às diferenças de potencial relativas às derivações DI, DII e DIII do ECG foram obtidos no 1º dia, antes da administração e no 14º dia após a administração de

dose única das preparações. A obtenção destes registros teve por objetivo a coleta de dados que possam subsidiar trabalhos futuros de padronização do uso de ECG de camundongos em nosso laboratório e a possível sugestão à ANVISA de aplicação do mesmo em estudos não clínicos de segurança.

Com este objetivo, os parâmetros cardiovasculares de ECG aqui obtidos serão analisados em trabalhos posteriores, onde estes dados serão analisados por inspeção visual com o auxílio do software WinDaq (DATAQ Instruments, EUA). Serão selecionados segmentos em instantes específicos, dos quais serão extraídos os seguintes parâmetros cardiovasculares: intervalos QT, RR, PR e complexo QRS do ECG e correção do intervalo QT pelo índice de Fridericia: $QTc = QT/(RR)^{1/3}$ (VALE-CARDOSO; GUIMARÃES, 2010).

5.3 Toxicidade aguda

Vários estudos têm demonstrado que lipossomas são sistemas nanocarreadores que permitem a entrega do fármaco em alvos específicos, tais como células e tecidos e podem aumentar a potência ou reduzir a toxicidade da substância encapsulada (LASIC, 1998; BOULIKAS, 2004; LEITE *et al.*, 2009; LEITE *et al.*, 2011). A busca por terapias alternativas para a LV resultou no desenvolvimento de formulações lipossomais de Sb, com o aumento da eficácia e do índice terapêutico (CÁRTER *et al.*, 1988, SCHETTINI *et al.*, 2003; 2005; 2006; PAL *et al.*, 2004; TEMPONE *et al.*, 2004; FRÉZARD, 2005).

As duas formulações de SbIII estudadas no presente trabalho foram avaliadas, anteriormente, quanto a eficácia e toxicidade. De Melo e colaboradores (2003) avaliaram a eficácia do SbIII veiculado nestas formulações, na dose de 11 mg.kg^{-1} , em camundongos *Swiss* infectados com *Schistosoma mansoni* e identificaram melhor efetividade da formulação peguilada. Em um segundo experimento, esta formulação foi avaliada na dose de 27 mg.kg^{-1} de SbIII, pelas vias SC e IP, sendo capaz de reduzir os níveis de carga parasitária em 67 e 82%, respectivamente. Além disso, a formulação foi capaz de proteger da morte todos os animais do grupo.

Adicionalmente, Maciel e colaboradores (2010) observaram que a administração IV de SbIII livre na dose de 17 mg.kg^{-1} provocou um aumento significativo no intervalo QT do ECG e uma redução significativa da pressão arterial em ratos *Wistar*. Estas alterações não foram observadas quando se administrou lipossomas peguilados de SbIII, demonstrando assim, o seu importante papel na redução da cardiotoxicidade deste semimetal. Castro (2013) avaliou a eficácia do SbIII veiculado em lipossomas convencionais de SbIII, na dose de 9

mg.kg⁻¹, em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* e identificou redução significativa na carga parasitária no fígado, baço e medula óssea, cerca de 47%, 33% e 47%, respectivamente.

Em paralelo, o presente trabalho investigou os parâmetros de segurança mortalidade, variação do peso corporal, sinais clínicos, perfis hematológicos e bioquímicos e alterações histológicas, após tratamentos com soluções SbIII na formas livre ou veiculado em lipossomas, convencional ou peguilado, com ou sem a associação da administração de AA. Para tal, foi utilizada a via IP para a administração das preparações.

Para a realização de estudo não clínico de toxicidade aguda, devem ser utilizadas duas vias de administração: a IV e a pretendida para uso em humanos (BRASIL, 2010). Geralmente, a via de administração de antimoniais em humanos é a intramuscular, no entanto, a via IP foi utilizada no presente trabalho por proporcionar elevada biodisponibilidade e por ter sido utilizada anteriormente em estudos de eficácia e toxicidade (DIETER, 1992; DE MELO *et al.*, 2003; MACIEL *et al.*, 2010).

5.3.1 Avaliação de mortalidade, peso corporal e sinais clínicos.

Nenhuma morte foi observada em camundongos machos e fêmeas que receberam os tratamentos controles PBS e AA. A administração de SbIII na forma livre induziu 50% de mortes em camundongos fêmeas e 30% de mortes em camundongos machos. A associação da administração de AA não conseguiu proteger os animais, pois ocorreram 40% de mortes no grupo das fêmeas e 50% de mortes no grupo dos machos (Tabela 13).

O exame macroscópico das vísceras dos animais do grupo SbIII livre que evoluíram a óbito, apontou mudanças nas consistências e colorações do fígado e baço, edema intestinal e hemorragia no líquido ascítico. Essas mudanças observadas no tratamento com SbIII livre também foram observadas com SbIII+AA, porém geralmente de maior intensidade.

Em contrapartida, não se observou mortalidade após os tratamentos com SbIII nas formas lipossomais, convencional ou peguilada, associadas ou não à administração de AA, caracterizando, assim, redução da toxicidade do SbIII ao ser veiculado nos nanocarreadores. Resultados semelhantes foram obtidos por De Melo e colaboradores (2003), onde todos os camundongos *Swiss* sobreviveram, após o tratamento com doses elevadas de SbIII (27 mg.kg⁻¹) encapsulado em lipossomas peguilados, demonstrando redução da toxicidade do SbIII livre que, ao contrário, levou todos os animais ao óbito (100% de mortalidade).

Tabela 13. Mortalidade de camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, tratados com SbIII nas formas livre ou lipossomais (18 mg.kg⁻¹), associadas ou não à administração de AA (300 mg.kg⁻¹).

| Tratamento | Camundongo Fêmea | | Camundongo Macho | |
|----------------------|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| | Morte/Teste ^a | Dia da morte | Morte/Teste ^a | Dia da morte |
| Controles | | | | |
| PBS ^b | 0/10 | - | 0/10 | - |
| AA ^c | 0/10 | - | 0/10 | - |
| LCV ^d | 0/10 | - | 0/10 | - |
| LPV ^e | 0/10 | - | 0/10 | - |
| SbIII livre | | | | |
| SbIII ^f | 5/10 | 1, 1, 2, 2, 3 | 3/10 | 1, 1, 2 |
| SbIII+AA | 4/10 | 1, 1, 2, 2 | 5/10 | 1, 1, 1, 2, 3 |
| Lipossomas | | | | |
| LCSbIII ^d | 0/10 | - | 0/10 | - |
| LPSbIII ^e | 0/10 | - | 0/10 | - |
| LCSbIII+AA | 0/10 | - | 0/10 | - |
| LPSbIII+AA | 0/10 | - | 0/10 | - |

Notas: ^anúmero de camundongos mortos/número de camundongos testados. ^bPBS(150 mM NaCl, 10 mM fosfatos, pH 7.2). ^cAA significa ácido ascórbico. ^dLCV e LCSbIII significam lipossomas convencionais vazios e contendo antimônio trivalente, respectivamente. ^eLPV e LPSbIII significam lipossomas peguilados vazios e contendo antimônio trivalente, respectivamente. ^fSbIII significa antimônio trivalente livre.

Sabe-se que a diminuição da massa corpórea dos animais é um parâmetro simples e sensível de toxicidade após a exposição a agentes toxicantes (THANABHORN *et al.*, 2006). Camundongos fêmeas, tratadas com SbIII livre e com SbIII + AA, apresentaram uma perda significativa de peso corporal, nos primeiros 7 dias após os tratamentos, quando comparadas com o seus respectivos grupos controles (Figura 9, A). Porém, ao final dos 14 dias após o tratamento, observou-se um ganho de peso corpóreo, demonstrando, assim, uma recuperação desses animais.

Quanto ao grupo tratado com LPSbIII, em 7 e 14 dias após o tratamento, observou-se uma redução significativa de peso corporal nos camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, em comparação com LPV. No entanto, nos animais tratados com LPSbIII+AA, não foi observada perda de peso significativa, sugerindo um possível efeito protetor do AA neste parâmetro clínico. Camundongos, fêmeas e machos, submetidos aos tratamentos com PBS, AA, LCV, LCSbIII e LCSbIII+AA apresentaram ganho de peso corporal ao longo de todo o período experimental.

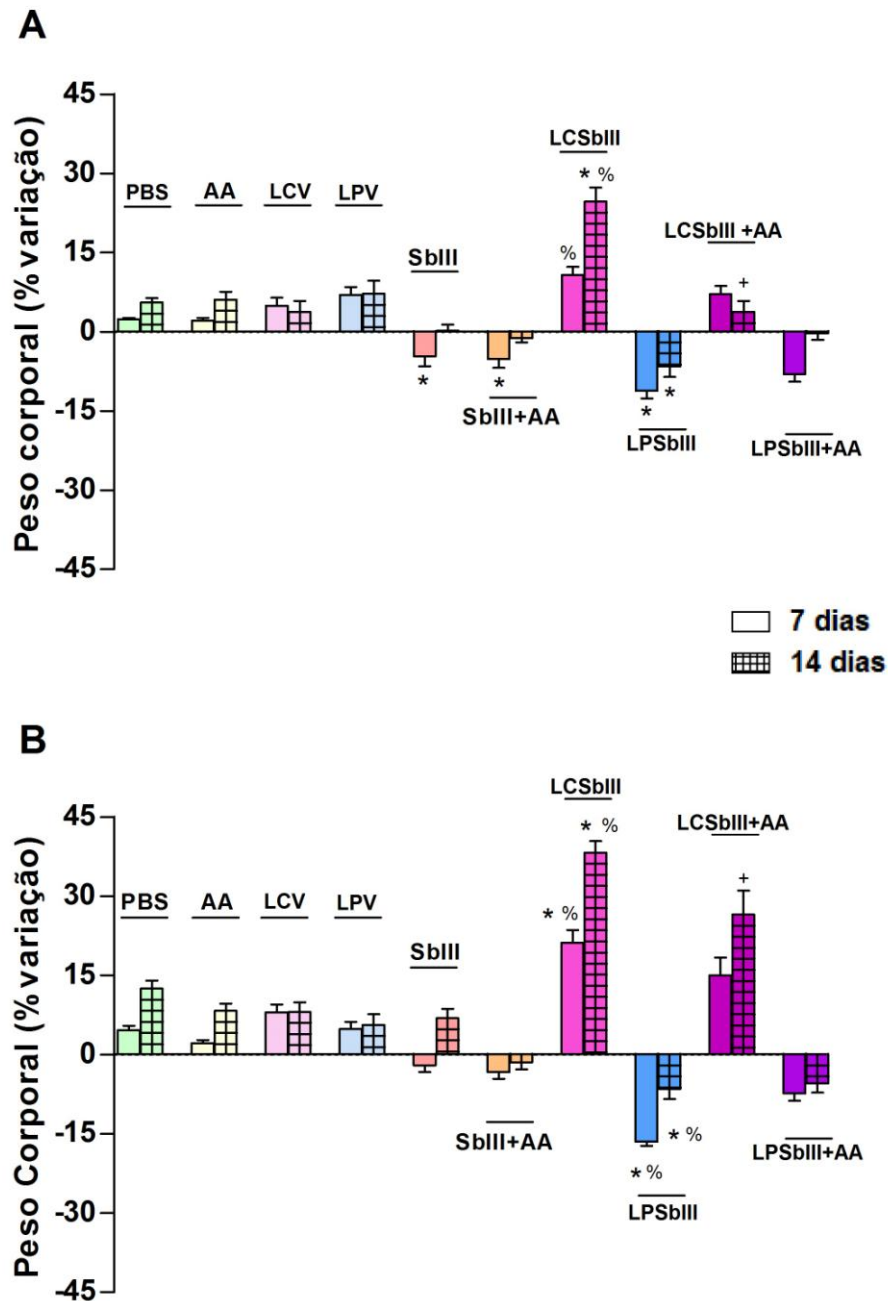


Figura 9. Variações do peso corporal observadas em camundongos *Swiss*, fêmeas (A) e machos (B), após a administração (IP) de SbIII nas formas livre ou lipossomais (18 mg.kg^{-1}), associadas ou não à administração de AA (300 mg.kg^{-1}). **Notas:** PBS (NaCl 150 mM, fosfatos 10 mM, pH 7,2). SbIII significa antimônio trivalente livre. AA significa ácido ascórbico. LCV e LCSbIII significam lipossomas convencionais vazio e com SbIII, respectivamente. LPV e LPSbIII significam lipossomas peguados vazio e com SbIII, respectivamente. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$. *Representa a diferença significativa entre SbIII, SbIII+AA, LCSbIII, LPSbIII e seus respectivos grupos controles. %Representa a diferença significativa entre SbIII e os grupos lipossomais. +Representa diferença significativa entre grupos lipossomais e seus respectivos grupos associados com AA.

Sinais clínicos como ataxia, fraqueza, piloereção, tremores e convulsões foram observados a partir de 3 horas após a administração de SbIII livre e tiveram duração de até 96 horas. Para o grupo tratado com SbIII+AA, em adição a estes efeitos, foram observados diarreia e episódios de convulsões mais frequentes, especialmente nos camundongos machos. Paralisia dos membros foi o sinal mais comum observado antes da morte dos animais, assim como ocorreu nos experimentos para determinação da DL. Além disso, uma reação cutânea seguida da presença de necrose no local da injeção foi observada em dois camundongos machos que receberam a administração IP de SbIII livre.

No grupo tratado com LCSbIII, foi observada fraqueza em apenas três camundongos machos e em um camundongo fêmea. Já no grupo tratado com LPSbIII, foram observados raros episódios de tremores e fraqueza em apenas dois camundongos machos e em um camundongo fêmea. Os efeitos clínicos observados nos grupos que receberam os tratamentos lipossomais tiveram duração de até 48 horas e demonstraram maior sensibilidade dos camundongos machos.

Nenhum sinal clínico aparente de toxicidade foi observado nos grupos controles LCV e PBS. Nos grupos controles LPV e AA, observou-se presença de diarreia em um e em dois camundongos machos, respectivamente. Evidências significativas de toxicidade não foram relatadas com a utilização de AA em estudos na terapia do câncer, exceto alterações gástricas, apenas quando utilizado em altas doses (PRASAD *et al.*, 1999).

Alguns efeitos adversos do tratamento da LV são frequentemente associados como sintomas da própria doença (BRYCESON *et al.*, 1985). No entanto, perda de peso corporal, tonturas, vômitos, dor abdominal, sensação de plenitude gástrica são alguns dos sintomas comumente associados ao tratamento com antimoniais (ARANA, RIZZO, DIAS, 2001; GONTIJO, CARVALHO, 2003; LIMA, 2007). Em síntese, nossos resultados mostraram que as administrações de SbIII livre ou SbIII+AA foram capazes de induzir perda de peso corporal nos animais, porém essa perda não foi superior a 15%. Além disso, ambos os tratamentos induziram mortalidade e sinais clínicos significativos de toxicidade nos animais. Contrariamente a estes resultados, Dieter (1992) não verificou alterações no peso corporal após 16 dias da administração IP de diferentes doses de TA, equivalente as doses 2, 5, 10 e 20 mg.kg⁻¹ de SbIII. Nos animais que receberam formulações lipossomais de SbIII não foram observadas mortes. A formulação lipossomal peguilada não ocasionou perda de peso nos animais, a qual foi revertida com a associação da administração de AA.

5.3.2 Investigações hematológicas

Inicialmente, foi investigado o efeito da influência entre sexo e tratamento nos diferentes parâmetros estudados. Os resultados estatísticos demonstraram a ausência desse efeito nas contagens de hemácias, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, monócitos e neutrófilos (Tabelas 14 e 15, B). Por outro lado, as contagens de leucócitos e de linfócitos foram diretamente influenciadas por esta interação (Tabela 15, A).

Reações hematológicas como anemia, leucopenia, eosinofilia e trombocitopenia foram relacionados em pacientes tratados com antimoniais (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2000, BLUM *et al.*, 2004). No presente estudo, não foram observadas alterações importantes nas análises de hemácias, hematócrito, monócitos e neutrófilos. Os parâmetros hematológicos obtidos foram estatisticamente semelhantes nos grupos controles PBS e AA. Também os grupos tratados com SbIII e SbIII+AA não apresentaram alterações significativas quando comparados com os seus respectivos controles.

Camundongos tratados com LCSbIII e LPSbIII apresentaram redução nos níveis hemoglobina, quando comparados com seus respectivos grupos controles. No entanto, os valores obtidos foram semelhantes aos dos grupos controles PBS e AA. Observou-se também uma redução significativa na contagem de plaquetas de animais tratados com LPSbIII, em comparação com o grupo tratado com SbIII livre. Porém, os valores obtidos foram semelhantes aos obtidos para o seu respectivo grupo controle.

Tabela 14. Parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, avaliados 14 dias após tratamento por via IP, dose única de 18 mg.kg⁻¹, de SbIII nas formas livre ou lipossomais, com ou sem a administração de AA (300 mg.kg⁻¹).

| Parâmetros ^a | | PBS ^b | AA ^c | LCV ^d | LPV ^e | SbIII ^f | SbIII+AA | LCSbIII ^d | LPSbIII ^e | LCSb+AA | LPSbIII+AA |
|--|-------|------------------|-----------------|------------------|------------------|--------------------|--------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------|
| Hemácias (10 ⁶ /mm ³) | F | 8,4 ± 0,3 | 7,7 ± 0,4 | 8,8 ± 0,6 | 9,7 ± 0,3 | 8,6 ± 0,2 | 8,6 ± 0,3 | 7,9 ± 0,3 | 9,0 ± 0,7 | 7,4 ± 0,3 | 6,5 ± 0,6 |
| | M | 8,0 ± 0,3 | 7,9 ± 0,3 | 9,1 ± 0,3 | 9,9 ± 0,2 | 7,6 ± 0,5 | 7,8 ± 1,0 | 8,2 ± 0,2 | 8,4 ± 0,3 | 7,7 ± 0,6 | 8,2 ± 0,3 |
| | Média | 8,2 ± 0,2 | 7,8 ± 0,2 | 9,0 ± 0,3 | 9,8 ± 0,2 | 8,0 ± 0,3 | 8,2 ± 0,4 | 8,1 ± 0,2 | 8,7 ± 0,4 | 7,6 ± 0,3 | 7,4 ± 0,3 |
| Hemoglobina (g/dL) | F | 14,9 ± 0,7 | 13,2 ± 0,8 | 16,8 ± 1,4 | 18,4 ± 0,8 | 15,3 ± 0,4 | 14,8 ± 0,7 | 13,6 ± 0,7 | 15,7 ± 1,3 | 12,9 ± 0,6 | 11,9 ± 1,1 |
| | M | 14,1 ± 0,6 | 13,7 ± 0,7 | 17,6 ± 0,7 | 18,8 ± 0,4 | 13,5 ± 1,0 | 13,8 ± 1,8 | 14,3 ± 0,3 | 14,7 ± 0,8 | 13,5 ± 1,2 | 14,0 ± 0,7 |
| | Média | 14,5 ± 0,4 | 13,5 ± 0,5 | 17,2 ± 0,8 | 18,6 ± 0,4 | 14,2 ± 0,7 | 14,3 ± 0,8 | 13,9 ± 0,3 [*] | 15,2 ± 0,7 [*] | 13,2 ± 0,7 | 13,0 ± 0,6 |
| Hematócrito (%) | F | 33,2 ± 1,7 | 29,1 ± 1,7 | 38,2 ± 3,4 | 39,2 ± 1,7 | 34,1 ± 0,8 | 33,7 ± 2,5 | 31,6 ± 1,6 | 36,0 ± 3,0 | 29,6 ± 1,4 | 26,2 ± 2,5 |
| | M | 31,9 ± 1,6 | 31,0 ± 1,7 | 37,4 ± 1,6 | 39,7 ± 1,2 | 30,3 ± 2,2 | 30,7 ± 3,6 | 33,2 ± 0,8 | 34,4 ± 1,8 | 30,8 ± 2,8 | 33,0 ± 1,4 |
| | Média | 32,5 ± 1,1 | 30,1 ± 1,2 | 37,8 ± 1,8 | 39,5 ± 1,0 | 31,9 ± 1,4 | 32,6 ± 2,0 | 32,4 ± 0,9 | 35,2 ± 1,7 | 30,2 ± 1,5 | 29,8 ± 1,6 |
| Plaquetas (10 ³ /mm ³) | F | 250,6 ± 17,4 | 239,9 ± 33,2 | 241,2 ± 20,3 | 264,3 ± 16,5 | 362,4 ± 24,8 | 418,8 ± 67,7 | 276,1 ± 15,5 | 188,9 ± 9,6 | 185,4 ± 15,4 | 167,4 ± 14,7 |
| | M | 344,7 ± 24,8 | 239,7 ± 20,3 | 300,8 ± 9,8 | 248,2 ± 14,6 | 346,0 ± 30,9 | 265,2 ± 9,3 | 384,1 ± 23,4 | 247,5 ± 17,1 | 208,9 ± 24,7 | 209,0 ± 14,8 |
| | Média | 297,6 ± 18,2 | 239,8 ± 18,9 | 269,4 ± 13,1 | 255,8 ± 10,8 | 352,8 ± 20,1 | 348,9 ± 43,0 | 330,1 ± 18,4 | 218,2 ± 11,7 ^{&} | 197,1 ± 14,4 [@] | 189,3 ± 11,3 |

Notas: ^aEsses parâmetros não foram influenciados pela interação entre sexo e tratamento. ^bPBS (150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7.2). ^cAA significa ácido ascórbico. ^dLCV e LCSbIII significam lipossomas convencionais vazios ou com SbIII, respectivamente. ^eLPV e LPSbIII significam lipossomas peguados vazios ou com SbIII, respectivamente. ^fSbIII significa antimônio trivalente livre. ^{*}Representa diferença significativa entre LCSbIII, LPSbIII e seus respectivos grupos controles. [&]Representa diferença significativa entre SbIII e grupos lipossomais. [@]Representa diferença significativa entre grupos lipossomais e seus respectivos grupos associados com AA. M e F significam camundongos machos e fêmeas, respectivamente. Dados foram expressos como média ± erro padrão da média. O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Tabela 15. Leucograma de camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, avaliados 14 dias após tratamento por via IP, dose única de 18 mg.kg⁻¹, de SbIII nas formas livre ou lipossomais, com ou sem a administração de AA (300 mg.kg⁻¹).

| Parâmetros | | PBS ^c | AA ^d | LCV ^e | LPV ^f | SbIII ^g | SbIII+AA | LCSbIII ^e | LPSbIII ^f | LCSbIII+AA | LPSbIII+AA |
|-------------------------------------|-------|------------------|-----------------|------------------|------------------|--------------------|-------------|----------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| A | | | | | | | | | | | |
| Leucócitos | F | 6,4 ± 0,8 | 6,9 ± 0,5 | 3,9 ± 0,3 | 4,5 ± 0,5 | 3,5 ± 0,4 | 5,3 ± 0,8 | 6,2 ± 0,9 | 6,3 ± 0,7 | 2,7 ± 0,2 [@] | 3,0 ± 0,3 |
| (10 ³ /mm ³) | M | 4,9 ± 0,5 | 5,0 ± 0,3 | 4,9 ± 0,8 | 3,8 ± 0,5 | 6,1 ± 1,0 | 5,3 ± 0,8 | 4,6 ± 0,5 | 5,8 ± 0,7 | 3,8 ± 0,8 | 6,1 ± 0,6 |
| Linfócitos | F | 5,2 ± 0,6 | 5,4 ± 0,4 | 2,7 ± 0,3 | 3,1 ± 0,4 | 2,7 ± 0,3 | 3,8 ± 0,5 | 5,0 ± 0,7 | 5,0 ± 0,7 | 2,2 ± 0,2 [@] | 2,4 ± 0,2 |
| | M | 3,9 ± 0,4 | 4,0 ± 0,3 | 3,9 ± 0,7 | 3,0 ± 0,3 | 4,9 ± 0,9 | 3,5 ± 0,7 | 3,6 ± 0,4 | 4,2 ± 0,6 | 3,1 ± 0,7 | 5,1 ± 0,6 |
| B | | | | | | | | | | | |
| Neutrófilos | F | 0,97 ± 0,19 | 1,23 ± 0,12 | 1,06 ± 0,43 | 1,16 ± 0,56 | 0,64 ± 0,13 | 1,26 ± 0,32 | 1,00 ± 0,17 | 0,95 ± 0,11 | 0,40 ± 0,08 | 0,49 ± 0,12 |
| | M | 0,67 ± 0,09 | 0,83 ± 0,03 | 0,81 ± 0,09 | 0,65 ± 0,13 | 0,81 ± 0,14 | 1,54 ± 0,23 | 0,78 ± 0,09 | 1,38 ± 0,44 | 0,53 ± 0,14 | 0,82 ± 0,06 |
| | Média | 0,82 ± 0,11 | 1,03 ± 0,07 | 0,94 ± 0,22 | 0,89 ± 0,27 | 0,74 ± 0,10 | 1,39 ± 0,20 | 0,89 ± 0,09 | 1,17 ± 0,22 | 0,46 ± 0,08 | 0,66 ± 0,07 |
| Monócitos | F | 0,19 ± 0,03 | 0,21 ± 0,03 | 0,11 ± 0,01 | 0,17 ± 0,04 | 0,15 ± 0,01 | 0,18 ± 0,02 | 0,18 ± 0,02 | 0,29 ± 0,03 | 0,07 ± 0,01 | 0,09 ± 0,00 |
| | M | 0,26 ± 0,05 | 0,20 ± 0,03 | 0,19 ± 0,02 | 0,10 ± 0,02 | 0,35 ± 0,05 | 0,23 ± 0,02 | 0,15 ± 0,01 | 0,16 ± 0,02 | 0,12 ± 0,02 | 0,19 ± 0,03 |
| | Média | 0,23 ± 0,03 | 0,20 ± 0,02 | 0,15 ± 0,01 | 0,13 ± 0,02 | 0,27 ± 0,04 | 0,20 ± 0,01 | 0,16 ± 0,01 | 0,22 ± 0,02 | 0,10 ± 0,01 | 0,14 ± 0,02 |

Notas: ^AEsses parâmetros foram influenciados pela interação sexo e tratamento. ^BEsses parâmetros não foram influenciados pela interação entre sexo e tratamento. ^cPBS (150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7.2). ^dAA significa ácido ascórbico. ^eLCV e LCSbIII significam lipossomas convencionais vazios e com SbIII, respectivamente. ^fLPV e LPSbIII significam lipossomas pegulados vazios e com SbIII, respectivamente. ^gSbIII significa antimônio trivalente livre. [@]Representa diferença significativa entre grupos lipossomais e seus respectivos grupos associados com AA. M e F significam camundongos machos e fêmeas, respectivamente. Dados foram expressos como média ± erro padrão da média. O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (ANOVA ou Kruskal–Wallis).

Camundongos fêmeas tratadas com LCSbIII+AA apresentaram uma redução significativa na contagem de plaquetas, leucócitos e linfócitos, em comparação com o grupo que recebeu apenas LCSbIII. Estes resultados, associados à perda de peso corporal (figura 10, A), podem estar associados a uma redução na resposta imune, porém não foram observadas mortes desses animais. Bhandari e colaboradores (2004) observaram o papel do AA como um redutor de radicais livres na proteção contra os efeitos deletérios da perda excessiva de sangue, uma situação isquêmica. Alguns estudos não demonstraram mudança benéfica na função e produção de leucócitos após o tratamento com AA (HALLIWELL, 1996; CASCIARI *et al.*, 2001).

5.3.3 Investigações de química clínica e histológicas

Inicialmente, foi investigado o efeito da influência entre sexo e tratamento nos diferentes parâmetros bioquímicos estudados. Apresentou-se fotomicrografias de camundongos machos, uma vez que as mesmas alterações histológicas foram observadas em ambos os sexos de camundongos. Em relação aos grupos controles, foram apresentados os grupos PBS e AA, uma vez que todos os demais grupos controles demonstraram perfis histológicos semelhantes.

5.3.3.1 Função hepática

A função hepática foi avaliada por dosagens de AST, ALT, FAL e proteína total, associadas às análises histológicas. O fígado é um órgão com diversas funções metabólicas e qualquer avaliação do seu estado funcional estará relacionada à sua capacidade de executar uma função metabólica específica. Por isso, provas bioquímicas tornam-se um excelente subsídio para a elucidação de comprometimento hepático induzido por diferentes fármacos (MEYER; SVENDSEN, 2003).

Se por um lado, a cardiotoxicidade decorrente do tratamento com antimoniais tem sido bem caracterizada e é um fator limitante da terapia com SbV em humanos, por outro, os danos hepáticos também devem ser destacados. A hepatotoxicidade tem sido descrita em até 50% dos pacientes tratados com antimoniais (DIETZE, 2003). É sugerido que o tratamento com antimoniais seja interrompido quando as transaminases hepáticas atingirem cinco vezes o limite superior do valor de referência (HEPBURN *et al.*, 1993).

Os resultados estatísticos da análise de parâmetros bioquímicos hepáticos demonstraram a presença de influência entre sexo e tratamento apenas no parâmetro ALT (Tabela 16). Todos os parâmetros bioquímicos hepáticos obtidos foram estatisticamente semelhantes entre os grupos controles PBS e AA.

Camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, que receberam SbIII livre e SbIII+AA apresentaram altos níveis de AST, ALT e FAL, em comparação com seus respectivos grupos controles. Nos animais tratados com SbIII+AA, em comparação ao SbIII livre, camundongos machos apresentaram aumento significativo no nível de ALT. Esse achado demonstraram que o AA não foi capaz de reduzir os níveis séricos dessas enzimas alteradas pelo SbIII nesses animais.

De forma geral, a ALT é considerada uma enzima indicadora de dano hepático em primatas, cães e gatos, coelhos e ratos (KERR, 1989; CORNELIUS, 1996). Qualquer lesão tissular no parênquima hepático induz a liberação de ALT na corrente sanguínea, sendo seu aumento, portanto, relacionado com a extensão das lesões celulares e não apenas com a sua gravidade. Já AST é uma enzima mitocondrial e citosólica, logo, maior dano celular deve ocorrer para que ela seja liberada para a corrente sanguínea.

A ALT pode ser utilizada para avaliar lesão hepática em pequenos animais, porém com uma especificidade muito menor (KERR, 1989). Além disso, o fígado é o principal responsável pela produção de proteínas plasmáticas. Geralmente não se observa redução maciça de proteínas, em especial de albumina, até que ocorra perda de 60% da função hepática (THRALL, 2007).

Nos animais que receberam formulações lipossomais de SbIII, observou-se altos níveis de AST, FAL e proteína total no grupo LPSbIII, em comparação com seu respectivo grupo controle, e, apenas nos camundongos machos, aumento significativo dos níveis de ALT. Por outro lado, camundongos que receberam a administração de LCSbIII, apresentaram aumento significativo apenas nos níveis de AST e FAL e, nos camundongos fêmeas, aumento nos níveis de ALT, em comparação com o grupo LCV.

Já em comparação com o grupo SbIII livre, os grupos LCSbIII e LPSbIII apresentaram redução significativa dos níveis de FAL e, nos camundongos fêmeas, redução significativa dos níveis de ALT. Além disso, o grupo LCSbIII apresentou aumento no nível de proteína total quando comparado com o grupo SbIII livre. Estes resultados são indicativos de relativa hepatoproteção induzida pelas formulações lipossomais.

Tabela 16. Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática avaliados em camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, submetidos aos tratamentos por via IP com SbIII nas formas livre ou lipossomais (18 mg.kg⁻¹), com ou sem a associação da administração de AA.

| Parâmetros ^X | | PBS ^c | AA ^d | LCV ^e | LPV ^f | SbIII ^g | SbIII+AA | LCSbIII ^e | LPSbIII ^f | LCSb+AA | LPSbIII+AA |
|--------------------------|-------|------------------|-----------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|--------------|--------------|
| A | | | | | | | | | | | |
| AST (IU/L) | F | 199,6 ± 2,3 | 197,8 ± 2,9 | 197,7 ± 4,0 | 195,4 ± 2,8 | 432,5 ± 36,2 | 481,6 ± 57,9 | 270,5 ± 20,6 | 334,2 ± 26,8 | 344,5 ± 11,1 | 383,8 ± 16,6 |
| | M | 199,2 ± 2,3 | 200,0 ± 1,7 | 201,7 ± 1,6 | 206,5 ± 4,6 | 338,7 ± 18,1 | 398,4 ± 12,4 | 299,6 ± 17,0 | 327,5 ± 11,8 | 284,1 ± 13,1 | 349,6 ± 46,9 |
| | Média | 199,4 ± 1,6 | 198,9 ± 1,7 | 199,7 ± 2,1 | 201,2 ± 3,0 | 381,4 ± 22,7* | 443,8 ± 33,4* | 285,0 ± 13,4* | 330,8 ± 14,3* | 314,3 ± 10,9 | 365,8 ± 25,6 |
| FAL (IU/L) | F | 155,0 ± 2,4 | 162,1 ± 1,7 | 169,8 ± 1,6 | 164,8 ± 1,6 | 335,7 ± 6,3 | 325,3 ± 8,4 | 196,4 ± 2,0 | 194,3 ± 1,8 | 186,2 ± 1,4 | 190,8 ± 1,5 |
| | M | 153,0 ± 1,7 | 157,8 ± 1,2 | 168,9 ± 1,5 | 166,9 ± 1,5 | 320,1 ± 4,8 | 323,4 ± 6,3 | 190,3 ± 10,0 | 196,8 ± 2,2 | 186,4 ± 1,3 | 189,2 ± 2,1 |
| | Média | 153,9 ± 1,4 | 159,9 ± 1,1 | 169,3 ± 1,0 | 165,5 ± 1,1 | 326,6 ± 4,3* | 324,4 ± 5,16 | 193,3 ± 5,0*.& | 195,5 ± 1,4*.& | 186,3 ± 0,9 | 189,9 ± 1,3 |
| Proteína Total (g/dL) | F | 6,2 ± 0,15 | 6,6 ± 0,21 | 6,9 ± 0,12 | 6,2 ± 0,09 | 5,9 ± 0,05 | 6,4 ± 0,05 | 6,7 ± 0,19 | 5,4 ± 0,10 | 5,5 ± 0,08 | 5,6 ± 0,10 |
| | M | 6,4 ± 0,12 | 6,2 ± 0,09 | 7,0 ± 0,17 | 6,7 ± 0,12 | 5,7 ± 0,18 | 5,9 ± 0,30 | 6,8 ± 0,08 | 5,7 ± 0,15 | 6,0 ± 0,31 | 5,6 ± 0,12 |
| | Média | 6,3 ± 0,10 | 6,4 ± 0,12 | 7,0 ± 0,10 | 6,5 ± 0,09 | 5,7 ± 0,11 | 6,1 ± 0,14 | 6,7 ± 0,10& | 5,6 ± 0,09* | 5,8 ± 0,16@ | 5,6 ± 0,07 |
| B | | | | | | | | | | | |
| ALT (IU/L) | F | 66,6 ± 1,0 | 65,4 ± 1,2 | 78,6 ± 1,1 | 82,1 ± 1,6 | 114,9 ± 7,4* | 107,6 ± 4,1 | 93,2 ± 2,8*.& | 82,5 ± 3,0& | 77,8 ± 2,7@ | 89,5 ± 1,7 |
| | M | 66,2 ± 1,01 | 66,8 ± 0,9 | 80,7 ± 1,2 | 80,5 ± 1,5 | 86,4 ± 2,7* | 121,4 ± 2,6 ⁺ | 86,6 ± 2,1 | 92,2 ± 2,3* | 84,5 ± 2,4 | 91,5 ± 1,4 |

Notas: ^AEsses parâmetros não foram influenciados pela interação sexo e tratamento. ^BEsses parâmetros foram influenciados pela interação entre sexo e tratamento. ^cPBS (150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7.2). ^dAA significa ácido ascórbico. ^eLCV e LCSbIII significam lipossomas convencionais vazios e com SbIII, respectivamente. ^fLPV e LPSbIII significam lipossomas peguados vazios e com SbIII, respectivamente. ^gSbIII significa antimônio trivalente livre. ^XAST, ALT e FAL significam aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina, respectivamente. *Representa diferença significativa entre SbIII, SbIII+AA, LCSbIII, LPSbIII e seus respectivos grupos controles. &Representa diferença significativa entre SbIII e grupos lipossomais. @Representa diferença significativa entre grupos lipossomais e seus respectivos grupos associados com AA. ⁺Representa diferença significativa entre SbIII e seu respectivo grupo associado com AA. M e F significam camundongos machos e fêmeas, respectivamente. Dados foram expressos como média ± erro padrão da média. O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (ANOVA ou Kruskal–Wallis).

Adicionalmente, em relação ao grupo tratado com LPSbIII+AA, não foram observadas alterações significativas em comparação com o LPSbIII. Por outro lado, o grupo LCSbIII+AA apresentou redução significativa de proteína total e, nos camundongos fêmeas, redução nos níveis de ALT, em comparação com LCSbIII,

Embora algumas enzimas sejam específicas de determinados órgãos, na maioria das vezes pode ser necessário usar outros recursos que auxiliem na identificação do tecido afetado (BUSH, 1991). Nesse sentido, o exame microscópico do fígado dos camundongos sobreviventes tratados com SbIII livre e SbIII+AA mostrou presença de aspectos degenerativos, difusa inflamação do parênquima, congestão celular, vasculite, áreas de necrose e pigmentos de hemossiderina (Figura 11, C e D).

A fosfatase alcalina está presente no intestino, nos rins, no fígado e nos ossos. (KRAMER; HOFFMANN, 1997). Nem toda hepatopatia significativa causa um aumento nos níveis de FAL, porém necrose hepatocelular geralmente cursa com aumento transitório desta enzima (WILLARD *et al.*, 1993). No presente estudo, este fato pôde ser confirmado pela análise histológica, onde foi observada a presença de áreas de necrose no fígado de animais tratados com SbIII, os quais também apresentaram elevados níveis de FAL, em comparação com seu respectivo grupo controle.

Nos animais sobreviventes, que receberam formulações lipossomais de SbIII notou-se a presença de vacúolos citoplasmáticos, imagem negativa sugerindo esteatose parcial microvesicular e alguns hepatócitos exibindo moderado grau de degeneração hidrópica. Além disso, ramos da veia hepática nos espaços porta apresentaram-se hiperêmicos contendo infiltrado inflamatório mononuclear, com presença de perivasculite (Figuras 11, E e G). A administração das formulações lipossomais, especialmente a LPSbIII, promoveu inflamação difusa e notável hiperemia no fígado (Figura 11, G). Mas, no geral, em comparação com o grupo que recebeu tratamento com SbIII livre, as alterações histopatológicas observadas nos grupos que receberam tratamento com os lipossomas foram qualitativamente menos difusas e de menor gravidade. As características morfológicas do fígado rins foram similares aos grupos controles.

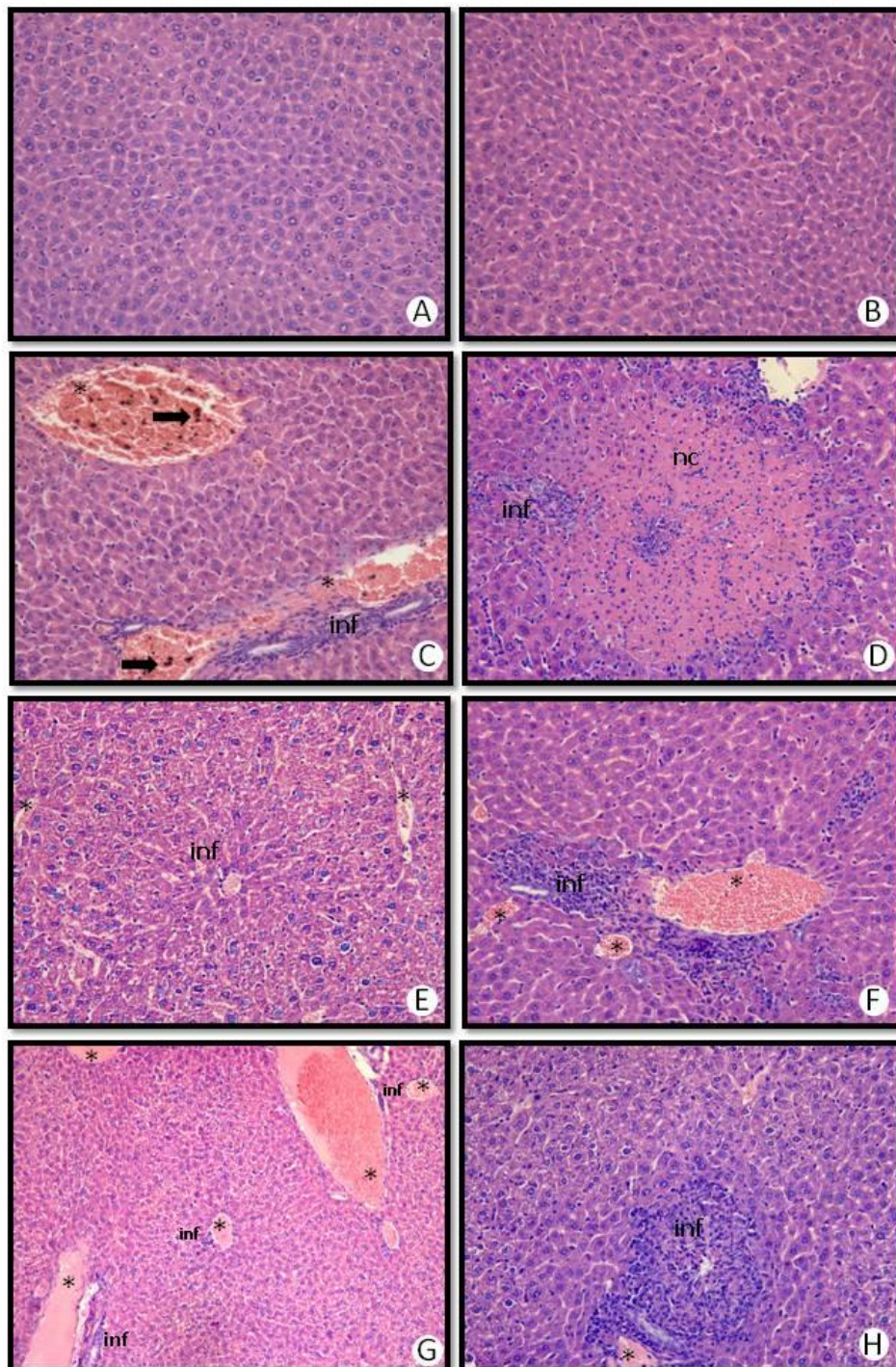


Figura 10. Fotomicrografia de fígado de camundongos *Swiss* machos tratados com PBS (A), AA (B), SbIII livre (C), SbIII+AA (D), LCSbIII (E), LCSbIII+AA (F), LPSbIII (G) e LPSbIII+AA (H). Presença de vasos sanguíneos dilatados e hiperêmicos (asterisco), reação inflamatória difusa (inf) e área de necrose (nc). Hematoxilina-eosina (HE), aumento original, x200.

Rosalk e colaboradores (1999) mostraram que a ALT apresenta um pico de liberação no sangue de cerca de 3 a 4 dias após a lesão, regressando aos níveis normais em, aproximadamente, duas semanas. A persistência dos valores elevados de ALT pode indicar, portanto, o estabelecimento de patologia crônica. As amostras de soro dos camundongos foram obtidas 14 dias após a administração única de todas as preparações. Mesmo após ter transcorrido esse período de tempo, foram detectadas alterações bioquímicas hepáticas, confirmando a presença da hepatotoxicidade do SbIII. Este fato foi confirmado pela análise histológica.

Em síntese, os elevados níveis de ALT, AST e FAL observados nos grupos que receberam SbIII ou SbIII+AA, associados à análise histológica, confirmaram a presença de danos hepáticos graves causados pelo SbIII. Por outro lado, foram observadas alterações histológicas de caráter menos difuso e de menor gravidade, que associadas aos resultados bioquímicos obtidos, demonstraram claramente o efetivo papel protetor dos lipossomas na toxicidade deste semimetal. A associação de AA à administração de SbIII nas formas livre ou lipossomais, nas condições experimentais utilizadas, não foi capaz de exercer efeito hepatoprotetor.

5.3.3.2 Função renal e análise histológica do baço

Os rins são órgãos dinâmicos que apresentam como principal função a formação da urina. Recebem cerca de 25% do fluxo sanguíneo cardíaco e, conseqüentemente, toda substância química que atinja a circulação sistêmica, os atingirá em quantidades elevadas. Portanto, são considerados alvos frequentes de toxicidade de muitos xenobióticos (DEKANT; VAMVAKAS, 1996).

Alguns estudos demonstraram que mais de 80 % do Sb pode ser excretado em até nove horas após a sua administração em humanos (VALLADARES, 1996, HANTSON *et al.*, 2000). Insuficiência renal e necrose tubular aguda podem ocorrer durante o tratamento com antimoniais e levar o paciente à morte (CUCÉ; BELDA JUNIOR; DIAS, 1990; RODRIGUES *et al.*, 1999; DIAMENT *et al.*, 2003).

No presente trabalho, a função renal foi avaliada por dosagens de ureia e creatinina associadas às análises histológicas. Camundongos machos tratados com AA e SbIII livre apresentaram uma redução significativa nos níveis de ureia no sangue, ambos em comparação com o grupo controle PBS (Figura 12, C). O mesmo ocorreu com o grupo de camundongos fêmeas tratadas com LPSbIII, quando comparado ao seu respectivo grupo controle. Esses

resultados poderiam indicar relativa toxicidade do SbIII e do AA, nas doses administradas. A redução nos níveis séricos de ureia pode ser detectada em quadros de menor catabolismo proteico e insuficiências hepática e renal, pois é, primariamente, sintetizada no fígado e excretada, principalmente, pelos rins (MILLER, 1999; LEITE *et al.*, 2009).

Um aumento nos níveis de ureia sanguínea pode significar maior catabolismo protéico ou redução de sua excreção urinária, devido à presença de patologias renais, tais como glomerulonefrite ou necrose tubular aguda (MILLER, 1999; LEITE *et al.*, 2009; LEITE *et al.*, 2011).

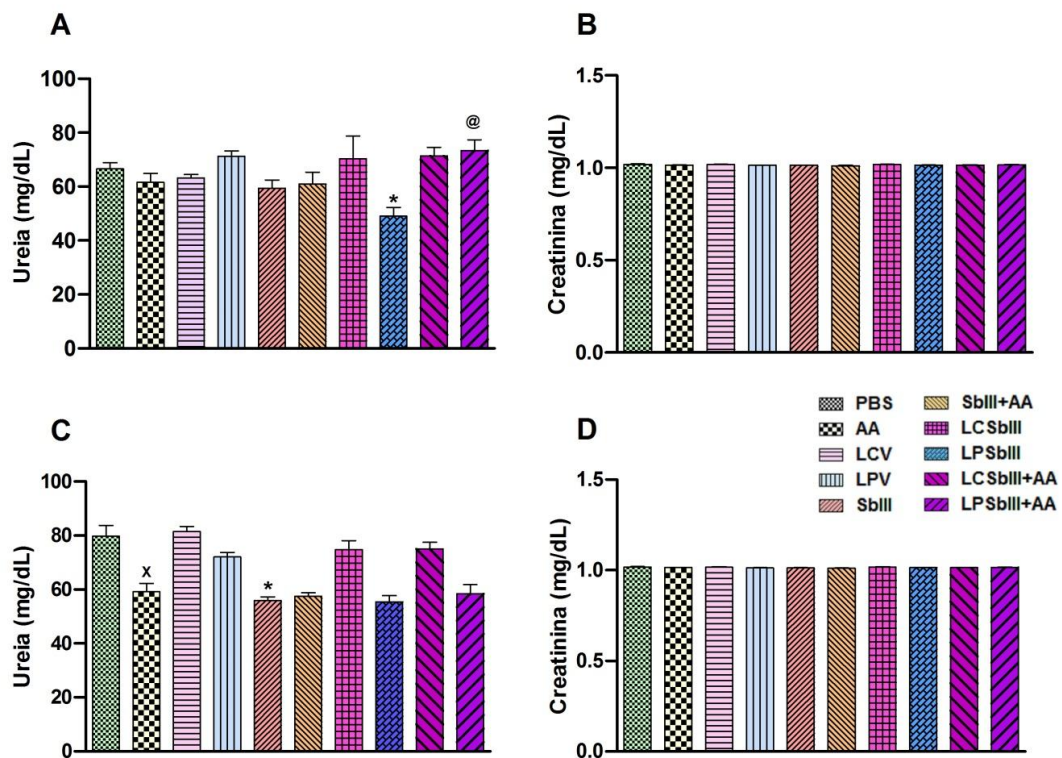


Figura 11. Níveis de ureia e creatinina em camundongos *Swiss*, fêmeas (A e B) e machos (C e D), avaliados 14 dias após tratamento por via IP, dose única, de SbIII nas formas livre ou lipossomais (18 mg.kg^{-1}), com ou sem a administração de AA (300 mg.kg^{-1}). Notas: PBS (150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7.2). AA significa ácido ascórbico. LCV e LCSbIII significam lipossomas convencionais vazios e com SbIII, respectivamente. LPV e LPSbIII significam lipossomas pegulados vazios e com SbIII, respectivamente. SbIII significa antimônio trivalente livre. *Representa diferença significativa entre SbIII, LPSbIII and seus respectivos grupos controles. @Representa diferença significativa entre grupos lipossomais e seus respectivos grupos associados com AA. ^XRepresenta diferença significativa entre AA e grupo PBS. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (ANOVA ou Kruskal–Wallis).

Não foram observadas alterações significativas nos níveis de creatinina nos camundongos, machos e fêmeas, submetidos a todos os tratamentos (Figura 12, B e D). Por outro lado, camundongos fêmeas que receberam tratamento com LPSbIII+AA apresentaram aumento dos níveis de ureia no sangue, em comparação com o grupo que recebeu apenas LPSbIII (Figura 12, A). Em fases iniciais de insuficiência renal, pode existir um aumento compensatório na secreção de creatinina, evitando a sua redução nos níveis plasmáticos (ASNA *et al.*, 2005). Assim, um possível dano renal agudo pode ser avaliado pelo índice de ureia/creatinina, a fim de avaliar a possível redução de perfusão renal e de filtração glomerular. No entanto, nenhum tratamento foi capaz de induzir alteração no índice uréia/creatinina (dados não apresentados).

Na análise histológica, os rins dos animais tratados com SbIII livre apresentaram alterações de morfologia, como glomerulonefrite, presença de processo inflamatório e vasculite (Figura 13, C). A hiperemia observada no fígado do grupo SbIII, também foi notável nos rins.

O antimônio acumula-se, em geral, em órgãos vascularizados e possui grande afinidade pelo baço e pelo sangue (DIETER, 1992; RATH *et al.*, 2003). O baço é um órgão linfático que faz parte do Sistema Retículo-Endotelial, participa dos processos de hematopoiese e hemocaterese e caracteriza-se por duas funções: a linfóide e a vascular. Quando ocorrem lesões no baço, outros órgãos, principalmente o fígado, aumentam sua capacidade de combate às infecções (COTRAN *et al.*, 1999).

A análise histológica do baço, de camundongos tratados com SbIII livre, mostrou mudanças na reatividade da polpa branca e presença de áreas de necrose (Figura 14, C). Estas alterações histopatológicas descritas também foram observadas nos rins e baço de grupos tratados com SbIII+AA, porém, geralmente, apresentaram-se em caráter mais difuso e de maior gravidade (Figuras 13 e 14, D).

Foram observadas, em rins e baço dos animais que receberam tratamentos com as formulações lipossomais de SbIII, alterações histológicas menos difusas e de menor gravidade em comparação com o grupo SbIII livre (Figuras 13 e 14, E e G). Dentre essas observações, pode-se destacar a redução de alterações na morfologia do glomérulo e a ausência de áreas de necrose no baço, demonstrando, assim, o papel importante dos nanocarreadores. Lipossomas são descritos por serem capazes de modificar o perfil de distribuição de um fármaco encapsulado (BLUME; CEVC, 1990; LASIC, 1998; LEITE *et al.*, 2009).

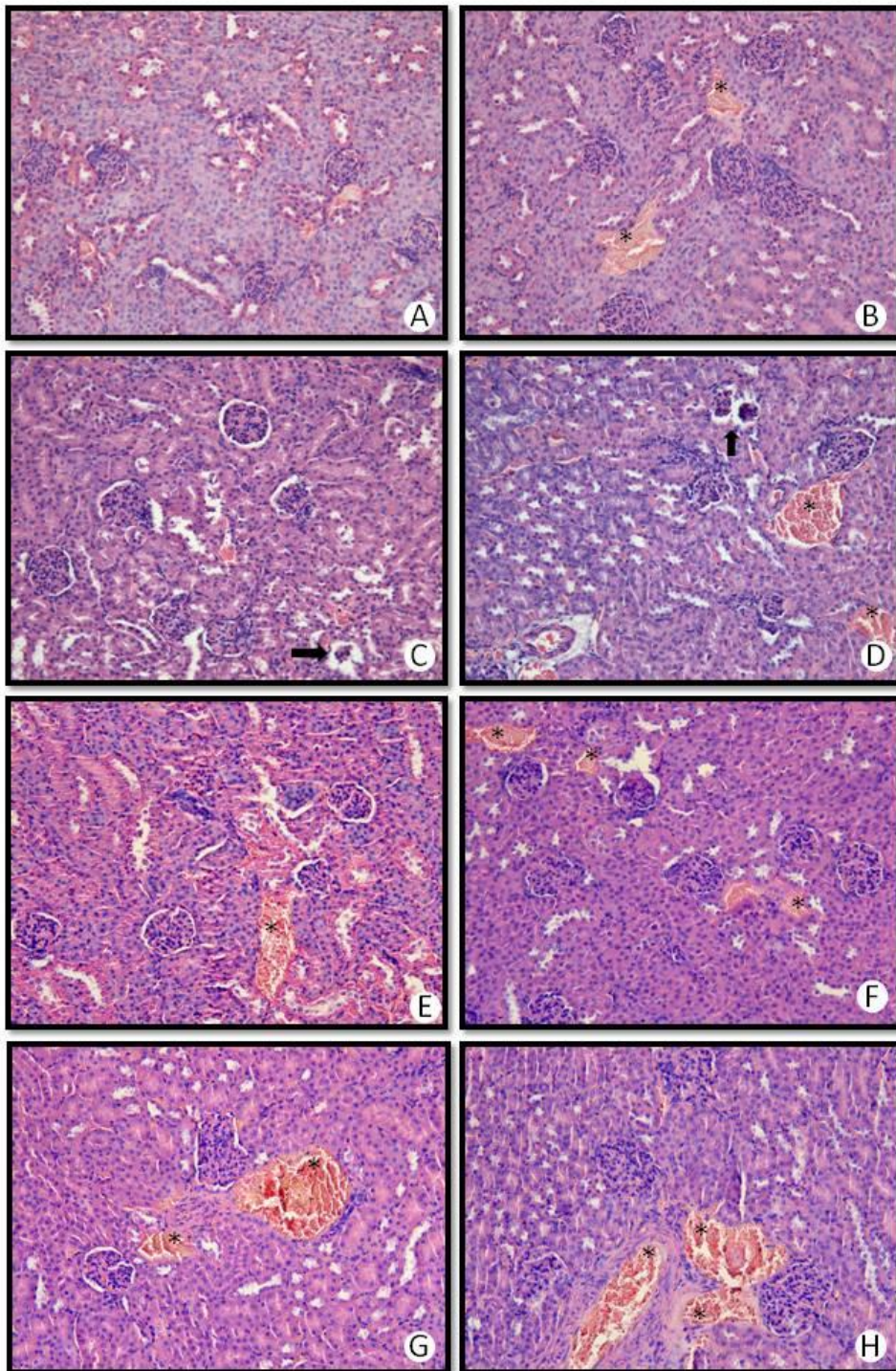


Figura 12. Fotomicrografia de rins de camundongos *Swiss* machos tratados com PBS (A), AA (B), SbIII livre (C), SbIII+AA (D), LCSbIII (E), LCSbIII+AA (F), LPSbIII (G) e LPSbIII+AA (H). Presença de vasos sanguíneos dilatados e hiperêmicos (asterisco) e esclerose glomerular (setas). Hematoxilina-eosina (HE), aumento original, x200.

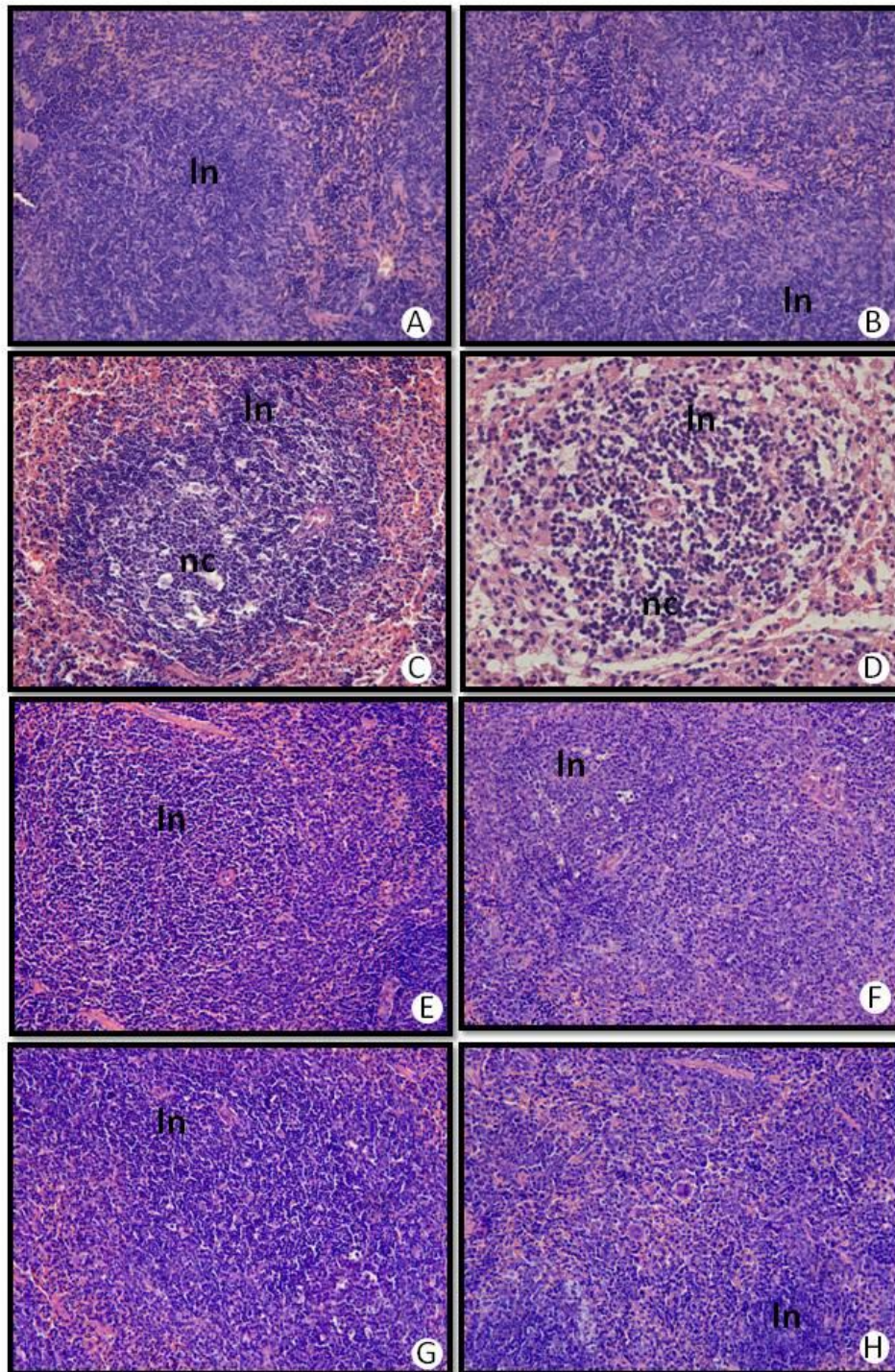


Figura 13. Fotomicrografia de baço de camundongos *Swiss* machos tratados com PBS (A), AA (B), SbIII livre (C), SbIII+AA (D), LCSbIII (E), LCSbIII+AA (F), LPSbIII (G) e LPSbIII+AA (H). Presença de reação inflamatória difusa com hiperplasia de folículo linfoide (ln) e área de necrose (nc). Hematoxilina-eosina (HE), aumento original x200.

Não foram observadas alterações histopatológicas relevantes em baço e rins dos animais tratados com PBS ou lipossomas vazios. Porém, no grupo AA, observou-se nos rins a presença de vasos sanguíneos dilatados e hiperêmicos. Além disso, em rins e baço de animais tratados com LCSbIII+AA ou LPSbIII+AA observou-se alterações histopatológicas, como perivasculite e hiperemia, de caráter mais difuso (Figuras 13 e 14, F e H), quando comparados com os órgãos dos animais que receberam apenas os lipossomas de SbIII. Em tratamentos com doses elevadas de AA tem sido relatada a existência de concentrações significativas de oxalato, ocasionando quadros clínicos de nefropatia (LAWTOON *et al.*, 1985).

Em síntese, uma possível lesão renal foi observada na análise histológica dos rins dos animais dos grupos tratados com SbIII e SbIII+AA. Porém, o efeito destas lesões não foram capazes de alterar a taxa de filtração glomerular e os níveis de creatinina sérica após 14 dias da administração única dessas preparações. Nos grupos tratados com o SbIII lipossomal, não foram observadas alterações histológicas relevantes nos rins e no baço.

5.3.4 O papel do ácido ascórbico

Em geral, no presente estudo, camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, apresentaram sensibilidade relevante à toxicidade do SbIII quando administrado via IP, na dose de 18 mg.kg⁻¹. Logo, os resultados histológicos associados aos resultados bioquímicos sugerem que encapsulação de SbIII em lipossomas promove uma proteção frente a toxicidade do SbIII no fígado, baço e rins de camundongos *Swiss*. No entanto, essa proteção foi reduzida quando as formulações lipossomais foram associadas à administração de AA.

A administração de AA, dentre os diversos tratamentos alternativos utilizados pela população mundial, é um dos mais populares. Tem sido utilizado por via oral e parental há mais de 60 anos como agente terapêutico (FIORUCCI *et al.*, 2003). Uma de suas aplicações mais controversas é quando utilizado no tratamento do câncer (CAMERON; PAULING, 1978). Apesar de sua popularidade, a aplicabilidade do seu uso por via parenteral ainda é considerada desconhecida. Embora o AA seja conhecido como um poderoso antioxidante, dependendo da dose utilizada, pode também atuar como um pró-oxidante (PADAYATTY *et al.*, 2003).

Os radicais livres são capazes de promover reações de oxidação e de redução, apresentando um papel importante em processos fisiológicos e patológicos. O elétron desemparelhado presente nestes radicais livres é capaz alterar todo seu comportamento químico, tornando-o mais reativo em comparação com a sua forma não radical. São capazes

de ocasionar peroxidação lipídica, abstraindo um átomo de hidrogênio de uma cadeia de ácido graxo insaturado, resultando em um rearranjo da dupla ligação, culminando com a destruição dos lipídeos (GARDNER, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O AA é rapidamente oxidado a monohidroascorbil (\bullet ASC) e, posteriormente, a ácido dehidroascórbico (DHA), realizando atividades pró-oxidantes (MAY *et al.*, 2001). É então regenerado de DHA, via glutaredoxina, que converte GSH para GSH dissulfeto, esgotando GSH intracelular e aumentando a susceptibilidade celular ao estresse oxidativo (PODMORE *et al.*, 1998; MAY *et al.*, 2001). O \bullet ASC pode ser complexado com ferro (Fe^{+3}) presente em microsomas de fígado de ratos catalisando, assim, processos oxidativos nas cadeias lipídicas de membranas biológicas (CASALINO *et al.*, 1996).

Chang e colaboradores (2007) observaram que camundongos tratados com As apresentaram efeitos adversos desse semimetal em funções reprodutivas masculinas, como os níveis de glutatona reduzidos e aumento dos níveis de proteína carbonil. No entanto, quando o AA foi associado às administrações, estes efeitos adversos foram revertidos (CHANG *et al.*, 2007). A administração de 500 mg por dia de AA associado com a vitamina E foi capaz de impedir a progressão do estresse oxidativo no miocárdio de pacientes na fase crônica da Doença de Chagas (MAÇAO *et al.*, 2007). Por outro lado, duas doses diárias diferentes de AA ($8,6 \times 10^{-4} \text{ mg.g}^{-1}$ e $7,14 \times 10^{-3} \text{ mg.g}^{-1}$), administradas por via oral não foram capazes de proteger camundongos *Swiss* do stress oxidativo causado por radicais livres formados nessa doença (GUSMÃO *et al.*, 2012).

Estudos demonstraram que doses elevadas de AA podem efetivamente promover a alguns tipos de câncer em camundongos, porém apenas em doses quase letais tinham algum efeito protetor (LOWELL, 1985). A suplementação com AA e vitamina E reduziu a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), evitou a perda de mobilidade e capacidade de penetração em oócitos de ratos expostos ao chumbo, demonstrando, assim, um papel protetor (HSU *et al.*, 1998).

Os resultados do presente trabalho apoiam a hipótese de que a altas doses de AA podem promover o estresse oxidativo como proposto por Podmore e colaboradores (1998). A associação da administração de AA com SbIII, nas formas livres ou lipossomais, não foi capaz de produzir um efeito protetor e reduzir seus efeitos tóxicos. As alterações histopatológicas observadas nos camundongos que receberam os tratamentos com LCSbIII+AA e LPSbIII +AA poderiam ser explicadas, em parte, devido a um desequilíbrio de espécies oxidantes e os sistemas antioxidantes. Como proposto por Teixeira e colaboradores

(2003) e Lima e colaboradores (2004), pode ter ocorrido interações entre as bicamadas lipídicas dos lipossomas e espécies reativas, influenciando o perfil de liberação do SbIII. Ou seja, a associação da administração de AA (300 mg.kg^{-1}) com lipossomas de SbIII, pode ter levado a uma maior liberação de SbIII e, conseqüentemente, a uma maior toxicidade.

O mecanismo do aumento do estresse oxidativo não está claro, mas não parece depender da concentração de SbIII, uma vez que foi observada toxicidade em ambas as preparações LCSbIII+AA e LPSbIII+AA. Resultados semelhantes, como a presença de efeitos pró-oxidantes no fígado de camundongos, foram observados quando AA foi associado à administração de ferro (Fe). A associação de AA+Fe refletiu em um aumento de peroxidação lipídica celular (PREMKUMAR; BOWLUS, 2003). Este processo promove a alteração grave da membrana celular, tais como: perda de fluidez, mudança na função secretora de gradientes iônicos transmembranares, processo inflamatório, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos para morte celular (BEZERRA *et al.*, 2004)

A dinâmica que envolve as membranas, a presença de espécies reativas e antioxidantes determinam diferentes níveis de peroxidação em bicamadas lipídicas (TEIXEIRA *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2004). A caracterização das interações dessas membranas com espécies reativas e antioxidantes devem ser investigadas. Este entendimento pode contribuir para a elucidação dos resultados obtidos com o uso da associação de AA com SbIII, principalmente quando encapsulados em lipossomas.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A administração de dose única de 18 mg.kg^{-1} de SbIII livre induziu claros sinais de toxicidade, permitindo, assim, a sua determinação como dose limite do SbIII.
- ✓ Os sinais cardiovasculares de ECG de camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, foram obtidos um dia antes e 14 dias após a administração de SbIII, nas formas livre ou lipossomais, associadas ou não à administração de AA e serão utilizados em trabalhos futuros.
- ✓ Os tratamentos com SbIII livre ou SbIII+AA induziram mortalidade significativa, sinais clínicos de toxicidade e perda de peso corporal nos animais (inferior a 15%). As formulações lipossomais protegeram os animais da morte e reduziram a presença e intensidade dos sinais clínicos gerais de toxicidade.
- ✓ Não foram observadas alterações importantes nas análises de hemácias, hematócrito, monócitos e neutrófilos nos diferentes grupos estudados nas condições experimentais empregadas.
- ✓ Os elevados níveis de ALT, AST e FAL observados nos grupos SbIII e SbII+AA, associados as alterações histopatológicas observadas no fígado desses animais, confirmaram danos hepáticos graves causados pelo SbIII .
- ✓ Não foram observadas alterações significativas, indicativas de lesão renal, nos parâmetros bioquímicos analisados. Porém, os grupos tratados com SbIII e SbIII+AA apresentaram alterações histopatológicas relevantes em rins e baço.
- ✓ A encapsulação de SbIII em lipossomas promoveu uma redução relevante das alterações nos parâmetros bioquímicos hepáticos e nos tecidos de fígado, baço e rins dos camundongos, demonstrando um efetivo papel protetor dos lipossomas na toxicidade deste semimetal nesses órgãos.
- ✓ O AA, quando associado às administrações de SbIII nas formas livre ou lipossomais, não exerceu efeito protetor contra a sua toxicidade em fígado, baço

CONCLUSÃO GERAL

- ✓ O método analítico aplicado na quantificação de SbIII, por ICP-OES, foi revalidado e teve sua aplicabilidade na quantificação desse semimetal em formulações lipossomais convencionais e peguiladas com concentração lipídica total de 120 g.l⁻¹.
- ✓ As formulações lipossomais de SbIII, convencional e peguilada obtidas foram satisfatórias para as avaliações de suas toxicidades agudas.
- ✓ Os resultados da avaliação da toxicidade aguda demonstraram que os efeitos tóxicos provocados pelo SbIII, administrado na sua forma livre, por via IP, foram reduzidos com a utilização dos lipossomas convencionais e peguilados.
- ✓ A associação da administração de AA com SbIII, nas formas livre ou lipossomais, não produziu efeito protetor contra a toxicidade desse semimetal nas condições experimentais avaliadas.

REFERÊNCIAS

ALLEN, T. M.; HANSEN, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes effect of dose. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1068, n. 2, p. 133-141, 1991.

ANDERSON, M., OMRI, A. The effect of diferente lipid componentes on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. **Drug Delivery**, v. 11, n. 1, p. 33-39, 2004.

ARAKAWA, E., KAZUHIDE, H., JUNKO, I., SHINICHI, I., JUNKO, U.; KAZUO, Y.; SHOJI, O.; YUZURU, M. L-ascorbic acid stimulates expression of smooth muscle-specific markers in smooth muscle cells both in vitro and in vivo. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 745-751, 2003.

ARANA, B.; RIZZO, N.; DIAS, A. Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: A review. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, n. 1-2, p. 93-95, 2001.

ARZI, A., HEMMATI, A. A., RAZIAN, A. Effect of Vitamins C and E on cognitive function in mouse. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 3, p. 249-252, 2004.

ASNA, N.; LEWY, H.; ASHKENAZI, I. E.; DEUTSCH, V.; PERETZ, H.; INBAR, M.; RON, I. G. Time dependent protection of amifostine from renal and hematopoietic cisplatin induced toxicity. **Life Sciences**, v. 76, n. 16, p. 1825-1834, 2005.

BAHLIS, N.J., McCAFFERTY-GRAD, J., JORDAN-McMURRY, I., NEIL, J., REIS, I., KHARFAN-DABAIA, M., ECKMAN, J., GOODMAN, M., FERNANDEZ, H. F., BOISE, L.H., LEE, K. P. Feasibility and Correlates of Arsenic Trioxide Combined with Ascorbic Acid-mediated Depletion of Intracellular Glutathione for the Treatment of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 12, p. 3658-3668, 2002.

BARBA, C., MENDEZ, S., RODDICK-LANZILOTTA, A., KELLY, R., PARRA, J. L., CODERCH, L. Cosmetic effectiveness of topically applied hydrolysed keratin peptides and lipids derived from wool. **Skin Research and Technology**, v. 14, p. 243-248, 2008.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BEZERRA, F. J. L., REZENDE, A. A., RODRIGUES, S. J., ALMEIDA, M. G. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 5, p. 640-649, 2004.

BHANDARI, B., REDDY, M. P. K., FAHIM, M. Role of Ascorbic Acid in Cardiovascular Performance During Acute Hemorrhage. **Vascular Disease Prevention**, v. 1, n. 1, p. 69-78, 2004.

BLUM, J.; DESJEUX, P.; SCHWARTZ, E.; BECK, B.; HATZ, C. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Among Travellers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 158-166, 2004.

BLUME G; CEVC G. Liposomes for the sustained drug release in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1029, n. 1 p. 91-97, 1990.

BOELSTERLI, U.A. Animal models of human disease in drug safety assessment. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 109-121, 2003.

BORBOREMA, Samanta Etel Treiger. Desenvolvimento de Farmacocinética de Antimônio Encapsulado em Lipossomas de Fosfatidilserina utilizando radioisótopos em Leishmaniose Experimental. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia à Universidade de São Paulo, 2010.

BOULIKAS, T. Molecular mechanisms of cisplatin and its liposomally encapsulated form, Lipoplatin™. Lipoplatin™ as a chemotherapy and antiangiogenesis drug. **Cancer Therapy**, v. 5, p. 349-376, 2007.

BRASIL, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. São Paulo: H.A. Rothschild, 259 p., 1996.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para a condução de estudos não-clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Brasília: 2010. Disponível em:
<<http://websphere.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/820d0800419dc0279534bf8b4fca6d11/GUIA+PARA+A+CONDUÇÃO+DE+ESTUDOS+NÃO+CLÍNICOS+DE+SEGURANÇA+NCESSÁRIOS+AO+DESENVOLVIMENTO+DE+MEDICAMENTOS.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 23 maio 2011.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 904p., 2v/il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2ª ed. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Resolução Nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 686, n.1, p. 3-10, 1996.

BRITO, A.S. Manual de Ensaio Toxicológicos *in vivo*. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 122 p., 1994.

BRYCESON AD, CHULAY JD, HO M, MUGAMBII M, WERE JB, MUIGAI R, et al. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. I. Clinical and immunological studies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 700-704, 1985.

BURNS, D.T., CHIMPALLE, D., DULLICK, H.J. Spectrophotometric determination of antimony after extractions of brilliant green hexachloroantimoniate (V) with microcrystalline 1,4-dichlorobenzene. **Analytica Chimica Acta**, v. 284, n. 1, p. 195-198, 1993.

BURNS, J. J. Biosynthesis of L-ascorbic acid; basic defect in scurvy. **American Journal of Medicine**, v. 26, n. 5, p. 740-748, 1959.

BUSH, B. M. Interpretation of laboratory results for small animal clinicians. Oxford: Blackwell Scientific, 1991.

CAMERON, E., PAULING, L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 9, p. 4538-4542, 1978.

CAMERON, E.; PAULING, L.; LEIBOVITZET, B. Ascorbic acid and cancer: A review. **Cancer Research**, v. 39, n.3, p. 663-681, 1979.

CARTER, K. C., DOLAN, T. F., ALEXANDER, J., BAILLIE, A. J., MCCOLGAN, C. Visceral leishmaniasis: drug carrier characteristics and the ability to clear parasites from the liver, spleen and bone marrow in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 41, n. 2, p. 87-91, 1989.

CASALINO, E., SBLANO, C., LANDRISCINA, C. A possible mechanism for initiation of lipid peroxidation by ascorbate in rat liver microsomes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 28, p. 137-149, 1996.

CASCIARI, M. J. J., RIORDAN, N. H., SCHMIDT, T. L., MENG, X. L., JACKSON, J. A., RIORDAN, H. D. Citotoxicity o ascorbate, lipoic acid and other antioxidants in hollow fibre in vitro tumor. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 11, p. 1544-1550, 2001.

CASTRO, J.A. Toxicologia básica: mecanismos de toxicidade y sus aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 2, p. 197-206, 1993.

CASTRO, Renata A. Oliveira. Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, associado ou não ao ácido ascórbico, em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*. Dissertação (Mestrado). Escola de Farmácia, Cípharma, Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 689, n. 1, p. 175-180, 1997.

CHEN, Q.; ESPEY, M. G.; KRISHNA, M. C.; MIRCHELL, J. B.; CORPE, C. P.; BUETTNER, G. R.; SHACTER, E.; LEVINE, M. Pharmacological ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 38, p. 13604-13609, 2005.

CHENG, S. I., JIN, B., YOUN, P., PARK, C., PARK, J. D., RYU, D. Y. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 218, n. 2, p. 196-203, 2007.

CHRISTORPHERSON, J. B. M. A., CANTAB, LOND, F. R. C. P., ENG, F. R. C. S. The successful use of antimony in bilharziosis. **Lancet**, v. 192, n. 4958, p. 325-327, 1918.

CHULAY JD, FLECKENSTEIN L, SMITH DH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 69-72, 1988.

CORNELIUS, L. M. Anormalidade de perfil bioquímico padrão. In: LORENZ, M. D., CORNELIUS, L. M.M (Ed). Diagnóstico clinic em pequenos animais. 2 ed. Rio de Janeiro: Interlivros, cap., 61, p. 435-478, 1996.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, P. In: Robbins: Pathologic Basis of disease, Saunders Company, 6th edition, New York, 1999.

CUCÉ, L. C.; BELDA JUNIOR, W.; DIAS, M. C. Alteracoes renais por hipersensibilidade ao uso do antimonial pentavalente (glucantime®) na leishmaniose tegumentar americana. Relato

de um Caso. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 4, p. 249-251, 1990.

DADGAR, D., BURNETT, P. A., CHOC, M. G., GALLICANO, K., HOOPER, J. W. Application issues in biological method validation, sample analysis and data reporting. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 89-97, 1995.

DE GREGORI, I., QUIROZ, W., PINOCHET, H., PANNIER, F., GAUTIER-POTIN, M. Speciation analysis of antimony in marine biota by HPLC-(UV)-HG-AFS: Extraction procedures and stability of antimony species. **Talanta**, v. 73, n. 3, p. 458-465, 2007.

DE MELO, A. L., SILVA-BARCELLOS, N. M., DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, n. 1, p. 227-230, 2003.

DE PAIVA, F.P., MAFFILI, V.V., SANTOS, A.C.S. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Ministério da Saúde. Salvador, Bahia, 2005.

DE WOLF, F. A. Antimony and health. **British Medical Journal**, v. 6889, n. 310, p. 1216-1217, 1995.

DEKANT, W.; VAMVAKAS, S. Biotransformation and membrane transport in nephrotoxicity. **Critical Reviews Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 309-334, 1996.

DI CHRISTINA, G., CARONIA, G. Ueber die Therapie der inneren Leishmaniosis. **Deutsches Archiv Klinische Medizin**, v. 117, p. 263, 1915.

DIAMENT, M., ELIAS, K. M., FURLAN, C. C., FURTADO, J. J. D. NERY, S. B. N-metilglucamina (Glucantime) e insuficiência renal aguda no tratamento da leishmaniose muco-cutânea: Relato de um Caso. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 4, p. 24, 2003.

DIETER, M. NTP technical report on the toxicity studies of antimony potassium tartrate (CAS No. 28300-74-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Drinking Water and Intraperitoneal Injection Studies). **National Toxicology Program Toxic Report**, 1992.

DIETZE, R. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, S., CIMERMAN, B. **Medicina Tropical**, v. 36, p. 85-103, 2003.

DORETTO, Keity Margareth. Síntese e caracterização do antimoniato de meglumina usado no tratamento de leishmaniose e desenvolvimento de métodos para especiação de antimônio. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

EMONS, H., KRACHLER, M. Urinary antimony speciation by HPLC-ICP-MS. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 16, p. 20-25, 2001.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). ICH Topic M 3 (R2) – Non-Clinical Safety for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. CPMP/ICH/286/95, June 2009. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002720.pdf>. Acesso: 11 jun. 2011.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Single Dose Toxicity, 3BS1a. London: 1987. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm>>. Acesso: 07 jun. 2011.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A. Leishmaniose tegumentar americana. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**, 3a ed. São Paulo: Atheneu, p. 1543-1557, 2005.

FAN, Z. Determination of antimony (III) and total antimony by single-drop microextraction combined with electrothermal atomic adsorption spectrometry. **Analytical Chimica Acta**, v. 585, n. 2, p. 300-304, 2007.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161-171, 2005.

FERREIRA, C. S.; MARTINS, P. S.; DEMICHELI, C.; BROCHU, C.; OUELLETTE, M.; FRÉZARD, F. Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. **Biomaterials**, v.16, n. 3, p. 441-446, 2003.

FERREIRA, H., LUCIO, M., SIQUET, C., REIS, S. Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos, **Química**, v. 99, p. 39-51, 2005.

FERRONI, R., MAZZOTTA, D., MANTOVANI, G., GUARNERI, M., FAGIOLI, F., BALBONI, P.G., PAOLINI, L. Determination of antimony levels in organs of mice, treated with an antimony-albumin complex, by atomic absorption spectroscopy. **Farmaco Prática**, v. 42, p. 123-9, 1987.

FIORUCCI, A. R., SOARES, M. H. F. B., CAVALHEIRO, E. T. G. A importância da Vitamina C na sociedade através dos tempos. **Química Nova na Escola**, n.17, p. 3-7, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry - Single Dose Acute Toxicity for Pharmaceuticals. Maryland: 1996. Disponível em:<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079270.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Nonclinical Safety Evaluation of Drug or Biologic Combinations. Maryland: 2006. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm079243.pdf>> Acesso em: 11 jun. 2011.

FRANCO, M.A., BARBOSA, A.C., RATH, S.; DOREA, J.G. Antimony oxidation states in antileishmanial drugs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 5, p. 435-437, 1995.

FRANKE, E.D.; WIGNALL, F. S.; CRUZ, M. E.; ROSALES, E.; TOVAR, A. A.; LUCAS C. M.; LLANOS-CUENTAS, A.; BERMAN, J. D. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. **Annals of Internal Medicine**, v. 113, n. 12, p. 934-940, 1990.

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert opinion on drug delivery**, v. 7, n. 12, p. 1343-58, 2010.

FRÉZARD, F.; MICHALICK, M. S. M.; SOARES, C. F.; DEMICHELI, C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 33, n. 7, p. 841-846, 2000.

FRÉZARD, F.; SCHENTTINI, A.; FERREIRA, C. S. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45(3), p.913-916, 2001.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, n. 1, p.65-86, 1989

GASSER JÚNIOR, R. A.; MAGILL, A. J.; OSTER, C. N.; FRANKE, E. D.; GRÖGL, M.; BERMAN, J. D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p. 83-90, 1994.

GEBELI, T. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. **Chemico-Biological Interactions**, v. 107, p. 131-144, 1997.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. C. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONZÁLEZ, M. J. G., RENEDO, O. D., MARTÍNEZ, M. J. A. Speciation of antimony by adsorptive stripping voltammetry using pyrogallol. *Talanta*, v. 71, n. 2, p. 691-698, 2007.

GOODWIN LG, PAGE JE. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochemical Journal.*, v. 37, n. 2, p. 198-209, 1943.

GRÜBER, S. C.; RANGEL, O. G.; LUGO, A. R. Leishmaniasis en la infancia. *Medicina Cutanea Ibero-latino-americana*, v. 31, n. 6, p. 351-361, 2003.

GUIDANCE FOR INDUSTRY, Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, **Food and Drug Administration**, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001.

GUO, H.; LI, Y.; CHEN, X.; NIE, L.; HE, N. Determination of trace antimony (III) by adsorption voltammetry at carbon paste electrode. *Sensors*, v. 5, n. 4, p. 284-292, 2007.

GUO, H.; LI, Y.; CHEN, X.; NIE, L.; HE, N. Determination of trace antimony (III) by adsorption voltammetry at carbon paste electrode. *Sensors*, v. 5, n. 4, p. 284-292, 2005.

GUSMÃO, A. S., CASTANHO, R. E. P., ANDRADE, R. F. A., FARSETTI, C. M., MATHIAS, A. B., THEREZO, A. L. S., MARTINS, L. P. A. Vitamin C effects in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* QM2 strain. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p. 51-57, 2012.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, v. 16, p. 33-50, 1996.

HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PYHSICS. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2012.

HANTSON P., LUYASU S., HAUFROID V., LAMBERT M. Antimony excretion in a patient with renal impairment during meglumine antimoniate therapy. *Pharmacotherapy*, v. 20, n. 9, p. 1141-1143, 2000.

HAYES, W. A., DiPASQUALE, L.C. Acute toxicity and eye irritation. *Pinciples and Methods of Toxicology*. 4. ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001.

HEPBURN, N.C.; TIDMAN, M. J.; HUNTER, J. A. A. Hepatotoxicity of sodium stibogluconate therapy for cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 342, p. 238-239, 1993.

HOESEL, L., FLIERL, M., NIEDERBICHLER, A., RITTIRSCH, D., MCCLINTOCK, S., REUBEN, J., PIANKO, M., STONE, W., YANG, H., SMITH, M., SARMA, J., WARD, P. Ability of antioxidant liposomes to prevent acute and progressive pulmonary injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 5, p. 973-981, 2008.

HOPE, M. B., BALLY, L. D., MAYER, A. S., CULLIS, P. R. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 40, n. 2-4, p. 89-95, 1986.

HSU, P. C., LIU, M. Y., HSU, C. C., CHEN, L. Y., GUO, Y. L. Effects of vitamin E and C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, v. 127, n. 3, p. 169-179, 1998.

HUNTER, D. G., FRISKEN, B. J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 6, p. 2996-3002, 1998.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies – S3A. Geneva: 1994b.** Disponível em: < <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA495.pdf> >. Acesso em: 11 jun. 2011.

IQBAL, K., KHAN, A., KHATTAK, M. M. A.K. Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health – A Review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 5-13, 2004.

JOUSMA, H., TALSMA, H., SPIES, F., JOOSTEN, J.G.H., JUNGINGER, H.E., CROMMELIN, D. J. A. Characterization of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers. **International Journal Pharmaceutics**, v. 35, n. 3, p. 263-274, 1987.

JÚNIOR, A. D., C., COELHO, L. G. V., OLIVEIRA, M. C. Acute Toxicity Study of Cisplatin Loaded Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Administered in Mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 1-11, 2011.

KERR, M. G. *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical biochemistry and haematology.* Oxford: Brackwell Scientific, 1989.

KIRK R., SATI, M. H. Notes on some cases of Sudan kala-azar treated with 4:4-diamidinostilbene. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, p. 34-83, 1940.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Casarett & Doull's: Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos**. Compêndio, 5 ed., Portugal: Mc Graw-Hill, 2001.

KLAASSEN, C.D. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: GOODMAN & GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 11 ed, 2006.

KLIBANOV, A. L., MARUYAMA, K., TORCHILIN, V. P., HUANG, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 268, n. 1, p. 235-237, 1990.

KRACHLER, M., ZHENG, J., KOERNER, R., ZDANOWICZ, C., FISHER, D., SHOTYK, W. Increasing atmospheric antimony contamination in the northern hemisphere: snow and ice evidence from Devon Island, Arctic Canada. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 7, n. 12, p. 1169-1176, 2005.

KRAMER, J. W., HOFFMAN, W. E. Clinical Enzymology. In: KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. California: Academic Press, p. 303-325, 1997.

LACERDA-JÚNIOR, F. S.; FERMINIANI, H.; MOTA, C. C. S.; BARANSKI, M. C. Estudo comparativo das alterações electrocardiográficas determinadas pelo tratamento com antimoniais tri e pentavalentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 7, p. 210-217, 1965.

LACOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2 ed, Kluwer Academic/Plenum Press, New York, 1999.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends In Biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 307-321, 1998.

LAWTON, J. M., CONWAY, L. T., CROSSON, J. T., SMITH, C. L., ABRAHAM, P. A., Acute Oxalate Nephropathy After Massive Ascorbic Acid Administration. **Archives of Internal Medicine**, v. 145, p. 950-951, 1985.

LAZZARINI, M., SALUM, C., DEL BEL, E. A. Combined treatment of ascorbic acid or alpha-tocopherol with dopamine receptor antagonist or nitric oxide synthase inhibitor potentiates cataleptic effect in mice, **Psychopharmacology**, v. 181, n. 1, p. 71-79.

LEITE, E. A., GIUBERTI, C. S., WAINSTEIN, A. J. A., WAINSTEIN, A. D. L., COELHO, L. G. V., LANA, A. M. Q., SAVASSI-ROCHA, P. R., OLIVEIRA, M. C. Acute Toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin in mice after intraperitoneal administration. **Life Sciences**, v. 84, p. 641-649, 2009.

LEITE, E. A., LANA, A. M. Q., JÚNIOR, A. D., C., COELHO, L. G. V., OLIVEIRA, M. C. Acute Toxicity Study of Cisplatin Loaded Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Administered in Mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 1-11, 2011.

LIGADE, V.; SREEDHAR, D.; AJAY, M.; UDUPA, N. Nanotechnology in cosmeceuticals: benefits vs risks. **Current Science**, v. 93, n. 5, p. 597-597, 2007.

LIMA, E. B. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LIMA, V.R., MORFIM, M.P., TEIXEIRA, A., CRECZYNSKI-PASA, T.B. Relationship between the action of reactive oxygen and nitrogen species on bilayer membranes and antioxidants. **Chemistry and Physical Lipids**, v. 132, n. 2, p. 197-208, 2004.

LOOMIS, M.D., HAYES, A.W. Loomis essentials of toxicology. 4 ed. California: academia press, 1996.

LOWELL, J. A. Some notes on Linus Pauling. **Nutrition Forum**, v. 2, p. 33-36, 1985.

LUGO, Y., AÑEZ, N., PETIT, P. Y., MURGUERA, J. L., BURGUERA, M. Antimony determination in tissues and serum of hamsters infected with *Leishmania garnhami* and treated with meglumine antimoniate. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 37-41, 1994.

MAÇAO, L.B., WILHELM FILHO, D., PEDROSA, R.C., PEREIRA, A., BACKES, P., TORRES, M. A., FRODE, T. S. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. **International Journal of Cardiol**, v. 123, n. 1, p. 43-49, 2007.

MACIEL, N. R., REIS, P. G., KATO, K. C., VIDAL, A. T., GUIMARAES, H. N., FRÉZARD, J. J. F., SILVA-BARCELLOS, N. M., GRABE-GUIMARÃES, A. Reduced cardiovascular alterations of tartar emetic administered in long-circulating liposomes in rats. **Toxicology Letters**, v. 199, n. 3, p. 234-238, 2010.

MAY J.M., QU Z., LI X. Requirement for GSH in recycling of ascorbic acid in endothelial cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 7, p. 873-881, 2001.

MAYER, L. D., HOPE, M. J., CULLIS, P. R., JANOFF, A. S. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 817, n. 1, p. 193-197, 1985.

McCALLUM, R. I. Antimony in medical history. **Pentland Press**, p. 48-70, Edinburgh, 1999.

MEYER, O.; SVENDSEN, O. Animal Models in Pharmacology and Toxicology. In: HAU, J.; VAN HOOSIER, G. L. **Handbook of laboratory animals science**, 2. ed., 2003.

MIEKELEY, N., MORTARI, S.R., SCHUBACH, A.O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, n. 3, p. 495-502, 2002.

MILLER, O. Bioquímica do Sangue - Substâncias não eletrolíticas. In: MILLER, O., GONÇALVES, R. R. **Laboratório para o Clínico**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, p. 3-31, 1999.

MONNARD, P. A., OBERHOLZER, T., LUISI, P. L. Encapsulation of polynucleotides in liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1329, p. 39-50, 1997.

MORTARI, Sérgio Roberto. Determinação da concentração total do antimônio e de suas espécies químicas em amostras clínicas de pacientes com leishmanioses. Tese (Doutorado). Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2001.

MORTON, D. M. Importance of species selection in drug toxicity testing. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 102-103, p. 545-550, 1998.

MOSTAFA, G.A.E. Development and characterization of ion selective electrode for the assay of antimony. **Talanta**, v. 71, n.4, p. 1449-1454, 2007.

MOTTRAM, J. C., COOMBS, G.H. Leishmania mexicana: enzyme activities of amastigotes and promastigotes and their inhibition by antimonials and arsenicals. **Experimental Parasitology**, v. 59, n. 2, p. 151-60, 1985.

MULLER, S., MILLER, W. H., DEJEAN, A. Trivalent antimonials induce degradation of the PML-RAR α oncoprotein and reorganization of the promyelocytic leukemia nuclear bodies in acute promyelocytic leukemia NB4 cells. **Blood**, v. 92, n.11, p.4308-4316, 2008.

NANDI D., PATRA R.C., SWARUP D. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. **Toxicology**, v. 211, n. 1, p. 26-35, 2005.

NAYAR R., HOPE M. J., CULLIS P. R. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 986, n. 2, p. 200-206, 1989.

OLIVEIRA NETO, M.P., MATTOS, M., PIRMEZ, C., FERNANDES, O., GOLÇALVES-COSTA, S. C., SOUZA, C. F. S., GRIMALDI JÚNIOR, G. Mucosal leishmaniasis ("espundia") responsive to low dose of n-methyl glucamine (Glucantime R) in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, 2000.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 420**. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 425**. Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

OWENS JÚNIOR, R. C., NOLIN, T. D. Antimicrobial-associated QT interval prolongation: pointes of interest. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 12, p. 1603-1611, 2006.

PADAYATTY, S., J., LEVINE, M. Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: emerging evidence, open minds and serendipity. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n. 4, p. 423-425, 2005.

PAL, S., RAVINDRAN, R., ALI, N. Combination therapy using sodium antimony gluconate in stearylamine-bearing liposomes against established and chronic *Leishmania donovani* infection in BALB/c mice. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3591-3593, 2004.

PATEL, H. M. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 9, n. 1, p. 39-90, 1992.

PODMORE, I. D., GRIFFITHS, H. R., HERBERT, K. E., MISTRY, N., MISTRY, P., LUNEC, J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 559, 1998.

POON, R., CHU, I., LECAVALIER, P., FOSTER, W., GUPTA, S., THOMAS, B. Effects of antimony on rats following 90-day exposure via drinking water. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 1, p. 21-35, 1998.

PRASAD, K., KUMAR, A., KOCHUPILLAI, V., COLE, W. C. High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 1, 1999.

PREMKUMAR, K., BOWLUS, C. L. Ascorbic Acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 542, n. 1-2, p. 99-103, 2003.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**, v.43, n.2, p.86-101, 1998.

QAZILBASH, M.H., SALIBA, R.M., NIETO, Y., PARIKH, M., KHAN, F. B., JONES, R. B., HOSING, C., MENDONZA, F., WEBER, D. M. WANG, M., POPAT, U., ALOUSI, A., ANDERLINI, P. CHAMPLIN, R. E., GIRALT, S. Arsenic Trioxide with Ascorbic Acid and High-Dose Melphalan: Results of a Phase II Randomized Trial. **Biology of blood and marrow transplantation**, v. 14, n. 12, p. 1401-1407, 2001.

RANA, S. V. S. Ascorbic acid protection against arsenic induced oxidative stress. **Toxicology Letters**, v. 164, n.1, p. 187-188, 2006.

RATH, S., JARDIM, W.F., DÓREA, J.G. A simple spectrophotometric procedure for the determination of antimony (III) and (V) in antileishmanial drugs. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 358, n. 4, p. 548-550, 1997.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da Arte. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIS, P. G., ABREU, A. T., GUIMARÃES, A. G., TEIXEIRA, M. C., DE SOUZA, J., SILVA-BARCELLOS, N. M. Development and validation of an analytical method for quantification of arsenic and antimony in liposomes using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 4, 2013.

REIS, Priscila Gomes. Toxicidade do arsênio e do antimônio trivalentes: influência da encapsulação em lipossomas e da associação com ácido ascórbico. Dissertação (Mestrado). Escola de Farmácia, Cipharma, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2010.

RENEDO, O.D., MARTÍNEZ, M.J.A. Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. **Analytical Chimica Acta**, v. 589, n. 2, p. 255-260, 2007.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guideline for Testing of Chemicals, OECD 423**. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. M. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780., 2004.

RIBEIRO, A. L. P.; DRUMMOND, B.; VOLPINI, A. C.; ANDRADE, A. C.; PASSOS, V. M. A. Electrocardiographic Changes During Low-Dose, Short-Term Therapy of Cutaneous Leishmaniasis with the Pentavalent Antimonial Meglumina. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 3, p. 297-301, 1999.

ROBERTS, W. L., MCMURRAY, W. J., RAINEY, P.M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimoniate (glucantime). **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1076-1082, 1998.

RODRIGUES, M. L. O., COSTA, R. S., SOUZA, C. S., FOSS, N. T., ROSELINO, A. M. F. Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime®) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 1, p. 33, 1999.

ROSALKI, SB E MCINTYRE, N EM BIRCHER, J, BENHAMOU, JP et al. Oxford **Textbook of Clinical Hepatology**, Oxford Medical Publications, 1999.

SAMPAIO, R. N.; MARSDEN, P. D. Treatment of the mucosal form of leishmaniasis without response to glucantime, with liposomal amphotericin B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 2, p. 125-128, 1997.

SCHETTINI, D. A., COSTA VAL, A. P., SOUZA, L. F., DEMICHELI, C., ROCHA, O.G. F., MELO, M. N., MICHALICK, M. S. M., FRÉZARD, F. Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n.2, p. 269-272, 2003.

SCHETTINI, D.A., COSTA VAL, A.P., SOUZA, L. F., DEMICHELI, C., ROCHA, O. G., MELO, N. M., MICHALICK, M. S., FRÉZARD, F. Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 12, p. 1879-1883, 2005.

SCHETTINI, D.A., RIBEIRO, R.R., DEMICHELI, C., ROCHA, O. G., MELO, N. M., MICHALICK, M. S., FRÉZARD, F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **International journal of pharmaceutics**, v. 315, n. 1-2, p. 140-147, 2006.

SERENO D, CAVALEYRA M, ZEMZOUMI K, MAQUAIRE S, OUAISSI A, LEMESRE JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 12, p. 3097-102, 1998.

SINGH, S., RANA, S.V.S. Amelioration of arsenic toxicity by L-ascorbic acid in laboratory rat. **Jornal of Environmental Biology**, v. 28, n. 2, p. 377-384, 2007.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.10, n. 6, p.307-315, 2004.

SOHINI; RANA, S. V. Protective effect of ascorbic acid against oxidative stress induced by inorganic arsenic in liver and kidney of rat. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, n. 4, p. 371-375, 2007.

SOLTANINEJAD, K., ABDOLLAHI, M. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review, **Medical Science Monitor**, v. 15, n. 3, p. 75-90, 2009.

STAMMATI, A.; COMBES, R. D.; SLADOWSKI, D.; VAN DER VALK, J.; BLAAUBOER B. J. Thirteenth International Workshop on In Vitro Toxicology. **Toxicology In Vitro**, v. 19, n.7, 843-844, 2005.

TEIXEIRA, A., MORFIM, M. P., CORDOVA, C. A. S., CHARÃO, C. C. T., LIMA, V. R., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbys radicals and by peroxynitrite. **Journal of Pineal Research**, v. 35, n. 4, p. 1-7, 2003.

TEMPONE, A. G., PEREZ, D., RATH, S., VILARINHO, A. L., MORTARA, R. A., DE ANDRADE, H.F. Jr. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 60-68, 2004.

THANABHORN, S.; JAIJOY, K., THAMAREE, S., INGKANINAN, K., PANTHONG, A., Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Locinera japonica* Thunb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 370-373, 2006.

THRALL, M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Roca: São Paulo, 2007.

TIWARI, K.K., MUNDHARA, G.L., RAI, M.K.; GUPTA, V.K. A simple and sensitive analytical method for the determination of antimony in environmental and biological samples. **Analytical Sciences**, v. 22, n. 2, p. 259-262, 2006.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature.**, v.14, p. 45-160, 2005.

TREVAN, J. The error of determination of toxicity. **Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences**, v. 101B, p. 483-514, 1927.

TRIVELIN, L.A., ROHWEDDER, J.J.R., RATH, S. Determination of pentavalent antimony in antileishmaniotic drugs using an automated system for liquid-liquid extraction with on-line detection. **Talanta**, v. 68, n. 5, p. 1536-1543, 2006.

UHUMWANGHO, M. U., OKOR, R.S. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. **Journal of Medicine and Biomedical Research**, v. 4, n. 1, p. 9-21, 2005.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VALE-CARDOSO, A.S.; GUIMARÃES, H.N. The effect of 50/60 Hz notch filter application on human and rat ECG recordings. **Physiological Measurement**, v. 31, n. 1, p.45-58, 2010.

VALLADARES, J.E., ALBEROLA, J., ESTEBAN, M., ARBOIX M. Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. **Veterinary Record**, v. 138, n. 8, p. 181-183, 1996.

VAN DEN HEUVEL, M. J.; CLARK, D. G.; FIELDER, R. J.; KOUNDAKJIAN, P. P.; OLIVER, G. J. A.; PELLING, D.; TOMLINSON, N. J.; WALKER, A. P. The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n.8, p. 469-482, 1990.

VASCONCELOS, S. M. L., GOULART, M. O. F., MOURA, J. B. F., MANFREDINI, V., BENFATO, M. S., KUBOTA, L. T. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 2007.

VEIGA, J. P. R.; KHANAM, R.; ROSA, T. T., JUNQUEIRA Jr., L. F.; BRANT, P. C.; RAICK, A. N., FRIEDMAN, H.; MARSDEN, P. D. Disfunção tubular renal em ratos tratados com antimoniais pentavalentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 304-309, 1990.

VIANNA, G. Comunicação à Sociedade Brasileira de Dermatologia. **Arquivo Brasileiro de Medicina**, v. 2, p. 426, 1912.

VIDAL, Alessandra Teixeira. Avaliação da atividade cardioprotetora da piridostigmina veiculada em lipossomas. Dissertação (Mestrado). Escola de Farmácia, Cipharma. Universidade Federal de Ouro Preto, 2009.

WEBER, P. BENDICH, A, SCHALCH, W. Vitamin C and human health: a review of recent data relevant to human requirements. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 66, n. 1, p. 19-30, 1996.

WILLARD, M., TVEDTEN, H., TURNWALD, G. H. Diagnóstico clínico patológico em los animais pequenos. Buenos Aires, Intermedica, 1993.

WOODLE, M. C. Sterically stabilized liposome therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n.2-3, p. 249-256, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS; Thirty-second report, WHO, **Technical Report Series**, no.823, Geneva, 1992.

ZHENG, J., IJIMA, A., FURUTA, M. Complexation effect of antimony compounds with citric acid and its application of antimony (III) and (V) using HPLC-ICP-MS. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 16, n. 8, p. 812-818, 2001.

ANEXO

Cardina Aicio



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 2011/53, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Avaliação da toxicidade aguda do antimônio trivalente: formas livre ou lipossomal associadas ou não à administração de ácido ascórbico*", que tem como responsável a Profa. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em agosto de 2013.

Ouro Preto, 20 de julho de 2011.

**Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Coordenadora da CEUA-UFOP**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29

35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil

Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370

Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 2012/08 do projeto, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Avaliação da toxicidade aguda do antimônio trivalente: Formas livres ou lipossomal associadas ou não à administração de Ácido Ascórbico - Certificação de dados*", que tem como responsável a Profa. Dra. Neila Márcia Silva Barcelos foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em 31/8/2013.

Ouro Preto, 20 de abril de 2012.

Prof. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Coordenadora da CEUA-UFOP