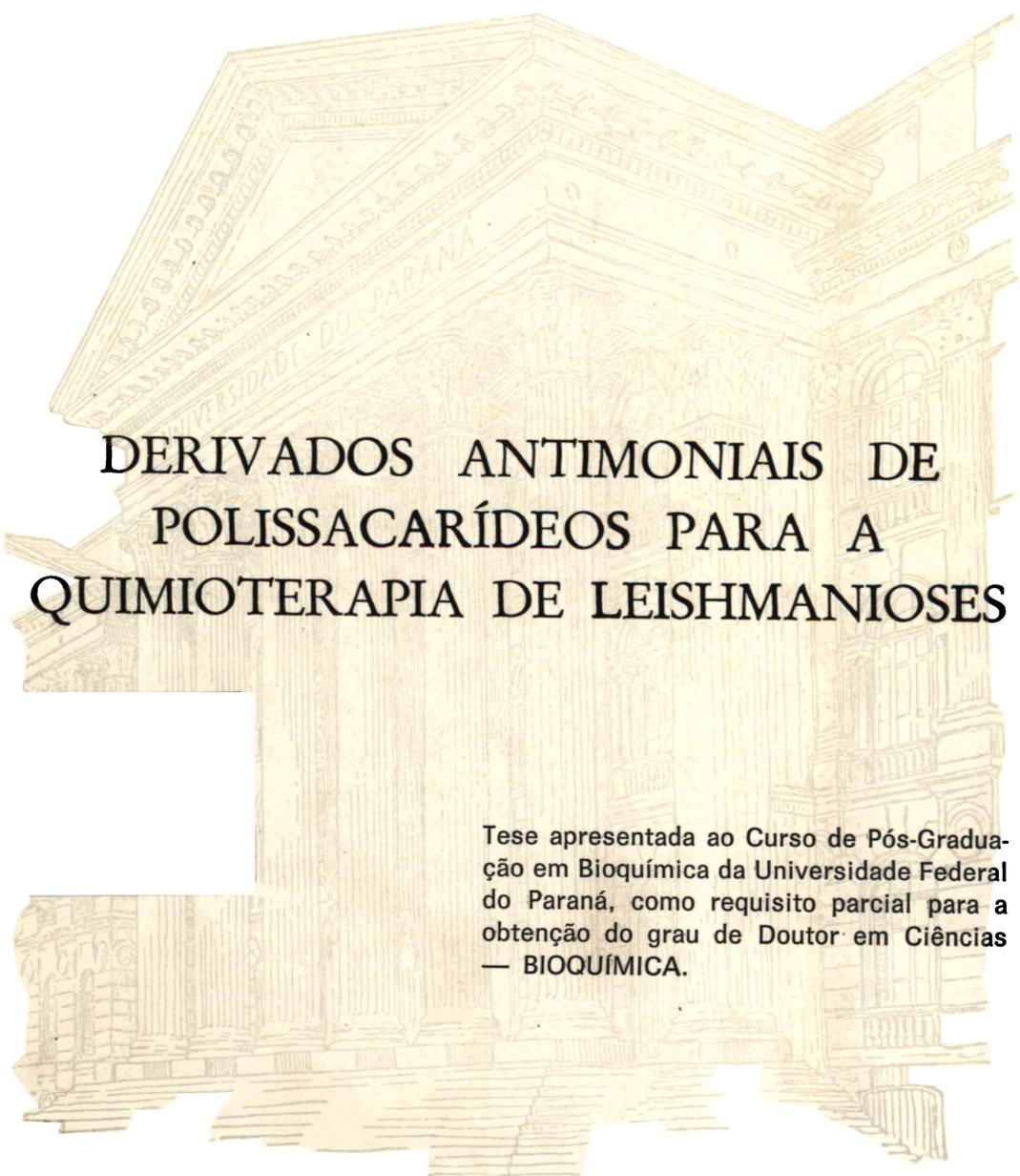


GENY APARECIDA CANTOS



DERIVADOS ANTIMONIAIS DE
POLISSACARÍDEOS PARA A
QUIMIOTERAPIA DE LEISHMANIOSES

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências — BIOQUÍMICA.

CURITIBA
1992

GENY APARECIDA CANTOS

DERIVADOS ANTIMONIAIS DE
POLISSACARÍDEOS PARA A
QUIMIOTERAPIA DE LEISHMANIOSES

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências — BIOQUÍMICA.

CURITIBA
1992

Orientadores : Prof. Dr. Philip Albert James Gorin

Prof. Marcello Iacomini

**Aos meus filhos
Rodrigo e Luciana
com ternura.**

GENY APARECIDA CANTOS

DERIVADOS ANTIMONIAIS DE POLISSACARÍDEOS
PARA A QUIMIOTERAPIA DE *LEISHMANIOSES*

Tese aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor no
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica
pela Comissão formada pelos
Professores:

Orientador: Prof. Philip Albert James Gorin
UFPR

Prof. Helio Takahashi
EPM

Profa. Fany Reicher
UFPR

Profa. Maria de Lourdes Petrillo Peixoto
UFRJ

Prof. Paulo de Souza Mourão
UFRJ

Curitiba, 06 de novembro de 1992

ERRATA

PAG/PARÁGRAFO	ONDE DE LÊ	LEIA-SE
p.22, 1ª linha	septecemias	septicemia
p.22, 1ª linha	atualmente tem sido utilizada	foi utilizada
p.24, 2º par.	Lúcia Clara	Clara Lúcia
p.40, 2º par.	catiônica	aniônica
p.40, último par.	sulfatada	substituída
p.43, 1º par.	granulamos	granulomas
p.45, 1º par.	3,0 mg/ml	5.0 mg/ml
p.47, último par.	0,9.16.23.30.37 e 44	0,11.22 e 33
p.48, 1º par.	peculiaridade	peculiaridade
p.49, 2º par.	possibilitou	poderia possibilitar
p.60.68.73 e 80 Título	Em manana	nas unidades de manose em manana
p.61, 2º par., 4ª L.	redutores	não-redutores
p.61, 2º par., 10ª L.	70.2	72
p.88, penúltimo par.	3,0 mg/ml	5.0 mg/ml
p.93, 2º par.	maiores	menores
p.98, fig. 11	DIAS	HORAS

NOTA: Insere-se o seguinte parágrafo, após a 2ª linha da pág. 31: "O polissacarídeo foi dissolvido num mínimo de água possível e o material insolúvel foi centrifugado e desprezado. O sobrenadante foi adicionado a uma quantidade igual de solução de Fehling, liberando a formação de um precipitado insolúvel".

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. Philip A. J. Gorin e Dr. Marcello Iacomini, pela orientação e amizade que tornaram, só assim, possível a realização desta tese.

Aos Professores L.R. Travassos do Departamento de Biologia Celular e Clara Lúcia Barbieri Mestriner do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina pelos testes biológicos realizados das drogas preparadas.

Á minha família, em especial, à minha mãe, Maria Aparecida Cantos, pela colaboração nas mais diversas situações.

Ao amigo Roberto Pontarolo pela discussão dos mecanismos de reação deste trabalho e pela grande amizade.

As amigas Maria Helena Machado Guerreiro, Maria de Lourdes C. Custódio da Silva e Marcia Mendonça pela amizade e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Nereu Jacintho Mello de Souza pela grande amizade e toda forma de colaboração, ao longo manifestada.

Ao CEFET-UNED-Medianeira, pelo apoio no término deste trabalho.

Ao colega Ilson Sussumo Mogari e Dalton Tadeu dos Santos pela ajuda na confecção de gráficos e a Prof. Elizeth Gomes Herlein pela correção gramatical dos textos.

Aos colegas Antonio Sérgio Diel e Anésio Boger Brand.

pela parte computacional deste trabalho.

As Professoras Fany Reicher e Maria Eugénia Rabello Duarte pelas correções e sugestões dadas nesse trabalho.

Ao Professor Jayme Neves, da Faculdade de Medicina de Minas Gerais - Belo Horizonte, pela Tese intitulada "Tratamento da Leishmaniose Visceral Americana pelo antimoniato de N-metil glucamina, que gentilmente me enviou-a, sendo a mesma de grande importância nos manuscritos desse trabalho.

Ao curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos e ao Departamento de Química da UFPR e a TECPAR pelo apoio nas análises quantitativas.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPR, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

A equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas pela assistência.

À CAPES pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	29
1. Equipamentos e métodos analíticos	29
2. Preparação de manana a partir de levedura de panificação	30
3. Preparação de manana levedura O-substituídas com grupos ácidos e básicos	31
3.1. CM-man	31
3.2. Ésteres sulfato de manana	32
3.3. Ésteres fosfato de manana	32
3.4. DEAE-man	33
4. Determinação dos substituintes nos derivados de manana	33
4.1. Determinação do DS do grupo CM em manana	33
4.1.1. Método do sal de cobre	33
4.1.2. Método do sal de sódio	34
4.1.3. Método de lavagem ácida seguido por titulação	35
4.1.4. Método do tratamento da resina catiónica fortemente ácida, seguido por titulação	35

4.1.5. Método utilizando-se nitrato de uranila	35
4.2. Determinação do DS do grupo sulfato em manana	36
4.2.1. Método do tratamento de resina catiônica fortemente ácida, seguido por titulação	36
4.2.2. Método utilizando-se a precipitação do sulfato de bário	37
4.2.3. Método turbidimétrico	38
4.3. Determinação do DS do grupo fosfato em manana	38
4.3.1. Método espectrofotométrico sulfomolibdico	38
4.3.2. Método do tratamento da resina catiônica fortemente ácida, seguido por titulação	39
4.3.3. Método espectrofotométrico molibdovanadato	39
4.4. Determinação do DS do grupo DEAE em manana	40
4.4.1. Método do tratamento da resina aniônica fortemente básica, seguido por titulação	40
5. Complexos de manana e mananas substituídas com antimônio	40
6. Análise do conteúdo de antimônio dos polissacarídeos assim complexados	41
6.1. Método espectrofotométrico	41
6.2. Método por titulação com tiosulfato de sódio	42
7. Testes biológicos <i>in vitro</i>	42
7.1. Obtenção de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>(Leishmania) amazonensis</i>	42
7.2. Obtenção de macrófagos perifoneais de camun- dongos	43
7.3. Infecção de macrófagos com <i>Leishmania (L.)</i> <i>amazonensis</i>	43

7.4	Preparo da solução de Man-Sb e seus derivados.	44
7.5	Determinação da atividade leishmanicida dos complexos de Man-Sb e seus derivados de macrófagos peritoniais infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	44
7.6.	Testes de toxicidade de Man-Sb e Glucantime <i>in vitro</i>	45
7.7.	Atividade leishmanicida de Man-Sb em presença de manana e manose	46
7.8.	Atividade leishmanicida do complexo Man-Sb <i>in vivo</i>	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO		
1.	Introdução	48
2.	Preparação da manana a partir de levedura de panificação	50
3.	CM-man	51
3.1.	Preparação do derivado CM-man	51
3.2.	Determinação do DS	52
3.2.1	- Método do sal cúprico	52
3.2.2	- Método do sal de sódio	56
3.2.3	- Método da lavagem ácida seguido por titulação	57
3.2.4	- Método da resina catiônica fortemente ácida seguido por titulação	57
3.2.5	- Método do nitrato de uranila	59

3.3.	Determinação da distribuição dos substituintes CM em manana	60
4.	Ester sulfato de manana	64
4.1.	Preparação do sulfato de manana	64
4.2.	Determinação do DS dos grupos sulfatados em manana	66
4.2.1	- Método utilizando a precipitação do sulfato de bário	66
4.2.2	- Método da resina catiónica fortemente ácida seguido por titulação	67
4.2.3	- Método turbidimétrico	67
4.3.	Determinação da distribuição dos substituintes sulfatados em manana	68
5.	DEAE-manana	
5.1.	Preparação do DEAE-manana	70
5.2.	Determinação do DS dos grupos DEAE em manana	70
5.3.	Determinação dos substituintes DEAE na manana	73
6.	Esteres fosfatos de manana	74
6.1.	Preparação do derivado fosfato de manana	74
6.2.	Determinação do DS dos grupos fosfatos em manana	77
6.2.1	- Método da resina catiónica fortemente ácida seguido por titulação	77
6.2.2	- Método espectrofotométrico molibdovanadato	78
6.2.3	- Método espectrofotométrico sulfomolibdico	78

6.3. Determinação da distribuição substituintes fosfatos na manana	80
7. Reação da manana e seus derivados com antimônio	80
8. Análise do conteúdo de antimônio dos polissacac- rídeos complexados	83
8.1. Método espectrofotométrico	83
8.2. Método da titulação	84
9. Testes de atividade biológica	87
9.1. Obtenção de culturas de macrófagos e de formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	87
9.2. Determinação da atividade leishmanicida da Man-Sb e seus derivados sobre os macrófagos peritoniais de camundongos albinos infetados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	88
9.3. Cinética da ação de diferentes concentrações de Man-Sb sobre macrófagos peritoniais de camundongos infetados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	90
9.4. Efeito leishmanicida de Man-Sb em presença de manana e manose	92
9.5. Efeito <i>in vivo</i> de Man-Sb sobre as lesões de pata de hamster infetados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	92
Conclusões	100
Referências Bibliográficas	102

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela I - Determinação do DS dos grupos CM em vários derivados de manana usando diferentes métodos	58
Tabela II - Determinação do DS dos grupos sulfatos em derivados sulfatados de manana	69
Tabela III - Determinação do DS do grupo DEAE em manana pelo método da resina catiónica fortemente básica	75
Tabela IV - Determinação do DS dos grupos fosfatos em derivados fosforilados de manana	79
Tabela V - Determinação do conteúdo de antimônio com manana e mananas substituídas pelo método e espectrofotométrico	85
Tabela VI - Determinação do conteúdo de antimônio no complexo de Man-Sb e Man-Sb substituídas	86
Tabela VII - Resposta <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais de camundongo albinos infetados com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> com Man-Sb e seus derivados complexados com antimônio	89
Tabela VIII- Tratamento das lesões da pata de hamster com Man-Sb e Glucantime	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura química da manana	53
Figura 2	- a) Titulação de uma solução acidificada de nitrato de cobre a 1% com uma solução de hidróxido de sódio 0,8 M	55
	- b) Titulação de uma solução acidificada de nitrato de cobre e CM-man de sódio com uma solução de hidróxido de sódio 0,8 M	55
Figura 3	- A) Representação esquemática da estrutura química de manana	62
	- B) Espectro ^{13}C -n.m.r de manana	62
Figura 4	- Espectro ^{13}C -n.m.r de CM-man	63
Figura 5	- Espectro IV de manana e manana sulfatada	71
Figura 6	- Espectro ^{13}C -n.m.r de manana sulfatada	72
Figura 7	- Espectro ^{13}C -n.m.r de DEAE-man	76
Figura 8	- Espectro ^{13}C -n.m.r de Fosf-man	81
Figura 9	- a) Macrófagos peritoniais de camundongo infetados com formas amastigotas de <i>L.</i> <i>(L.) amazonensis</i> 2 dias após a infecção.	
	- b) Macrófagos peritoniais de camundongos infetados com formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após 3 dias de tra- tamento com Man-Sb 500mg/ml (4,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Sb)	97
Figura 10	- Tratamento de macrófagos peritoniais com	

diferentes concentrações de Man-Sb 97

Figura 11 - Inibição do efeito leishmanicida de Man-Sb
pelo aumento da concentração de manana 98

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SMF	- Sistema monocítico fagocitário
¹³C-n.m.r.	- Ressonância nuclear magnética de carbono-13
CM	- Carboximetil
DEAE	- Dietilaminoetil
Man-Sb	- Complexo de antimônio com manana
DEAE-man	- Manana com grupos de dietilaminoetil
CM-man	- Manana com grupos de carboximetil
Fosf-man	- Manana com grupos de fosfato
Sulfato-man	- Manana com grupos de sulfato
DEAE-man-Sb	- Complexo de antimônio com manana substituída com grupos dietilaminoetil
CM-man-Sb	- Complexo de antimônio com manana substituída com grupos de carboximetil
Fosf-man-Sb	- Complexo de antimônio com manana substituída com grupos de fosfato
Sulfato-man-Sb	- Complexo de sulfato com manana substituída com grupos de sulfato
FCS	- Soro fetal de bezerro
PBS	- Tampão fosfato salino
TMS	- tetrametilsilano
UV-vis	- Ultra-violeta região visível
IV	- Infravermelho
DS	- Grau de substituição
g.l.c.-m.s.	- cromatografia líquida gasosa e espectrometria de massa
RPMI	- um meio sintético fabricado por GIBCO BRL

RESUMO

Complexos antimoniais pentavalentes de manana de levedura e de mananas substituídas com vários grupos ácidos e básicos foram preparados com o objetivo de aperfeiçoar o tratamento de leishmanioses geralmente realizado com derivados de Sb^{V} por analogia com o N-metil glucamine (Glucantime) e o gluconato de sódio (Pentostan).

A manana de levedura preparada a partir da levedura de panificação (2 % de rendimento) foi substituída com grupos carboximetil (CM), sulfato, fosfato e dietilaminoetil (DEAE) com um DS de aproximadamente 0,25. Esses DS foram considerados como ótimos para preparação dos derivados e para complexação com Sb^{V} . Foram feitas investigações utilizando um número variável de métodos a fim de pesquisar os DS.

A metodologia utilizada para saber se cada derivado foi adequado para complexação com antimônio e para conhecer a distribuição de cada substituinte entre os grupamentos hidroxilas disponíveis da manana foi, fundamentalmente, espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. Foi utilizada em alguns casos a espectroscopia IV.

A manana de levedura e seus derivados foram complexados com Sb^{V} utilizando pentacloreto de antimônio V, na presença de bicarbonato de sódio aquoso, seguido pela precipitação com metanol ou pela remoção de sais por diálise. Os precipitados metanólicos (sais de sódio) foram os mais adequados para os

testes seguintes pois que eles continham um maior conteúdo de Sb^V (aproximadamente 3 %). Dois diferentes métodos foram empregados para estimar o conteúdo de Sb^V .

Testes biológicos foram realizados *in vitro* com macrófagos de camundongos infetados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Derivados de Sb^V de mananas substituídas foram muito ativos contra os protozoários, mas também foi observado, em alguns casos, concomitantemente uma destruição de macrófagos. A eficiência de destruição dos amastigotas intracelulares *in vitro*, foi 3 vezes maior quando se utilizou Man-Sb comparado ao Glucantime, utilizando-se a mesma concentração de Sb nos dois compostos.

Em testes feitos *in vivo* em patas de hamsters infetados com *L. (L.) amazonensis*, tratados com Man-Sb, as lesões diminuíram, depois de 20 dias, com uma eficiência 160 vezes maior que o tratamento com Glucantime.

Estudos recentes *in vitro* foram realizados utilizando sais de potássio do complexo Sb^V de manana de levedura que é mais solúvel em água que em sal de sódio e que pode conter uma taxa mais alta de antimônio e possivelmente deveria levar uma atividade biológica maior. Entretanto, nenhuma atividade biológica foi observada, provavelmente, devido a dissociação do complexo Man-Sb em água para formar manana e antimoniato.

ABSTRACT

Pentavalent antimony complexes of yeast mannan and mannan substituted with various acid and basic groups were prepared with the objective of improving the treatment of leishmanioses, generally effected with Sb^V derivatives of N-methyl-glucamine (Glucantime) and sodium gluconate (Pentostan).

Yeast mannan, prepared from baker's yeast (2 % yield) was substituted with carboxymethyl (CM), sulfate, phosphate, and diethylaminoethyl (DEAE) groups, and conditions perfected for preparation of derivatives with a DS of 0.25, considered optimum for complexation with Sb^V . Investigations were carried out using a number of methods in order to determine the DS's.

In order to find whether each derivative was suitable for complexation with Sb^V , the distribution of each substituent among the available hydroxyl groups of mannan was determined principally by the use of ^{13}C -n.m.r. spectroscopy. In some cases, infrared spectroscopy were used.

Yeast mannan and its derivatives were complexed with Sb^V using antimony pentachloride in the presence of aqueous sodium bicarbonate followed by precipitation with methanol, or by removal of salts by dialysis. The methanol precipitates (Na salts) were found to be more suitable for the following tests since they had a higher content of Sb^V (ca 3 %). Two different methods were employed for the estimation of Sb^V .

Biological tests were carried out *in vitro* with mouse macrophages infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Antimony^v derivatives of substituted mannans were highly active against the protozoans, but concomitant destruction of macrophages was observed. The destruction efficiency of the intracellular amastigotes *in vitro* was 3 times greater using Man-Sb than with Glucantime, at the same concentrations of Sb.

In *in vivo* tests carried out on the pads of hamsters infected with *L. (L.) amazonensis* and treated with Man-Sb, the lesions diminished, after 20 days, by a factor 160 greater with an effectiveness 160 times than that of Glucantime. Very recent *in vitro* tests were carried out using the potassium salt of the Sb^v complex of bakers yeast mannan, which is more soluble in water than the sodium salt, making possible a higher Sb^v content, which could lead to a greater leishmanicidal activity. However, no biological activity was observed, which is probably due to the dissociation of the Sb complex in water to form mannan and antimonate.

I - INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças do sistema monocítico fagocitário (SMF). As leishmanias existem na forma promastigota no inseto vetor e como amastigota dentro do macrófago em mamíferos. A sistemática das espécies do gênero *Leishmania* é um campo aberto a especulações e tem sido constantemente revista pelos autores, conforme citações de Neves, 1988; e Pessoa, 1977 e reunidas diferentemente conforme aspectos clínicos, epidemiológicos e bioquímicos. Algumas formas envolvem basicamente as vísceras, enquanto outras envolvem, somente, ou principalmente, a pele. Podemos, pois, resumir todas essas variedades agrupando as leishmanioses em três grupos:

1. Formas que produzem lesões exclusivamente cutâneas. É a leishmaniose cutânea, conhecida popularmente como botão do Oriente, botão do Alepo, botão de Biskra, úlcera de Bagdá, etc. Essa forma é encontrada predominantemente no sul da Rússia, na Arábia, na Itália, na Grécia e outros países do Mediterrâneo. No Brasil a maior parte dos casos de leishmanioses cutâneas é atribuída a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* principalmente na região norte. Esse tipo de leishmaniose caracteriza-se pela presença de nódulos fechados e grande número de parasitas nas lesões.

2. Formas cutâneas que podem complicar-se comprometendo as mucosas do nariz, da boca e da faringe. São designadas coletivamente por leishmanioses muco-cutâneas. Essa modalidade

no Brasil é atribuída a *L. (Viana) braziliensis* e é conhecida popularmente por espúndia ou úlcera de Bauru. Outras espécies não invasivas são responsáveis por leishmanioses conhecidas nas Guianas, no Panamá e Costa Rica como plan das florestas e no Peru, no Equador e na Colômbia como uta. Vé-se, portanto, que é uma doença das Américas. As leishmanioses deste grupo caracterizam-se por apresentarem lesões ulcerativas em que o número de parasitas é muito escasso.

3. Formas viscerais, em que os parasitas apresentam acentuado tropismo pelo SMF visceral, principalmente, do baço, do fígado e da medula óssea. É a leishmaniose visceral, conhecida, entre outros, pelos nomes de calazar (que significa febre negra), febre Dum-Dum e esplenomegalia tropical.

Embora o homem não represente um reservatório epidemiologicamente importante nas Américas na transmissão da doença (diferindo do calazar da Índia), o tratamento específico dos casos não identificados é necessário e urgente. Isso inclui também os casos assintomáticos, uma vez que o tratamento em massa, embora preconizado, é inexecutável.

Em vista da endemicidade da doença e da possibilidade de se verificarem surtos epidêmicos são óbvios os prejuízos acarretados à economia das zonas rurais de nosso país, zonas que constituem quase sempre celeiros da Nação. Outro fator que torna essas doenças importantes repousa no fato de que a leishmaniose muco-cutânea pode assumir formas muito graves, que determinam mutilações e defeitos muito sérios, muitas vezes permanentes. Essas mutilações tornam-se mais graves quando o processo se estende à faringe e à laringe,

dificultando a respiração e fonação, impedindo a alimentação, podendo levar o indivíduo à morte por caquexia ou mesmo por invasão bacteriana. Além disso, as conseqüências fazem-se sentir inclusive sobre o psiquismo, cujo semblante mutilado, torna-o repugnante, condenado a certo grau de segregação social (Rey, 1972). O calazar, por outro lado, é uma doença que leva a uma desnutrição e enfraquecimento muito grandes, acarretando inativação para o trabalho, além de um alto índice de mortalidade.

A preocupação com a terapêutica específica das leishmanioses se justifica, por razões óbvias e, até certo ponto, prende-se a adequá-la a nossa realidade, propiciando assim ao clínico das zonas endêmicas da parasitose, uma terapêutica eficiente, capaz de tratar o homem doente e certificar-se de sua cura.

Ao contrário do que se passa em certos países do Oriente, onde o tratamento da leishmaniose pode ser exclusivamente local, entre nós deve ser de maneira mais específica e enérgica. Assim, muitas drogas têm sido ensaiadas e utilizadas na terapêutica das leishmanioses, mas apenas algumas têm dado resultados satisfatórios. Entre elas, destacam-se: os antimoniais orgânicos, os arsenicais orgânicos, as diaminas aromáticas e a Anfotericina B.

O tratamento ideal de uma doença endêmica só pode ser entendido quando os produtos específicos utilizados possuam, além do valor parasiticida, uma ótima tolerância ao organismo. Por outro lado, torna-se também imprescindível que possam ser tratados em massa, ministrados via oral e possuírem baixo

custo. O que se observa, entretanto, nas leishmanioses, como em outras endemias é que a terapêutica específica da qual se dispõe, se distancia muito do ideal.

Antimoniais orgânicos

Antes do advento dos antimoniais, os métodos utilizados para o tratamento das leishmanioses consistia em raspagens e cauterizações locais com nitrato de prata, ácido, fogo, etc. (Vianna, 1914).

Embora o medicamento tenha sido indicado no século XVI com as mais diversas aplicações, como na sífilis, na lepra, na sarna e inclusive na alquimia, a popularidade desses compostos declinou nos séculos seguintes (Veronese, 1982).

Em época anterior aos antimoniais, conforme testemunho de todos os observadores, a leishmaniose visceral evoluía com índices de elevada mortalidade. Apenas uma pequena porcentagem dos casos marchava para cura espontânea (Jemma, 1918).

Em 1880, Nicolle empregou os antimoniais no tratamento da tripanosomíase africana conforme citação feita por Veronesi (1982). Decorridos 34 anos, Gaspar Vianna (1914), neste país, empregou o tartarato duplo de antimônio e potássio (Tártaro Emético; I) na leishmaniose tegumentar americana, induzindo pesquisadores a experimentar o produto estibiado no calazar infantil.

O histórico das mais importantes aplicações terapêuticas, ou seja, o de seu valor curativo na leishmaniose visceral, inicia-se em 1915 com dois discípulos do Professor Jemma (Nápoles), di Cristina & Caronia. Estas descobertas

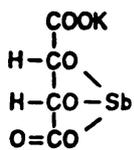
encaminharam os cientistas para o problema terapêutico da leishmaniose, confirmando as pesquisas iniciais sem aduzir qualquer outro problema ao critério de cura.

Entre os trabalhos mais expressivos mereceram a citação os de Castellani (1915), Roger (1915), Longo (1917), Muir (1917), Brahmajari (1917 e 1923) e outros. Iniciou-se, assim, a época quimioterápica da leishmaniose, ressaltando a importância do antimônio, que passou a merecer o título de medicamento específico, tanto para medicação humana como para medicação veterinária.

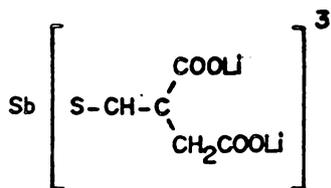
O Tártaro Emético, apesar de sua excelente ação parasiticida, apresentou efeitos tóxicos precoces como hepatite tóxica, dores reumatóides e eventualmente acidentes cardíacos graves. A artrite reumatóide é um fenômeno muito comum e constitui um dos mais graves inconvenientes desse tratamento.

A toxicidade desta medicação fez com que essa droga fosse substituída por outras como o antimônio-tiomalato de lítio (Antimoline ou 110 L; II); antimônio-3-pirocatequina disulfonato de sódio (Fuadina, Repodral, Neo-antimisan, Stibophen; III). Este último teve a vantagem sobre o Tártaro Emético pelo fato de ter sido administrado intramuscularmente e pelo fato de apresentar efeitos tóxicos em intensidade e frequência menores.

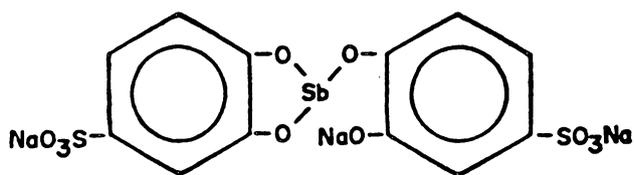
Notável progresso foi a síntese e uso de antimoniais pentavalentes que se destacaram pela maior tolerabilidade em ensaios, maior eficácia e menor tempo de tratamento, passando assim a serem os preferidos nos últimos trinta anos. Dentre



I

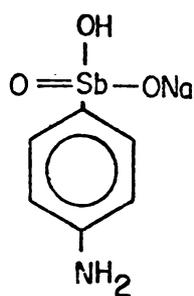


II

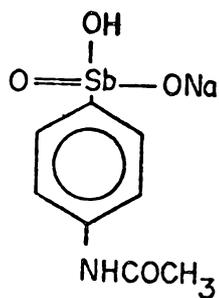


III

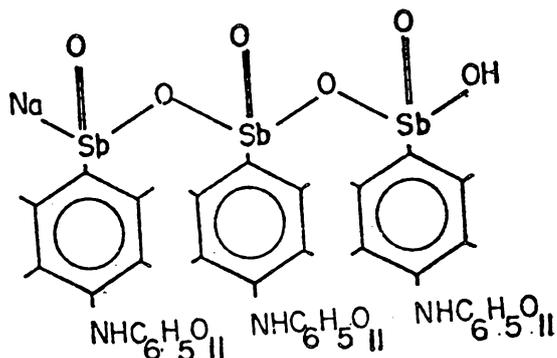
eles ressaltam-se: o p-amino-fenil-estibinato de sódio (Estibamina; IV); o m-cloro-p-acetil-fenil-estibonato de sódio ou uréia estibamida (Estibosan, von Heyden 471; V) a glicosídeo azotado de p-amino-fenil-amoniato de sódio (Neostan, Astaril, Neostibosan; VI) (Romero, 1948); estibogluconato de sódio (Pentostan, Solustiboson; VII) e o antimônio de N-metil glucamina (Glucantime; VIII; Corbett, 1982).



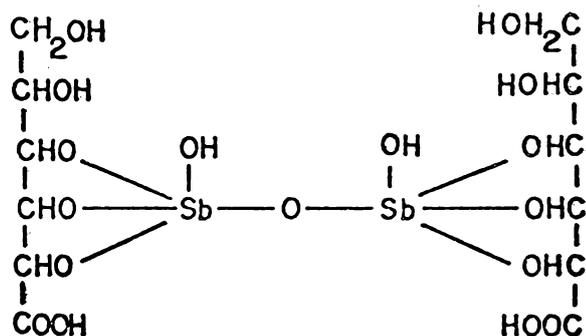
IV



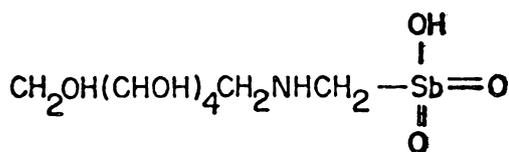
V



VI



VII



VIII

Apesar de muitos produtos orgânicos terem sido ensaiados na leishmaniose, a preferência dos autores (Neves, 1963), via de regra, fixou-se em 2 ou 3 compostos em decorrência da eficácia e da inocuidade que lhes foram reconhecidos e, também, das facilidades de suas aquisições. Ressalta-se, assim, a importância do Pentostan e do Glucantime.

O Pentostan foi o primeiro medicamento antimonial pentavalente fabricado comercialmente, sendo muito utilizado em outros países, na forma de um pó incolor, amorfo, no qual cerca de um terço é antimônio. É administrado via intramuscular ou venosa, em doses diárias de 600 mg, durante 6 a 10 dias (Bryceson et alii, 1985). Admite-se prolongar o tratamento até 30 dias e utilizar doses mais maciças em casos de resistência e recaídas. Ao que se sabe, entretanto, vários têm sido os inconvenientes do tratamento maciço. Assim, em relação à conduta terapêutica, estabelecida no tratamento das leishmanioses, a literatura é vasta frente às distintas características clínicas e epidemiológicas, segundo as zonas em que ocorrem, sendo ditadas pela imposição de pesquisas locais. Neste particular, ressaltamos os trabalhos de Sharque et alii (1988), Chulay et alii (1985), Oster et alii (1985), Bryceson et alii (1985), Carter et alii (1988) e Thakur et alii (1987) que recentemente utilizaram o Pentostan no tratamento de lesões pós-dérmicas.

No Brasil, o único produto encontrado no comércio é o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime). A substância é encontrada em ampolas de 5.0 ml, em solução a 30 %. As séries de tratamento consistem de 08 a 25 injeções diárias, começando

com 0,5 cm³ por dia (nos primeiros dias) passando depois para 10 a 30 cm³ diários.

Muitos pesquisadores têm ressaltado a cura das leishmanioses pelo Glucantime. Entre eles destacam-se: Neves (1963), Jardim & Ferraz (1965), Carvalho (1958), e outros.

Apesar dos brilhantes resultados quanto à eficiência e tolerância do Glucantime, a diversificação dos esquemas terapêuticos chegam a tal ponto, que permanece ainda instável o sistema de avaliação dos resultados do tratamento com o referido produto.

Em relação à estrutura química dos antimoniais tri e pentavalentes, observa-se que na série emética (Sb III) o antimônio está unido ao carbono através do oxigênio, ao passo que nos antimoniais pentavalentes derivados do ácido fenilestibínico (Sb V), o antimônio está diretamente ligado ao carbono. É possível que esta seja uma das razões para o maior tempo de retenção dos antimoniais trivalentes no organismo (Brahmacari, 1917).

Pelo estudo de excreção de antimônio, Brahmacari (1924) concluiu que as propriedades terapêuticas dos compostos antimoniais dependem do radical $-Sb=O$, similar ao que acontece com os arsênicos. Este autor relata que a uréia estibamina é convertida dentro do organismo em derivados de óxido de antimônio trivalente e que o $-Sb=O$ seja mais ativo quando modificado dentro do organismo.

Voegtlin e Smith (1920) sugeriram que os antimoniais trivalentes são mais tóxicos porque se combinam prontamente com grupos sulfidrílicos intracelulares formando

mercaptídeos. Uma revisão feita por Guzman Barron (1951), mostra que as propriedades dos metais mercaptídeos-formadores leva a uma ação inibitória da droga pela inibição de enzimas cujos grupos SH livres são importantes para sua atividade. Este fato pode ser comprovado utilizando-se 2,3-metil dimercaptopropanol. Esta substância exerce efeito protetor na intoxicação experimental por compostos de antimônio e também recupera a atividade de enzimas inibidas pelo Tártaro Emético. Guzman Barron interpretou esses resultados como sendo um bloqueio de grupos SH solúveis, necessário para a divisão e crescimento da célula.

Estudando o efeito dos antimoniais sobre a glicólise anaeróbica, Medina et alii (1955) observaram que o Tártaro Emético exerce um efeito inibidor do metabolismo celular muito grande, comparado ao Repodral e Astaril (antimoniais pentavalentes). Segundo esses pesquisadores, este fato deve-se a estrutura muito menor do Tártaro Emético que é capaz de penetrar na célula mais facilmente. Nesse mesmo trabalho, os autores contrariam o sugerido por Voegtlin & Smith (1920) concluindo que não haveria necessidade de redução do Sb V para Sb III, para que os antimoniais exerçam efeito terapêutico. Relatam, ainda, que tanto a Estibamina como o Tártaro Emético inibem a hexoquinase, ATPase e do 3-fosfogliceraldeído desidrogenase, do mesmo modo que certos arsenicais em lisados de *Trypanosoma equiperdum*.

Estudos mais recentes mostram que o Pentostan inibe a fosfofrutoquinase, que catalisa um passo limitante da via glicolítica e inibe também a oxidação de ácidos graxos (Berman

& Grogl, 1988) das formas amastigotas. De acordo com Berman et alii (1987a), a inibição das vias bioquímicas deve-se a um bloqueio específico da fosforilação do ADP.

Abok et alii (1988) consideram que a maioria das enzimas dos parasitas possuem metais como ferro, cobre e manganês. Dos 3 metais de transição, somente o manganês é utilizado no mecanismo de defesa primitiva do parasito contra metabólitos reativos dos macrófagos. Ao que parece, o antimônio das drogas, como o Pentostan, competiria com o magnésio dos parasitas, levando a uma inativação dos mesmos.

Observando a velocidade de excreção de antimônio na urina, Brahmacarí (1924) relata que após 24 horas de injeção de Tártaro Emético, 6 % são excretados na urina, comparado com a Uréia Estibamina cuja excreção foi de 30 a 40 %. A rápida eliminação de antimônio de antimoniais pentavalentes na urina é consistente com estudos prévios de Goodwin & Page (1943).

Otto et alii (1947), por outro lado, observaram os níveis de antimônio no sangue e a velocidade de excreção de antimoniais penta e trivalentes em 497 pacientes. Observaram ainda que, os antimônios trivalentes tinham baixa concentração no plasma e alta concentração nas células do sangue, ocorrendo o inverso com antimoniais pentavalentes. Esses autores acharam que tais dados eram consistentes com a maior excreção de antimônio pentavalente na urina. Concluíram, ainda, que há pouca transformação de antimônio pentavalente em trivalente no organismo e que a velocidade de excreção é inversamente proporcional à toxicidade do composto antimonial. A mais rápida excreção implicaria também numa melhor absorção da

droga pelo organismo.

Chulay et alii (1988) observaram, posteriormente, que a concentração de antimônio no sangue aumenta gradativamente durante o tratamento, de forma que a toxicidade dos antimoniais está associada com o tempo da terapia.

Dorea et alii (1989) confirmaram que a maioria das drogas antimoniais pentavalentes são eliminadas na urina dentro de 24 horas e que a concentração de antimônio em tecidos humanos é baixa em relação à alta concentração encontrada na pele, ao longo da terapia.

O estudo dos antimoniais poderia ser ampliado, contudo, não se nutre qualquer pretensão de apresentar, aqui, um relatório completo dos produtos estibiados utilizados nas diversas zonas do Globo e, especialmente, dos resultados que ditaram a preferência deste ou daquele composto. Quaisquer que tenham sido as conclusões, verifica-se que a unanimidade dos autores é no sentido de que a droga não seja tumultuada pelos eventos indesejáveis, tais como potencialidade tóxica e capacidade de gerar resistência.

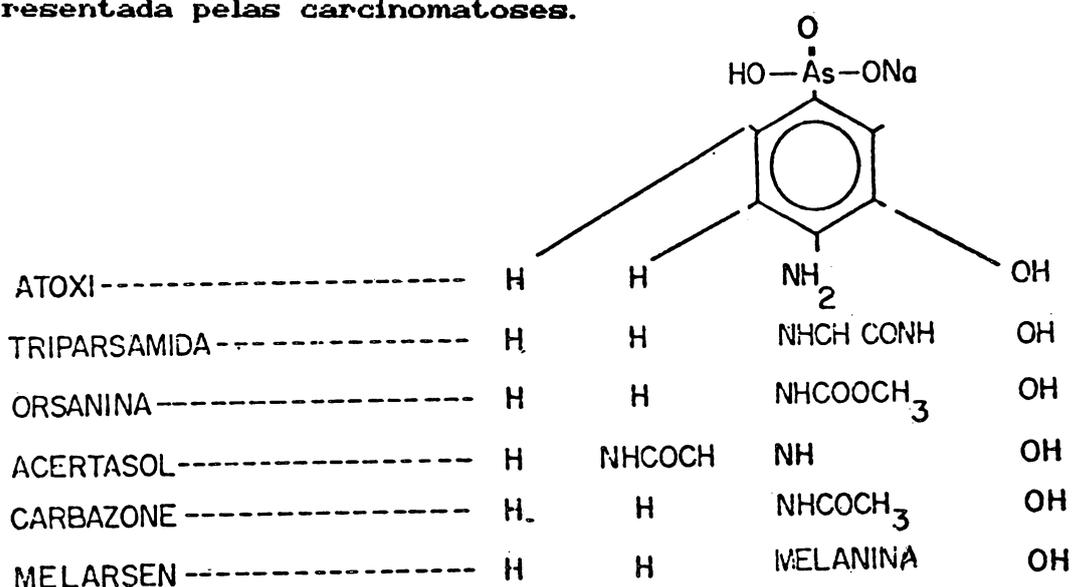
Arsenicais orgânicos

Os arsenicais orgânicos foram introduzidos em 1926 e tiveram sucesso no tratamento das leishmanioses, principalmente, nas formas de resistência (Pupo, 1926; Jemma, 1916).

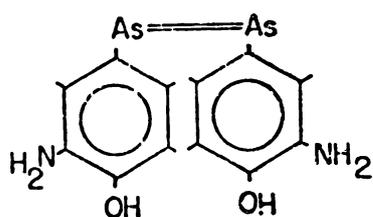
Tais como os antimoniais, os compostos arsenicais orgânicos podem dividir-se de acordo com sua valência. Quando injetados via venosa são eliminados quase totalmente na urina em 24 horas. Contudo, os compostos trivalentes são excretados

com muito mais lentidão. Este fato confere maior ação medicamentosa e menor toxicidade dos compostos arsenicais pentavalentes.

As estruturas IX, Xa, Xb e Xc mostram uma série de compostos arsenicais tri e pentavalentes. Dos compostos apresentados, o Acetarsol foi o primeiro arsenical pentavalente usado, porém foi substituído por outros menos tóxicos. A Acarbazona é ainda a mais utilizada. Embora esses compostos apresentem boa ação no tratamento das leishmanioses, tripanosomiase e outras protozooses, a medicação tem-se tornado obsoleta devido às consequências de toxicidade tardia, representada pelas carcinomatoses.

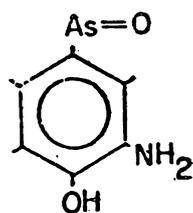


IX



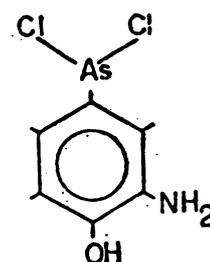
Xa

EPARSENO



Xb

OXOFENERSINA



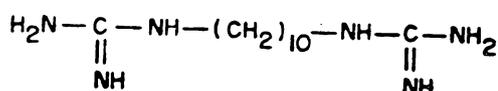
Xc

DOCLOROFENARSINA

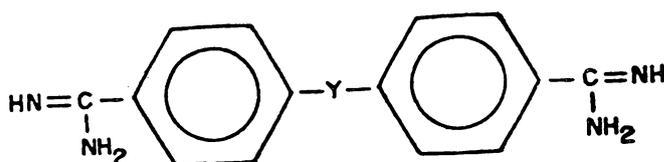
Diaminas Aromáticas

É sabido que os tripanosomas, em seu metabolismo, consomem consideráveis quantidades de glicídios e que animais de laboratório, quando infectados com tais parasitas, apresentam hipoglicemia. Em 1935, Jancso & Jancso utilizaram a Sintalina ou decametileno-bi-guanidina (XI), droga de ação hipoglicemiante, no tratamento da tripanosomíase conforme relato de Corbett (1982). Posteriormente, pensando que a atividade da droga estivesse ligada ao tipo alquil guanidínico da molécula, foram preparadas uma série de guanidinas, isotiuréias, aminas e amidinas, ensaiando sua atividade nas tripanosomíases. Os melhores resultados foram obtidos com diaminas aromáticas.

As diaminas mais ativas correspondem à fórmula geral XII, onde Y é uma cadeia alquílica de 2 átomos de carbono, ligados aos núcleos aromáticos 4,4' em relação aos grupos amidínicos.



XI



XII

A diamina mais utilizada atualmente é a Estibamidina, onde Y corresponde a $-HC=CH$. Esta droga parece ser a mais ativa mas também a mais tóxica do grupo. É encontrada em ampolas, contendo 150 mg de droga (Manson-Bahr & Heisch, 1956). A Pentamidina tem sido também utilizada. Bryceson et alii (1985) utilizaram-na prolongadamente no tratamento da leishmaniose visceral.

As diaminas tem, contra si, o perigo de reações tóxicas, às vezes graves. São, entretanto, utilizadas nos casos refratários à terapêutica antimonial e em casos de intolerância ao antimônio.

Os produtos quimioterápicos, até aqui citados, embora trouxessem notável modificação do prognóstico das leishmanioses, não conseguiram desfazer os temores quanto à instalação de estibioarseno-diamino resistências, de recaídas e de leishmanioses dérmicas pós-calazar. A seu turno, o clínico e, especialmente, o médico prático, a despeito de não esconderem o entusiasmo ante os resultados imediatos do tratamento específico, via de regra, postam-se receosos pelas eventuais conseqüências de uma alta hospitalar extemporânea (Neves, J., 1963).

Anfotericina B

É um antibiótico isolado por Gold et alii (1955) nos Estados Unidos e comercialmente fabricado com o nome de Fugizon. O efeito terapêutico no tratamento das leishmanioses só foi relevado por Furtado (1960) e Lacaz et alii (1959).

A eficiência da Anfotericina B sobre lesões de mucosa foi

saliada por autores como Prado (1963), Belfort & Medina (1971), Mayer (1974), Heimgartner & Heimgartner (1974) e outros. Esse último autor afirma que a Anfotericina B é a única droga conhecida até hoje, com potencial de sucesso, no tratamento de todas as formas de leishmanioses.

Alguns fatos devem ser salientados em relação ao tratamento da leishmaniose muco-cutânea pela Anfotericina B:

1. O tratamento deve ser feito em hospital, se bem que não seja obrigatória a internação, o que dificulta seu uso.

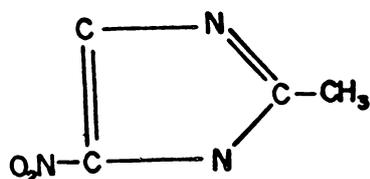
2. A Anfotericina B não deve ser associada a outros medicamentos. Por sua ação nefrotóxica, determina certo grau de insuficiência renal em, praticamente, todos os doentes.

3. Embora esta droga seja, no momento, a medicação mais ativa para o tratamento das lesões de mucosas, seu emprego é limitado pela sua toxicidade e também pelo custo.

4. É contra-indicado o tratamento com Anfotericina B e antimoniais simultaneamente, por razões inerentes à farmacodinâmica dessas drogas.

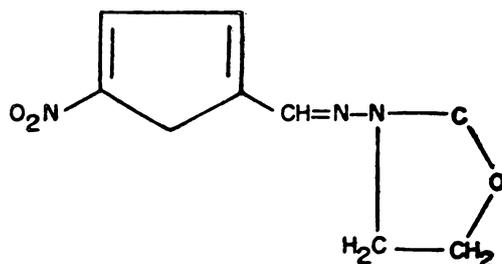
Outras medicações vêm sendo empregadas no tratamento das leishmanioses. Entretanto, o valor terapêutico dessas drogas necessita de melhor comprovação e deve ser meticulosamente analisado em função das características endêmicas de uma dada região. Parece haver alguma evidência de que diferentes espécies de *Leishmania* demonstram gradações diversas de resposta aos produtos específicos. Frente a essas diversificações na busca de um tratamento ideal para as leishmanioses, muitas drogas tem sido ensaiadas. Em destaque têm-se:

1. Metronidazol: é conhecida comercialmente como Flagil (XIII) sendo atualmente usada no tratamento da amebíase, giardíase e tricomonose. Embora haja interesse no uso dessa droga desde 1970, parece pouco provável que esta exerça um papel primário na terapia da leishmaniose (Heung Chong, 1986).



XIII

2. Nifurtimox: é conhecida comercialmente como Lampid e tem sido usada na doença de Chagas, contra as formas amastigotas do parasito. Tem sido testada no tratamento das



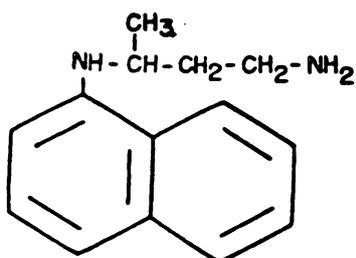
XIV

lesões de mucosas, mostrando um poder de cura em torno de 50 % em 6 meses de uso, isso quando administrado em altas doses (Berman & Lee, 1983; XIV).

3. Rifampicin: é um antibiótico utilizado na tuberculose e hanseníase. A uma concentração de 600 mg por dia durante 16 semanas. Selim (1972) obteve uma cura da leishmaniose cutânea em torno de 70 %, conforme relato de Castro (1980). Aumentando a concentração para 1200 mg por dia obteve uma cura clínica em torno de 93 % em 8 semanas de uso da droga, a qual foi experimentada em combinação com outras drogas. Pareek (1984) combinou a mesma com o Pentostan e relata o efeito potencializado do último. Já o efeito combinado de Rifampicin e Anfotericina B, não parece apreciável.

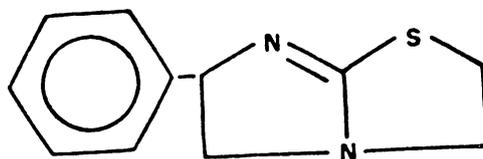
As 3 drogas mencionadas são utilizadas como medicamento de alternativa contra leishmaniose. Até o presente, nenhuma das 3 tem sido utilizadas como agente único e, em todos os casos, o tratamento demanda um período prolongado.

4. 8-aminoquinolina: comercialmente é conhecida como Primaquina (XV), sendo usada no tratamento da malária. *In vitro*, tem sido ativa contra *L. tropica* dentro de macrófago humanos. *In vivo*, tem-se mostrado ativa para leishmaniose visceral e inativa na leishmaniose cutânea (Trager et alii, 1980; XV)



XV

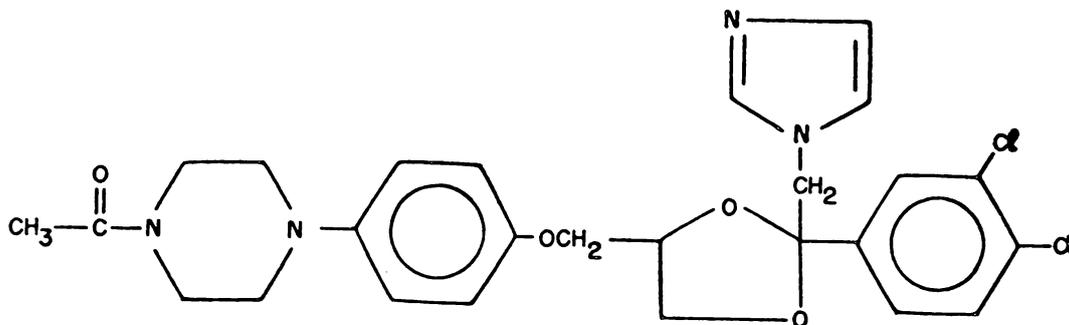
5. Levamisole: é um levoisômero do tetramisol (tetra-hidrofenilimidazólico; XVI). Comercialmente é conhecida como Ascaridil, sendo utilizada nas infecções por nematódeos atuando no metabolismo energético dos parasitas. Seu uso nas leishmanioses depende do efeito em célula T. É relatada por Butler (1982) a cura de 28 pacientes com leishmaniose cutânea sem uso de outra medicação. Apesar dessas pesquisas, a terapêutica desta droga contra leishmaniose requer mais investigações.



XVI

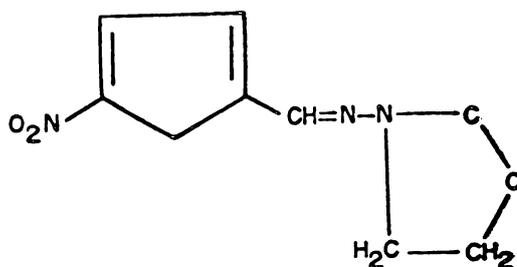
6. Ketoconazole: é utilizada no tratamento das infecções causadas por *Candida albicans*. Comercialmente é conhecida como Nizoral. Urcuyo & Zales (1982) testaram essa droga em 6 pacientes com leishmaniose muco-cutânea e os resultados foram

promissores. O mecanismo de ação da mesma é similar ao da Anfotericina B, ou seja, há interação do grupo esterol da substância da membrana do parasita inibindo seu crescimento (XVII).

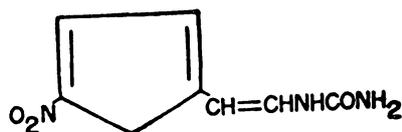


XVII

7. Furazolidone e nitrofurana: são conhecidas comercialmente como Furaxona (XVIII) e Furacina (XIX) respectivamente. *In vitro*, essas drogas mostraram-se 6 vezes mais ativas que o Nifurtimox contra leishmanioses. Atualmente, seu emprego continua sendo no tratamento da giardíase (van Bueren & Hooper, 1988).

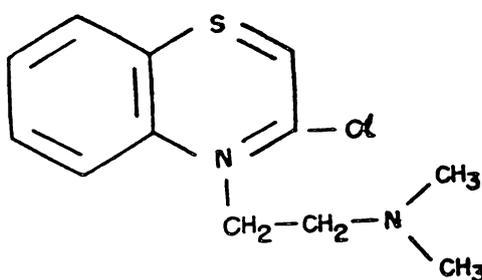


XVIII



XIX

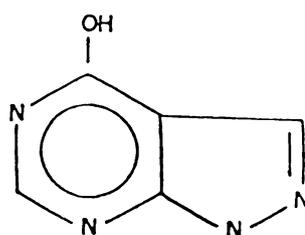
8. Fenothiazinas: incluem as clorpromazinas (XX) que são utilizadas no tratamento psiquiátrico. Person (1984) descobriu que em concentrações 10 vezes maiores às usadas em psiquiatria, estas drogas possuíam atividade leishmanicida e tripanosomicida. Embora os resultados experimentados por esse medicamento sejam interessantes, sua eficácia deve ser mais investigada. Comercialmente é conhecida como Amplictil, Amplitex, Clorpazin e Clorpromazina.



XX

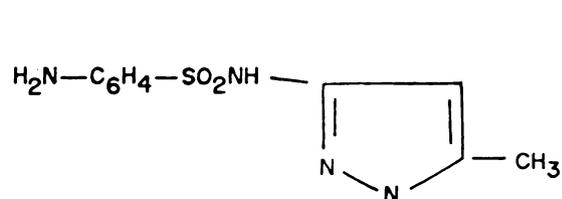
9. Alopurinol: é um derivado da pirazolopirimidina, conhecido comercialmente como Zyloric (XXI). É uma droga conhecida e utilizada no tratamento do artrismo e hiperuricemia. In vivo, observa-se uma parada no crescimento das formas

amastigotas de espécies do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*. Observa-se também um aumento da atividade leishmanicida quando associada com Pentostan. *In vivo*, tem-se mostrado eficaz apenas contra *L.braziliensis guyanensis*. Marr (1983), em recentes pesquisas conseguiu a cura de 2 pacientes com leishmaniose muco-cutânea.

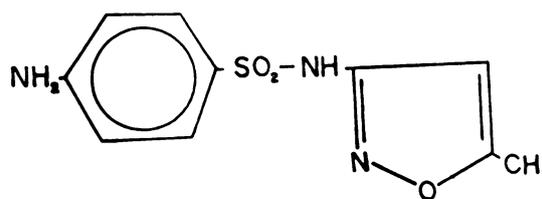


XXI

10. Cotrimoxazole: é uma associação entre o trimetropin (XXII) que é um agente anti-malárico e o sulfametazol (XXIII), com ação anti-bacteriana no tratamento de infecções genitais e



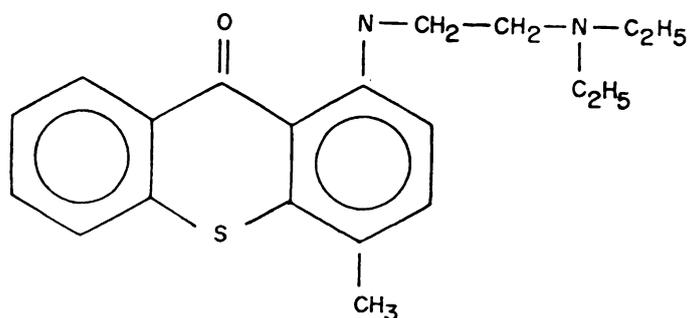
XXII



XXIII

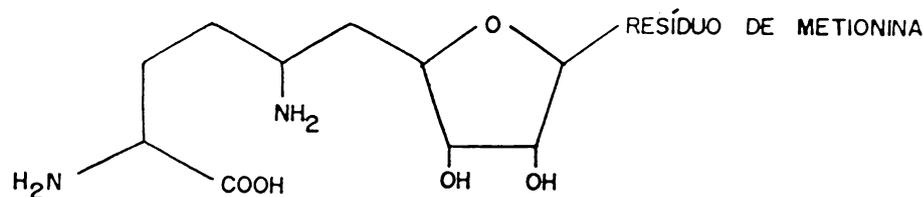
das vias respiratórias e nas septecemias. Atualmente, tem sido utilizada no tratamento da leishmaniose cutânea com resultados promissores (Kandil, 1973).

11. Lucantona: é uma droga eficaz contra *Schistosoma mansoni* e *S. haematobium*, prevenindo a liberação e produção de ovos desses helmintos. Tem sido testada para a cura das leishmanioses com resultado contraditórios (XXIV; Berman & Lee 1983).



XXIV

12. Sinefungi: é um antibiótico com atividade antifúngica. É também ativo contra parasitas de malária (Trager et alii, 1980)., *In vitro* mostrou-se ativo contra as formas amastigotas e promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* (Neal et alii, 1985) (XXV). Avila & Avila (1987) relataram as diferenças na suscetibilidade de formas promastigotas na leishmaniose tegumentar americana, para as quais a droga mostrou-se efetiva.



13. Amina sintética lipoidal associada ao Glucantime: essa associação tem-se mostrado mais ativa contra leishmaniose do que o tratamento por apenas drogas estibinas, conforme relatos de Adinolfi & Bonventre (1985), devido a imunestimulação do SMF. Outrossim, justifica-se e mantém-se em face do conceito de que os produtos utilizados na terapêutica do calazar podem atuar não diretamente sobre o parasita, mas através de uma estimologênese do SMF, que se vê bloqueado frente à infecção. Este conceito, de acordo com Neves (1963), necessitaria ser conciliado junto as recomendações terapêuticas esquematizadas, segundo critérios de dosagens das drogas e tempo de manutenção de tratamento.

14. Lipossomo encapsulado + Glucantime: a eficiência leishmanicida de antimoniais pentavalentes é consideravelmente mais efetiva quando associada a lipossomos encapsulados, conforme relatos de Chapman et alii (1984) e Adinolfi & Bonventre (1985), entre outros.

OBJETIVOS DAS PESQUISAS ATUAIS

Em face ao apresentado, observa-se que muitos pesquisadores vêm-se empenhando no tratamento dos leishmanióticos. O estágio atual de conhecimento reflete, em suma, o embate de conceitos insuficientemente esclarecidos, envolvendo a biologia do protozoário, a relação parasita-hospedeiro e as peculiaridades clínicas e epidemiológicas da infecção. Dentro deste contexto, necessita-se de um mecanismo de ação terapêutica mais específico e menos tóxico que propicie ao leishmaniótico resultados mais seguros de cura.

Tendo em vista esses objetivos, na presente investigação, além das drogas antimoniais preparadas, a atividade leishmanicida foi testada a nível celular *in vitro* e *in vivo* em animais de laboratório com a colaboração da Professora Lúcia Clara Barbieri Mestriner, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina. O raciocínio para tais pesquisas teve o seguinte embasamento:

- Abok et alii (1988) mostraram que as formas amastigotas do gênero *Leishmania* residem prontamente nos lisosomas dos macrófagos.
- Stahl e Gordon (1982) relataram a presença de receptores manose-fucose numa variedade de macrófagos.
- Wilson & Pearson (1987) descreveram a presença de 2 tipos de receptores (manose-fucose e um componente complemento) como parte do macrófago normal. Segundo esses autores, esses receptores cooperam com a entrada e morte do parasita no

macrófago.

Estudos relativos à penetração de *Leishmania* sp. em células fagocitárias sugeriram que os principais carboidratos da superfície da membrana do parasita são unidades de manose e galactose. Estes carboidratos estão envolvidos na reorganização, célula-hospedeira parasita, sugerindo pois um papel na infectividade, patogenicidade e/ou tropismo tecidual (Sun-Sang et alii, 1983). Em geral, glicoconjugados da superfície de parasitas têm um papel de proteção contra enzimas digestivas. Assim, em ensaios realizados por Stahl e Gordon (1982) foi utilizada a manana de levedura que funcionou como inibidor competitivo de ligantes, em cultura de macrófagos.

- Oda et alii (1983) assinalaram que a ligação microrganismo-macrófago pode ser inibida por unidades de carboidratos que são também constituintes da parede celular do parasita estudado e que a inibição da fagocitose por açúcares reflete a existência de receptores no macrófago.

- Wyler & Suzuki (1983) propuseram que *in vitro* as formas amastigotas de *Leishmania* interagem com determinantes presentes na superfície do monócito, possivelmente, envolvendo forças eletrostáticas e hidrofóbicas. A remoção de açúcares terminais dos parasitas, aparentemente inibia a ligação parasita-célula hospedeira, reforçando assim, que o sistema ligante-receptor é responsável pela interação parasito-hospedeiro.

- Tietz et alii (1982) descreveram que receptores de manose têm sido encontrados num grande número de células do SMF e que

bases fracas, como cloreto de amônio reduzem a velocidade de dissociação receptor-ligantes pelo aumento de pH das vesículas intracelulares, impedindo, portanto, a expressão de receptores livres para a continuação da endocitose.

O efeito das mudanças de pH dentro do vacúolo do polimorfonuclear (PMN), previamente relatado por Jensen & Bainton (1973), demonstrou que o pH normal do macrófago gira em torno de 4 e 5 e que durante a fagocitose o pH aumenta rapidamente, ficando em torno de 6,5. No término de tal processo ocorre uma inativação de enzimas lisosomais e o pH volta ao seu valor normal. Isto ocorre devido a formação de ácido láctico liberado pelo macrófago. A descoberta que a acidez aumenta rapidamente no término da fagocitose foi de importância no entendimento da função do PMN na destruição de microrganismos.

Horwitz & Marfield (1984) trabalhando com *Legionella pneumophila* descreveram que esta bactéria é capaz de modificar, direta ou indiretamente, o pH do fagócito e que esta capacidade pode ser crítica para a sobrevivência e multiplicação deste e outros agentes patogênicos intracelulares. Consistente com esta hipótese, esta bactéria foi capaz de multiplicar-se em meio artificial, com pH ótimo, de 6.9.

Mukkada et alii (1985) trabalhando com espécies do gênero *Leishmania* observaram que estas espécies vivem no fagolisosoma do macrófago em presença de enzimas hidrolíticas em ambientes ácidos desse compartimento. Segundo esses autores, esses parasitas têm metabolismo aumentado no pH ácido do fagolisosoma.

O embasamento da pesquisa atual levou em conta que as espécies do gênero *Leishmania* vivem exclusivamente dentro do macrófago no hospedeiro vertebrado, e que algumas classes de macrófagos apresentam receptores manosil. Assim, parece que a manana de levedura, que contém unidades de α -D-manopiranosil, pode ser particularmente complexada com antimônio e, assim, ser reorganizada e endocitada pelos macrófagos. Desta forma, as drogas antimoniais, à base de manana, seriam reconhecidas e endocitadas pelo macrófago, provocando a liberação de pentóxido de antimônio no ambiente ácido do fagolisosoma, sendo este composto altamente tóxico para o protozoário.

Com esse objetivo foi preparada manana (extraída de levedura de panificação) e foi complexada com antimônio. Este complexo foi utilizado em testes biológicos realizados *in vitro* em macrófagos e *in vivo* pois o óxido de antimônio forma complexos com manana de levedura. Por analogia com o estibogluconato de sódio e Glucantime que contém grupos ácidos e básicos respectivamente (grupos possivelmente sejam necessários para formar complexos solúveis em água e possivelmente menos dissociáveis em solução). Foram preparados derivados de manana como o Sulfato-man, o Fosf-man, o CM-man e o DEAE-man com seus respectivos complexos antimoniais.

Para observar o efeito do receptor e substituintes foram realizados experimentos *in vitro* em macrófagos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* com Man, CM-man, Sulfato-man, DEAE-man e Fosf-man, na forma sódica. Foi finalmente investigado o efeito do complexo potássio de manana em experimentos realizados *in vitro*. O efeito conjunto

receptor-antimônio substituintes foi observado em experimentos paralelos.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. EQUIPAMENTOS E MÉTODOS ANALÍTICOS

As evaporações foram efetuadas em evaporador rotatório FISATON-82, sob pressão reduzida, em banho de água, em temperatura próxima de 50°C.

O pH das soluções foi ajustado em pH metro IONALYZER, modelo 399, na temperatura ambiente.

Os espectros de ^{13}C -n.m.r. foram obtidos pelo uso do espectrômetro BRUKER AM 386 WB, incorporado ao transformador Fourier. Os polissacarídeos foram examinados como soluções em água deuterada, que foram colocados em tubo de 10 mm de diâmetro por 20 cm de comprimento, a 33°C, para serem analisados no espectrômetro. Os deslocamentos químicos dos sinais foram expressos em δ (p.p.m.) relativos à ressonância de TMS, determinados em experimentos separados e corrigidos para temperatura de 70°C.

As determinações espectrométricas foram efetuadas com:

- a) Aparelho Coleman Júnior, modelo 6A, para a região visível.
- b) Aparelho Beckman, em disco de KBr, para região IV.
- c) Aparelho Varian, UV-vis, modelo 635.

As centrifugas utilizadas durante preparações de mananas foram efetuadas com o modelo GELM e SORVALL-super Speed RC2-B.

As liofilizações das soluções contendo polissacarídeos foram realizadas em aparelho VIRTIS, modelo 145-NRBA.

As análises cromatográficas em papel (c.p.) foram efetuadas em papel Whatman nº 1, com o sistema-solventes:

benzeno/n-butanol/piridina/água , numa relação 1:5:3:3. (fase superior).

A visualização dos açúcares foi feita com os reagentes de nitrato de prata alcalino (Hough & Jones, 1962) e cloridrato de p-anisidina (Trevelyan et alii; 1950).

A determinação quantitativa de proteínas foi feita com reagente de Folin-Ciocalteu, segundo processo descrito por Lowry et alii (1951). A absorbância foi lida a 660 nm, comparativamente ao padrão de soro-albumina cristalina , na faixa de 10 a 100 μg /ensaio.

Para dosagens de açúcar total utilizou-se o método de fenol-sulfúrico (Dubois et alii , 1956), cuja absorbância foi lida a 490 nm, utilizando-se como padrão D-manose na faixa de 10 a 100 μg /ensaio.

2. PREPARAÇÃO DE MANANA A PARTIR DE LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO

(Gorin, 1970)

A partir de 3.5 kg de levedura de panificação (peso úmido), foram extraídos polissacarídeos, com hidróxido de potássio aquoso a 2 %, a 100°C, utilizando uma manta de aquecimento. O tempo de extração foi de meia hora, sendo este tempo considerado a partir do momento de fervura. A solução foi depois esfriada e tratada com ácido acético glacial, até pH neutro. Em seguida, foi centrifugada por 15 minutos a 3.450 xg e a fração insolúvel lavada três vezes com água destilada. Esta foi, então, desprezada e os sobrenadantes foram concentrados. O processo a seguir, foi precipitar os sobrenadantes em metanol, numa proporção de 1:4. O precipitado

formado foi filtrado a vácuo, liofilizado, dando um rendimento de 8.1 % de polissacarídeo (283 g).

O complexo insolúvel de cobre formado foi centrifugado (3450 x g), lavado com hidróxido de potássio a 2% (3 vezes) e posteriormente com metanol absoluto (3 vezes) e descomplexado utilizando resina trocadora de íons (Amberlite, forma H⁺). Após agitação (1 h) a resina foi removida por filtração. O filtrado foi concentrado e tratado com etanol (1:4). O precipitado obtido foi filtrado a seco, a vácuo com rendimento de 2,2% (77 g de manana).

3. PREPARAÇÃO DE MANANA DE LEVEDURA O-SUBSTITUIDAS COM GRUPOS ÁCIDOS E BÁSICOS

3.1 - CM-Man (Karabinos & Hindert, 1954)

Dissolveu-se 5 g de manana em 13,3 ml de uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 30 %. Em seguida, adicionou-se 116 ml de 2-propanol à mistura anterior. A este sistema acrescentou-se gota a gota de ácido monocloroacético (6 g em pequena quantidade de 2-propanol). Em seguida, a mistura foi aquecida a 55°C em diferentes tempos de incubação: 20 min, 40 min, 1 h 15 min, 2 h 20 min, 3 h e 30 min e 5 horas. Após esses tempos o líquido excedente foi decantado e ao produto de reação misturou-se 170 ml de metanol a 70 %. Quantidade suficiente de ácido acético foi adicionado para neutralizar o excesso de alcali. O produto foi então filtrado a vácuo, liofilizado, obtendo-se 5.25 g de manana substituída, para o tempo de incubação de 40 minutos.

3.2 - Ésteres sulfato de manana (Whistler & Spencer, 1961)

Dissolveu-se 5 g de manana em 20 ml de formamida em 50 ml de piridina. A solução foi esfriada em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se à solução anterior 0,45 mol/mol de ácido clorosulfônico (13,5 ml), gota a gota, sob agitação. A mistura de reação foi mantida em câmara fria por uma noite. Após esse tempo, quantidade suficiente de água e gelo foram adicionados (para manter fria a mistura), seguido de uma solução de bicarbonato de sódio a 10 %, até cessar toda saída de gás carbônico. A solução foi então exaustivamente extraída com éter etílico e neutralizada com uma solução de hidróxido de sódio diluído, dialisada em água destilada. O derivado sulfatado foi, em seguida, concentrado, liofilizado, rendendo 5,43 g. Outros derivados sulfatados foram obtidos utilizando-se 0,62, 1,25, 1,85 e 2,50 moles/mol de ácido clorosulfônico.

3.3 - Ésteres fosfato de manana (Paschall, 1964)

Adicionou-se 5 g de manana à uma solução de 2 moles/mol de di-hidrogênio fosfato dissódico monoidratado (2,8 g) e 2 moles/mol de hidrogênio fosfato dissódico heptaidratado (4,18 g) em 15,9 ml de água destilada, a 35°C (pH 6,1).

A mistura foi agitada até completa dissolução. A solução foi concentrada até secura e mantida em estufa a 100°C por 15 horas. Em seguida, a mistura seca foi colocada em banho de óleo a 155°C e incubada por 1, 2, 3 e 5 horas. O produto foi, então, esfriado e solubilizado em água e dialisado em água

destilada. O derivado fosfatado foi concentrado, liofilizado, obtendo-se 5,64 g quando a mistura foi incubada por 5 horas.

3.4 - DEAE-man (Bullock & Guthrie, 1965)

Dissolveu-se 5 g de manana em uma solução de hidróxido de sódio (3,3 g para 17,4 ml de água). Outra solução de 2-cloro-trietilamina (2,9 g em 25 ml de água) foi adicionada à solução anterior, gota a gota, a 0°C. A mistura foi aquecida a 85°C em diferentes tempos de incubação: 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h e 15 horas. O produto foi esfriado, dialisado em água destilada e liofilizado, obtendo-se 5,46 g de manana substituída, quando a reação foi incubada por 4 horas.

4. DETERMINAÇÃO DOS SUBSTITUINTES NOS DERIVADOS DE MANANA

4.1 - Determinação do DS do grupo CM em manana

Várias técnicas foram utilizadas para determinar o DS do grupo CM em manana, quando estas foram incubadas em diferentes tempos com ácido monocloroacético. Serão descritas 5 técnicas:

4.1.1 - Método do sal de cobre (McLaughlin & Herbst, 1950)

Dissolveu-se 100 mg de CM-man de sódio em 100 ml de água. Adicionou-se 3 ml de nitrato de cobre aquoso a 10 %, sob agitação, à solução anterior. O precipitado formado foi filtrado e dissolvido em 100 ml de água. A esta solução adicionou-se 1 ml de nitrato de cobre aquoso a 10 % e a mistura foi acidificada com ácido clorídrico concentrado até pH 2,5. Em seguida, a solução foi titulada (utilizando-se

potenciômetro) com hidróxido de sódio aquoso 0,8 M, até pH 4,5. O precipitado foi, então, filtrado em um funil de vidro de placa porosa, suspenso com etanol 95 % e lavado com água, até dar negativo ao teste ferrocianeto de potássio (para o cobre livre) e nitrato (para cloreto). O precipitado foi, seco em estufa a 100°C até peso constante e levado em mufla a 600°C por uma hora.

O DS foi calculado pela fórmula abaixo:

$$DS = 4,075 r / (1 - 2,232r)$$

onde r é a relação gravimétrica entre o óxido de cobre e carboximetil manana de sódio.

4.1.2 - Método do sal de sódio (McLaughlin & Herbst, 1950)

Ao derivado CM-man na forma sódica (200 mg) foi adicionado ácido clorídrico concentrado (0,5 ml). Após evaporação realizou-se a ignição da amostra (mufla 600°C por 1 hora).

O DS foi calculado pela fórmula abaixo:

$$DS = 2,774 r / (1 - 1,369r)$$

onde r é a relação gravimétrica entre cloreto de sódio e carboximetil manana na forma sódica.

4.1.3 - Método de lavagem ácida seguido por titulação (Eyler et alii, 1947)

Dissolveu-se 200 mg de CM-manana na forma sódica em 2 ml de uma solução reagente (10 ml de ácido nítrico a 70 % em 10 ml de metanol anidro). A mistura foi agitada por 3 horas em temperatura ambiente. O material foi dialisado, concentrado e liofilizado. O produto foi dissolvido em hidróxido de sódio 0,1 M, devidamente fatorado e titulado com ácido sulfúrico 0,05 M, também fatorado.

O DS foi calculado pela fórmula abaixo:

$$DS = 0,162 A / (1 - 0,058 A)$$

onde A é o miliequivalente grama de carboximetilmanana titulado, por grama de amostra.

4.1.4 Método do tratamento da resina catiônica fortemente ácida, seguido por titulação

Dissolveu-se 200 mg de CM-man na forma sódica em 5 ml de água e uma certa quantidade de resina catiônica fortemente ácida foi adicionada. A mistura foi agitada por 40 minutos e filtrada até fenol sulfúrico negativo. O filtrado foi concentrado, dialisado e liofilizado.

O cálculo utilizado para determinar o DS foi o mesmo empregado na lavagem ácida seguido por titulação (item 4.1;3).

4.1.5 Método utilizando-se nitrato de uranila (Francis, 1953)

O derivado CM-man de sódio (250 ml) foi umedecido com álcool e depois dissolvido em água destilada (50 ml). A

solução foi a seguir aquecida a 60°C e 300 ml de água foram acrescentados. A esta solução foram colocados 25 ml de reagente nitrato de uranila, sob agitação. Removeu-se a fonte de calor e continuou-se agitando por 10 minutos. O precipitado foi, então, lavado com 200 ml de água, seguido da mesma quantidade de metanol absoluto ou etanol a 95 % e depois filtrado a vácuo, através de um funil de placa porosa, devidamente pesado. Após o processo de filtração, o funil com precipitados foi seco até obter-se um precipitado constante. A seguir, o precipitado foi transferido para um cadinho de porcelana, onde a perda de material pode ser avaliada pela diferença de peso do funil antes e depois do processo de filtração. Assim, o precipitado seco de uranilcarboximetilmanana foi levado à ignição por uma hora a 750°C. O resíduo óxido de uranila (U_3O_8) foi pesado após resfriamento.

O DS foi calculado pela fórmula abaixo:

$$\text{Fração Uranila (UF)} = \frac{\text{Peso do óxido de uranila} \times 0,961}{\text{Peso do Uranilcarboximetilmanana}}$$

4.2 - Determinação do DS do grupo sulfato em manana

Para determinar o DS do grupo sulfato em manana, quando estas reagiram em diferentes quantidades de ácido clorosulfônico, três técnicas foram utilizadas:

4.2.1 - Método do tratamento de resina catiónica fortemente ácida, seguido por titulação

A manana sulfatada (200 mg/5 ml de água) foi cromatografada em resina catiónica fortemente ácida. Após eluição com água (até fenol sulfúrico negativo), o eluato foi concentrado, dialisado e liofilizado. A amostra assim tratada, foi titulada com uma solução de hidróxido de sódio, devidamente fatorado.

O DS foi calculado pela fórmula abaixo:

$$DS = 0,162 A / (1 - 0,058 A)$$

onde A representa o miliequivalente grama de manana sulfatada titulada por grama de amostra.

4.2.2 Método utilizando-se a precipitação do sulfato de bário (Whistler & Spencer, 1961)

Manana sulfatada (300 mg) foi dissolvida em ácido clorídrico aquoso a 10% (250 ml) e mantida sob refluxo (5 h). O sulfato liberado foi precipitado pela adição de cloreto de bário a 10% (25 ml). O sulfato de bário foi transferido quantitativamente para um cadinho de porcelana e levado a mufla (300°C por 1 h e posteriormente a 600°C também por 1 h).

O DS foi calculado pelas seguintes fórmulas:

$$\% S = \frac{\text{Gramas de sulfato de bário} \times 0,1374 \times 100}{\text{peso da amostra}}$$

$$DS = 162\% S / (3200 - 102\% S)$$

4.2.3 - Método turbimétrico (Dodgson & Price, 1962; Dodgson 1961)

Uma amostra de manana sulfatada após hidrólise com ácido clorídrico (2 M a 100°C, por 5 horas) foi tratada com ácido tricloroacético a 3 % (3,8 ml) e com reativo gelatina-bário (1 ml). A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 20 minutos. A absorbância da solução foi medida a 360 nm, contra o branco, nas mesmas condições. A quantidade de sulfato foi determinada em relação a uma curva padrão de sulfato de potássio.

4.3 - Determinação do DS do grupo fosfato em manana

Para determinar o DS do grupo fosfato em mananas, quando estas foram incubadas em diferentes tempos, em solução tampão fosfato, várias técnicas foram utilizadas:

4.3.1 - Método espectrofotométrico sulfomolibdico (Chen et ali, 1956)

Carbonizou-se 100 mg de manana fosfatada em chapa elétrica e depois em mufla a 550°C até o resíduo tomar coloração branca. A este resíduo frio foi adicionado 0,3 ml de uma solução aquosa de ácido clorídrico a 10 %, que foi levado em banho maria por 10 minutos. O material foi filtrado e o volume completado para 25 ml de água. Desta solução, tomou-se uma alíquota de 0,2 ml e adicionou-se 0,5 ml de uma solução sulfomolibdica e 0,2 ml de uma solução de ácido ascórbico a 5 %, e o volume completado com água (2,5 ml). A mistura foi mantida em repouso por 15 minutos e a leitura foi realizada a 650 nm

contra o branco nas mesmas condições. A quantidade de fosfato foi determinada em relação a uma curva padrão de fosfato de potássio.

4.3.2 - Método do tratamento da resina catiónica fortemente ácida, seguido por titulação

Dissolveram-se 200 mg de manana fosfatada em 5 ml de água e uma quantidade suficiente de resina catiónica fortemente ácida foi adicionada. A mistura foi mantida sob agitação (40 min.) filtrada até fenol-ácido sulfúrico negativo. O filtrado foi concentrado, dialisado e liofilizado. A amostra assim tratada foi titulada com hidróxido de sódio 0,1 M, devidamente fatorada.

O DS foi calculado pela seguinte fórmula:

$$DS = 0,162 A / (1 - 0,058 A)$$

onde A representa o miliequivalente grama de manana fosfatada titulada, por grama de amostra.

4.3.3 - Método espectrofotométrico molibdovanadato (Chen et alii, 1956)

Uma alíquota (0,2 ml) de uma solução de manana fosfatada (100 mg/2 ml de água) foi transferida para um cadinho de porcelana e acetato de zinco a 10% (1 ml) foi adicionado. A mistura foi mantida em estufa (100°C por 12 horas) e posteriormente em mufla (550°C por 0,5 horas). O material foi esfriado a temperatura ambiente e transferido para um tubo

de ensaio utilizando-se ácido nítrico a 29 % (1 ml) e água (1 ml). A solução resíduo foi levada em ponto de ebulição por 10 minutos, filtrada através de um papel de filtro Whatman nº 1 e os seguintes reagentes foram acrescentados: ácido nítrico (1 ml) vanadato de amônio a 0,25 % (1 ml) molibdato de amônio a 5 % (1 ml). E quantidade suficiente para 10 ml de água. Após 10 minutos, a leitura foi realizada contra um branco em mesmas condições. A quantidade de fosfato foi determinada em relação a uma curva padrão de fosfato de potássio.

4.4 - Determinação do DS do grupo DEAE em manana

4.4.1 - Método do tratamento da resina aniônica fortemente básica, seguido por titulação

O DEAE-man (200 mg/5 ml de água) foi tratada com resina catiônica fortemente básica. A mistura foi agitada por 40 minutos e filtrada até fenol-ácido sulfúrico negativo. O filtrado foi concentrado, dialisado e liofilizado. A amostra, assim tratada, foi titulada com ácido sulfúrico 0.05 M, devidamente fatorado.

O DS foi calculado pela seguinte fórmula:

$$DS = 0,162 A / (1 - 0,058 A)$$

onde A é o miliequivalente grama de manana sulfatada, titulada por grama de amostra.

5.- COMPLEXOS DE MANANA E MANANAS SUBSTITUÍDAS COM ANTIMÔNIO

Dissolveu-se 1 grama de manana em 50 ml de água e diferentes moles de pentacloreto de antimônio por mol de polissacarídeos (2,34, 1,56, 1,10 e 0,78) foram adicionados à solução anterior sob agitação e em banho de gelo. A mistura foi agitada por 15 minutos, no mesmo sistema, após o que foi neutralizada com bicarbonato de sódio aquoso a 10 %, até pH 7. Em seguida, o sistema foi aquecido a 60°C, por uma hora e centrifugado para remover o material que não reagiu. O polissacarídeo, complexado com antimônio, foi precipitado em metanol a 70 % (15 ml da solução polissacarídica / 35 ml de metanol absoluto) solubilizado em água e liofilizado.

Uma outra etapa de preparação desses complexos foi utilizar-se do processo de diálise, ao invés da precipitação em metanol, seguido da liofilização e determinação do conteúdo de antimônio.

A mesma técnica foi utilizada para complexar as mananas substituídas com grupos CM, sulfato, fosfato e DEAE, em experimentos separados.

6. - ANÁLISE DE CONTEÚDO DE ANTIMÔNIO DOS POLISSACARÍDEOS, ASSIM COMPLEXADOS

Os complexos de manana e mananas substituídas com antimônio foram analisados por 2 diferentes técnicas:

6.1 - Método espectrofotométrico (Vogel, 1981, p. 544).

Dissolveram-se 5 mg de amostra, previamente acidificada com ácido sulfúrico 1,5 M, em 1 ml de água. A esta solução

adicionou-se 2 ml de uma solução de iodeto de potássio e 2 ml de uma solução aquosa de ácido sulfúrico a 25 %. Após 15 minutos de repouso a leitura foi realizada, medindo-se a absorbância a 425 nm, contra um branco.

A quantidade de antimônio foi determinada em relação a uma curva padrão de tartarato de antimônio e potássio.

6.2 - Método por titulação com tiosulfato de sódio (Vogel, 1981, p. 285)

Dissolveram-se 10 mg de amostra em 10 ml de água. A solução contendo antimônio foi tratada com ácido clorídrico concentrado para dar uma solução final de 4 M em ácido clorídrico. A seguir, foram acrescentados, à solução anterior, 0,5 ml de ácido tartárico aquoso a 10 % e 1 grama de iodeto de potássio. A mistura, após agitação, foi deixada em repouso por 5 minutos e depois titulada, com agitação vigorosa, com tiosulfato de sódio 0,1 M.

O conteúdo de antimônio foi calculado a partir do número de equivalentes gastos de tiosulfato de sódio, que deverá corresponder, possivelmente, ao número de equivalentes de antimônio.

7. - TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

7.1 - Obtenção de formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

As formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram

isoladas de lesão da pata de hamster ou camundongo Balb/ c. previamente infectados (1 - 2 meses).

Os granulomas obtidos após 4-6 semanas foram retirados e cortados em RPMI com antibiótico e centrifugados a 250 g durante 10 minutos e o precipitado ressuspensão em RPMI. As células foram então mantidas sob agitação à temperatura ambiente durante 4 horas e centrifugadas a (1400 x g durante 10 minutos. O precipitado final foi, então, ressuspensão em RPMI e feita a contagem do número de amastigotas em câmara de Neubauer.

7.2 - Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos

Foram injetados aproximadamente 2 ml de PBS estéril no peritônio de camundongos albinos, após a morte dos mesmos por clorofórmio.

Depois de uma leve massagem no abdome desses animais o líquido peritoneal foi retirado assepticamente fazendo-se um "pool" de células. Procedeu-se à contagem do número total e diferencial das células e o volume desejado foi colocado sobre lamínulas de vidro redondas de 13 mm de diâmetro, que foram mantidas a 37°C durante 30 minutos. Após a aderência, as lamínulas foram lavadas em PBS (2 a 3 vezes) para remoção das células não aderidas. A seguir, os macrófagos foram incubados em RPMI contendo 10 % de FCS em estufa e contendo 5 % do CO₂.

7.3 - Infecção de macrófagos com *Leishmania (L.) amazonensis*

Após incubação dos macrófagos peritoniais de camundongo durante 24 horas em RPMI contendo 10 % de FCS eles foram infectados com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* numa proporção de 3 parasitas por macrófago.

Após 48 horas os macrófagos apresentaram 98 % de infecção e vacúolos muito grandes abrigando muitas formas amastigotas, típicas da infecção por espécies do complexo *L. (L.) amazonensis*.

7.4 - Preparo da solução de Man-Sb e seus derivados

As soluções de Man-Sb e seus derivados utilizados nos experimentos foram preparados em PBS. Devido a baixa solubilidade do complexo Man-Sb foi preparada uma solução em PBS, mantida em banho-maria (37°C por 12 horas). Após centrifugação (1400 g durante 5 minutos) ajustou-se o pH do sobrenadante para 7,0 - 7,2, o qual foi esterilizado por filtração (filtro Star LB - 0,45 µm, Costar). A concentração de Man-Sb foi avaliada pela dosagem de açúcar da solução pelo método de Dubois et alii (1956). A concentração de Sb da solução de Man-Sb foi calculada a partir da porcentagem de Sb presente no complexo Man-Sb conforme previamente descrito.

A solução de manana utilizada nos experimentos foi preparada segundo o mesmo protocolo descrito para o preparo de Man-Sb.

O Glucantime utilizado foi o comercial, injetável (0,3 g /ml). A sua concentração de Sb foi dosada pelos mesmos métodos utilizados em Man-Sb e seus derivados.

7.5 - Determinação da atividade leishmanicida dos complexos de Man-Sb e seus derivados nas culturas peritoniais com *Leishmania (L.) amazonensis*

Após a infecção dos macrófagos com *Leishmania (L.) amazonensis* estes foram utilizados em experimentos na presença de Man-Sb e seus derivados (CM-man-Sb, Sulfato-man-Sb e Fosf-man-Sb) nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 mg/ml. Foram também testados os polissacarídeos sem antimônio nas mesmas concentrações.

Após 48 horas de tratamento as culturas foram fixadas e coradas com Giemsa procedendo-se às contagens. Os resultados foram expressos pelo índice fagocítico que foi calculado multiplicando-se a porcentagem de macrófagos infetados pela média do número de formas amastigotas por macrófago. Os resultados representam a média das contagens de 200 macrófagos/laminula em duplicata.

7.6 - Testes de toxicidade de Man-Sb e Glucantime *in vitro*

Monocamadas de macrófagos foram preparados em laminula de 13 mm de diâmetro e infetados com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Dois dias após a infecção as culturas foram tratadas diferentemente com as seguintes drogas: a) PBS; b) manana 750 $\mu\text{g/ml}$; c) Glucantime (o equivalente a 6.6 $\mu\text{g/ml}$ de Sb); d) Man-Sb 500 $\mu\text{g/ml}$ (equivalente a 4.4 $\mu\text{g/ml}$ de Sb); e) Man-Sb 750 $\mu\text{g/ml}$ (equivalente a 6.6 $\mu\text{g/ml}$ de Sb). Após 1, 3 e 5 dias as laminulas foram lavadas em PBS, fixadas em metanol e coradas com Giemsa, procedendo-se a contagem. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pela exclusão em azul de Trypan

antes da coloração com Giemsa. Os resultados estão expressos pelo índice fagocítico que representaram a média de triplicatas, contando-se 200 macrófagos/lamínula.

7.7 - Atividade leishmanicida do complexo Man-Sb em presença de manana e manose

Monocamadas de macrófagos peritoniais de camundongo infectadas com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas durante 4 h a 37°C em estufa contendo 5 % de CO₂ com manana nas concentrações de 250 µg/ml, 1 mg/ml e PBS. A seguir as culturas foram lavadas e adicionou-se Man-Sb na concentração de 750 µg/ml (correspondendo a 6,6 µg/ml de Sb) Após 24 e 48 horas as culturas foram fixadas, coradas e feitas as contagens. Os resultados foram expressos pelo índice fagocítico que foi calculado multiplicando-se a porcentagem de infecção pelo número de amastigotas por macrófago o qual representou a média de duplicatas contando-se 200 macrófagos/lamínula. Experimentos similares foram realizados utilizando as mesmas concentrações crescentes de manose.

7.8 - Atividade leishmanicida do complexo Man-Sb in vivo

Os experimentos realizados com Man-Sb *in vivo* foram feitos com hamsters (com um peso aproximado de 125 a 150 g) infetados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, isolados de patas de hamsters, conforme já descrito. O tratamento foi iniciado um mês e meio após a infecção dos animais com os seguintes compostos: Man, Man-Sb, PBS e Glucantime. Para cada droga utilizaram-se 2 hamsters.

As drogas foram injetadas via sub-cutânea próximo as lesões com 390 μg de Sb administradas sob a forma de Man-Sb, utilizando-se 78 μg por dia, durante 5 dias consecutivos (19,5 μg / pata/dia). Utilizou-se também via intraperitoneal injetando-se 78 μg /dia durante 5 dias consecutivos.

Os animais controle utilizados receberam manana na mesma concentração final de manana administrada como Man-Sb (aproximadamente um total de 46 mg) e Glucantime utilizando-se 13,08 mg/dia durante 5 dias consecutivos (3,27 mg/pata/dia).

O tamanho das lesões foi medido com um paquímetro nos dias indicados : 0, 9, 16, 23, 30, 37 e 44 dias após tratamento.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. INTRODUÇÃO

Embora se saiba do embate de conceitos insuficientemente claros, envolvendo a biologia do protozoário, a relação parasita-hospedeiro, as peculiaridades clínicas e epidemiológicas da infecção e o mecanismo de ação terapêutica específico, impõe-se-nos participar neste campo de pesquisas, de modo, sobretudo, a preparar drogas que possibilitem um melhor tratamento dos leishmanióticos, possivelmente, devido a menor toxicidade e melhor ação terapêutica dos antimoniais que foram preparados.

Com o objetivo de aperfeiçoar o tratamento de pacientes com leishmanioses, a manana de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) foi extraída e vários derivados foram preparados a partir desta manana. Como etapa posterior, a manana e seus derivados reagiram com pentóxido de antimônio e os complexos foram testados *in vitro*. A atividade da Man-Sb foi demonstrada também *in vivo*.

Dentre os produtos antimoniais empregados com maior êxito no tratamento das leishmanioses, a preferência no Brasil é o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime). O estibogluconato de sódio é utilizado em outros países (Pentostan). A natureza básica e ácida desses compostos, respectivamente, sugeriu que a introdução de grupos ácidos e básicos em manana levaria a uma melhor complexação com Sb e melhor ação terapêutica. O embasamento para tais suposições

está fundamentado nos trabalhos de Tietz et alii (1982), Jensen & Bainton (1973), Horwitz & Marfield (1984) e Mukkada et alii (1985).

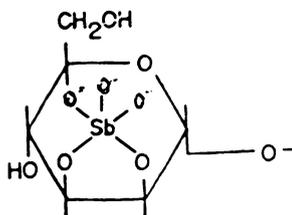
A manana de levedura de panificação (Figura 1) e seus derivados foram escolhidos como base de droga antimonial, porque os macrófagos, sede dos parasitos do gênero *Leishmania*, possuem receptores para manosídeos específicos (Tietze et alii, 1982; Oda et alii, 1983; Sun-Sang et alii, 1983; Stahl & Gordon, 1982 e Wilson & Pearson, 1987). Esses macrófagos podem, assim, reconhecer as mananas ligadas com antimônio e assim a droga agiria como "targeting device" para destruir os protozoários presentes nos vacúolos dos macrófagos.

A introdução de grupos CM, sulfato, fosfato e DEAE na manana possibilitou uma melhor complexação e melhor ação por analogia das drogas contendo grupos ácidos ou básicos. O valor DS^+ escolhido para posterior complexação com antimônio, e cujos derivados foram sintetizados em maior escala, foi em torno de 0.25. A razão para escolha desse valor é que, neste nível, as hidroxilas dos derivados de manana formariam complexos com antimônio sem modificar suficientemente as estruturas manopironosídicas junto aos macrófagos.

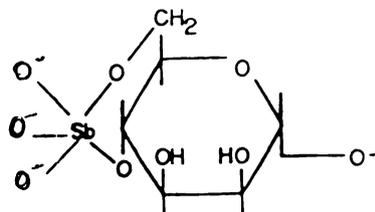
Outra razão para escolha desse valor ($DS = 0,25$) é que para formação dos complexos de borato é importante que se tenha OH-2 e 3 livres e/ou OH-4 e 6 livres (Boeseken, 1949). Assim por analogia pode-se dizer que a distribuição dos substituintes ácidos e básicos na unidades manopiranosose devem

⁺ Entende-se por DS a relação molar de grupos substituintes com unidades de anidro-manose.

afetar a complexação com antimônio. Desta forma dependendo do DS dos substituintes ácidos e básicos, pode haver também a formação de complexos de antimônio, embora a estereoquímica dos mesmos fique desconhecida (XXVIa e XXVIb).



XXVIa



XXVIb

Nos parágrafos seguintes, serão discutidos os seguintes itens: extração da manana e a preparação de seus derivados; determinação do DS nas várias preparações e as distribuições dos substituintes nas unidades de manopirranose no polissacarídeo. A complexação da manana e de cada derivado será descrita coletivamente, bem como os testes biológicos realizados *in vitro*. A atividade leishmanicida do complexo Man-Sb será também relacionada com a atividade do composto atualmente empregado no tratamento de leishmaniose no Brasil, o Glucantime.

2. PREPARAÇÃO DA MANANA DE LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO

A maioria das leveduras contém em suas paredes, mananas, ou heteropolissacarídeos contendo manose, glucose e outras aldoses (Gorin & Spencer, 1970). Afim de extrair esses

polissacarídeos, a levedura de panificação foi aquecida em solução aquosa alcalina e o produto foi fracionado, utilizando-se solução de Fehling (Jones & Stoodley, 1965). O complexo cúprico insolúvel de manana foi decomposto através da resina Amberlite IR-120 (forma H^+), liberando manana, com rendimento de 2,2 %.

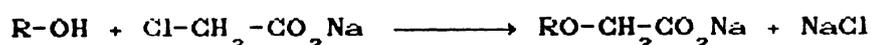
A Figura 1 mostra a estrutura química da manana (Lee & Ballou, 1965), a qual apresenta uma cadeia principal de α -D-manopiranosose com ligações (1 \rightarrow 6), que é substituído na posição 2, com cadeias laterais de manopiranosose contendo ligações α -(1 \rightarrow 2) e α -(1 \rightarrow 3).

3. CM-MAN

3.1 - Preparação do derivado CM-man

O método descrito para a preparação de derivados CM-celulose e de pachyman (Stone, 1962; Green, 1963), com cadeia linear 3-O-substituída de β -D-glucana isolada do fungo *Poria cocos*, foi aplicado à manana.

O método consistiu em dissolver a manana em um pequeno volume de hidróxido de sódio aquoso a 30 %, o qual foi agitado e dispersado na presença de um excesso de 2-propanol. A presença desse solvente apolar foi necessária para que o ácido monocloroacético reagisse mais facilmente com a manana. A reação pode ser representada, simplesmente, como segue:



Podemos considerar, pois, que a reação acima é do tipo SN_2 , bimolecular e nucleofílica.

Após essa etapa, o excesso de álcali foi neutralizado com ácido acético glacial e o cloreto de sódio foi removido, lavando o sistema com metanol contendo 30% de água, no qual o polissacarídeo foi insolúvel.

3.2 - Determinação do DS

O DS de substituintes CM nos vários grupos hidroxilas em manana foi controlado pelo tempo de incubação a 55°C. O valor considerado ideal (0,25) foi atingido quando a mistura de reação foi incubada por 40 minutos, conforme mostra a Tabela I.

A determinação do DS do grupo CM em manana foi realizada por diferentes técnicas, nas quais foram adaptadas as técnicas empregadas na determinação do grupo CM em celulose.

3.2.1 - Método do sal cúprico (McLaughlin & Herbst, 1950)

O primeiro método utilizado para a determinação do DS do grupo CM em manana consistiu em adicionar nitrato de cobre a 10 %, a uma solução de manana, na forma de sal de sódio, de forma a se observar a produção de um precipitado, a medida que se aumenta o pH. A viabilidade deste método está, pois, na dependência da mudança de pH.

Assim, em pH 4,5, há apenas a formação do precipitado CM cúprico e, em pH superiores, há formação de hidróxido cúprico. A existência dessas mudanças foi demonstrada por titulações potenciométricas conforme mostram as Figuras 2a e 2b.

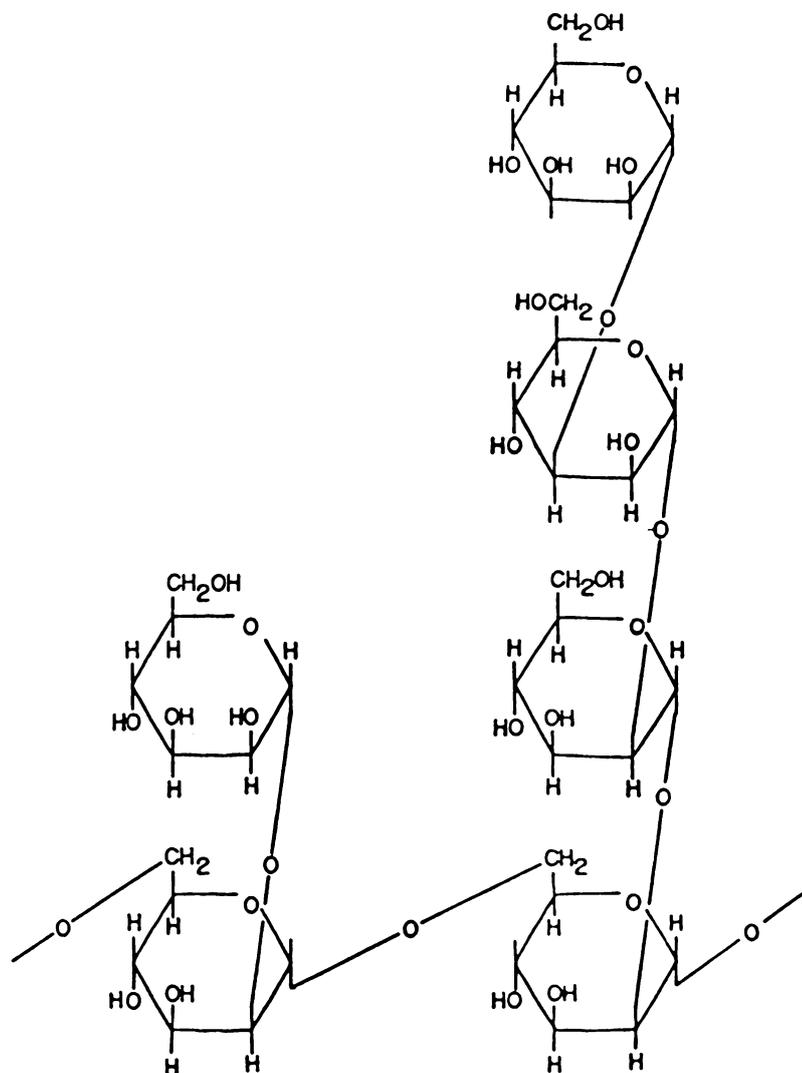


FIGURA 1 - Estrutura química da manana (Lee & Ballou, 1965)

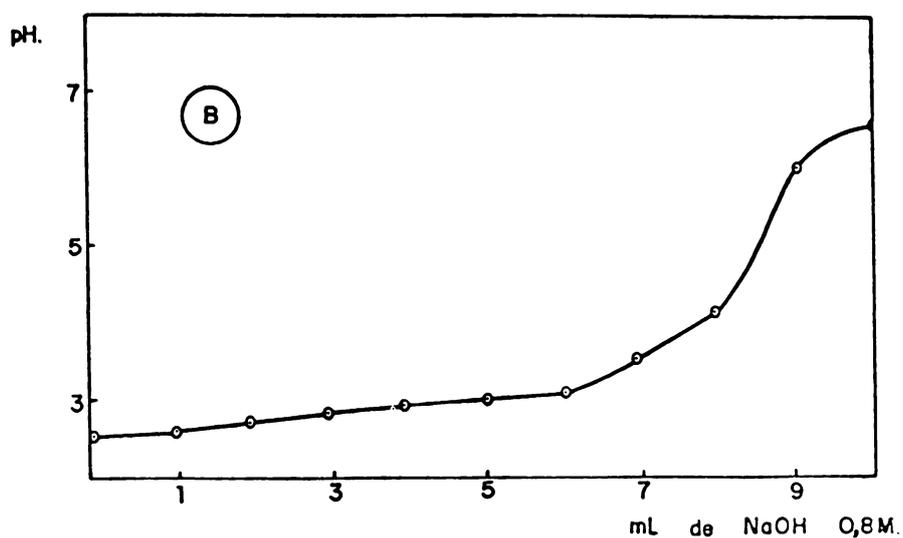
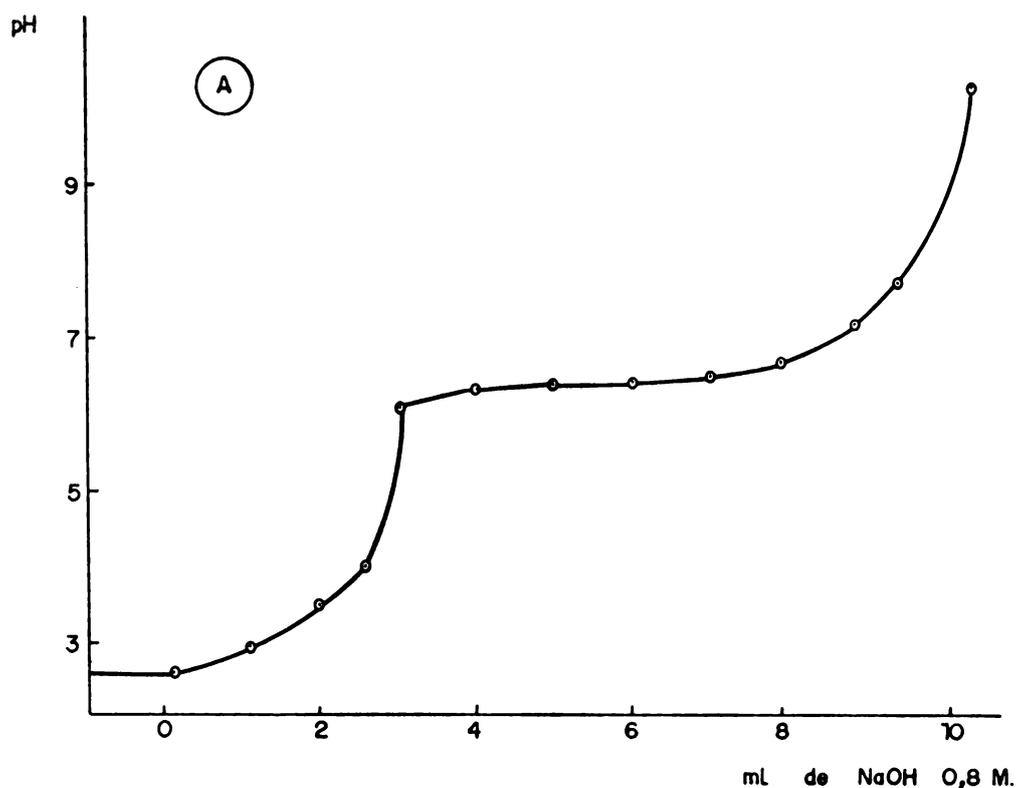
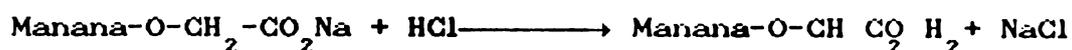


FIGURA 2 - a) Titulação de uma solução acidificada de nitrato de cobre a 1%, com uma solução de hidróxido de sódio 0,8 M.
 b) Titulação de uma solução acidificada de nitrato de cobre e CM-man de sódio com uma solução de hidróxido de sódio 0,8 M.

encontrada por este método e o de lavagem ácida (da literatura) não foi superior a 0,05.

3.2.2 - Método do sal de sódio (McLaughlin & Herbst, 1950)

Outra maneira de analisar o DS de grupos CM em manana foi pelo método denominado sal de sódio, onde a quantidade desses grupos introduzidos na manana pôde ser avaliada pelo conteúdo de cloreto de sódio formado, após uma reação de substituição e ignição do produto a 600 °C, conforme mostra a reação abaixo:



Os resultados deste método estão na tabela I e foram considerados as partir de um branco de manana, considerando que o polissacarídeo poderia ter alguns sais provenientes de proteínas eventualmente existentes. Por este suposto, entretanto, o resultado foi considerado nulo, possivelmente devido a pequenas quantidades de material trabalhadas.

Embora seja este um método de simples execução, a sua reprodução depende, em especial, dos cuidados analíticos de pesagem. A tabela I indica que em relação ao método do sal cúprico, a diferença encontrada do DS dos grupos CM e manana não foi superior a 0,05 e que a diferença máxima para o método da lavagem ácida (literatura para o derivado CM de celulose) foi de 0,09.

3.2.3 - Método da lavagem ácida seguido por titulação (Stone, 1962)

A terceira forma de analisar o DS de grupos CM em manana foi pelo método da lavagem ácida, onde há conversão do sal carboximetil manana de sódio, na forma ácida, pelo tratamento com metanol acidificado com ácido nítrico. A remoção do excesso de ácido e nitrato formado, pode ser realizada dialisando a solução em sistema fechado, com água destilada. Desta forma, o produto ácido formado foi liofilizado e apresentou-se insolúvel em água. Este foi submetido a uma reação de salificação com certo volume de hidróxido de sódio 0,1 M. Assim, o excesso de base foi titulado com ácido sulfúrico 0,05 M e pela diferença entre o número de equivalentes titulados pelo ácido sulfúrico, pôde-se ter uma idéia do número de equivalentes ácidos presentes na manana, que, possivelmente, deve-se à presença de grupos CM.

Os resultados desta análise estão na Tabela I, onde a diferença para o método do sal sódico foi de 0,06 e para o método da lavagem ácida encontrado na literatura para a celulose foi de 0,04.

3.2.4 - Método da resina catiónica fortemente ácida seguido por titulação

A quarta forma de analisar o DS de grupos CM em manana foi pelo tratamento da manana substituída com resina catiónica fortemente ácida, seguido por titulação com hidróxido de sódio 0,1 M, análogo ao método da lavagem ácida. A diferença obtida por este método, em relação ao método anterior, não foi

TABELA I

DETERMINAÇÃO DO DS DOS GRUPOS CM EM VÁRIOS DERIVADOS DE MANANA UTILIZANDO MÉTODOS DIFERENTES

Tempo de incubação com reagentes (horas) ^a	DS do produto					
	Método utilizado *					
	A	B	C	D	E	F
0,33	0,07	0,03	0,08	0,03	0,08	-
0,67	0,26	0,25	0,24	0,25	0,26	0,23
1,25	0,40	0,37	0,43	0,37	0,43	0,40
2,50	0,48	0,52	0,54	0,52	0,64	0,50
3,50	0,67	0,75	0,78	0,75	0,79	0,70
5,00	0,81	0,75	0,78	0,78	0,79	-

*

A - Método do sal cúprico

B - Método do sal de sódio

C - Método da lavagem ácida seguido por titulação

D - Método da resina catiónica seguido por titulação

E - Método do nitrato de uranila

F - Método da lavagem ácida encontrado na literatura

a - Refere-se ao tempo de incubação da reação, a 55°C, quando adicionou-se ácido monocloroacético a uma solução de manana.

Entretanto, os métodos apresentados estabelecem apenas a proporção dos substituintes na manana, mas não denotam a sua distribuição entre os diferentes grupos hidroxilas.

3.3 - Determinação da distribuição dos substituintes CM em manana.

A distribuição dos substituintes CM na manana é de considerável interesse, porque sua posição afeta a absorção da molécula pelo macrófago e também afeta a complexação da manana com antimônio. O método da análise de metilação convencional, seguido por hidrólise ácida, não funciona, porque o éter CM é ácido e alcali estável. Por outro lado, embora seja possível derivatizar e examinar por g.l.c.-m.s., uma mistura de O-carboximetil-O-metil manoses, esse processo não é muito viável devido a ausência de padrões.

Um similar argumento aplica-se para ^{13}C -n.m.r. à análise de uma mistura de O-carboximetil-O-metil manoses. Com técnicas envolvendo oxidação com periodato, concomitante formação de ácido fórmico, não é suficientemente específico para localizar exatamente os substituintes. A degradação de Smith com a identificação de poliois resultantes, não funciona porque os éteres CM não são clivados com ácido. Assim, a única técnica que se apresentou viável foi a observação minuciosa do CM-manana por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r., cuja distribuição de sinais não aparece no espectro original da manana (Figura 3). Felizmente, os sinais foram estreitos e de fáceis interpretações.

Assim, a distribuição dos substituintes CM nos grupos

hidroxilas da manana (Figura 4) é semelhante àquela em CM-celulose (Parfondry & Perlin, 1976). Neste caso, os sinais de ^{13}C -n.m.r., foram largos, sendo necessário degradar com enzimas a amostra e examinar a mistura resultante de O-CM glucoses. Assim, foi possível atribuir os sinais de 2-O, 3-O e 6-O de derivados CM e mostrar que a substituição foi principalmente em 2-OH, com uma menor proporção em 0-6 e bem pouca em 0-3.

O espectro ^{13}C -n.m.r. de éter CM da manana (Figura 4) apresentou vários novos sinais, que podem ser utilizados em atribuições estruturais. Na região de C-1, apareceu um sinal em δ 101,2, que é um dos grupos redutores e da unidade substituída glicosidamente 0-3, ambos substituídos com CM em 0-2 (Gorin, 1973). O sinal é, em suma, o resultado de um deslocamento β de -2,5 p.p.m. de δ 103,7 e foi acompanhado por uma diminuição do tamanho deste sinal. A substituição a 0-2 é também evidenciada pelo sinal a δ 82,2 (deslocamento α de +10,2 p.p.m. do sinal de C-2 a δ 70,2), que tem uma área aproximadamente igual àquela a δ 101,2. Geralmente, os deslocamentos α que ocorrem em eterificação de grupos hidroxilas estão na faixa de +8 a +10 p.p.m. (Gorin, 1981). A eterificação a OH-2 também provocou uma mudança do sinal de C-3 da unidade 3-O substituída de 80,0 a 78,8 (deslocamento β de -1,2 p.p.m.).

Há evidências de eterificação a OH-6 das unidades das cadeias laterais. Apesar de não se observar o sinal de C-6, que deslocou de δ 62,7 (deslocamento α) para campo mais baixo, estando superposto em outros com a presença de um novo sinal a

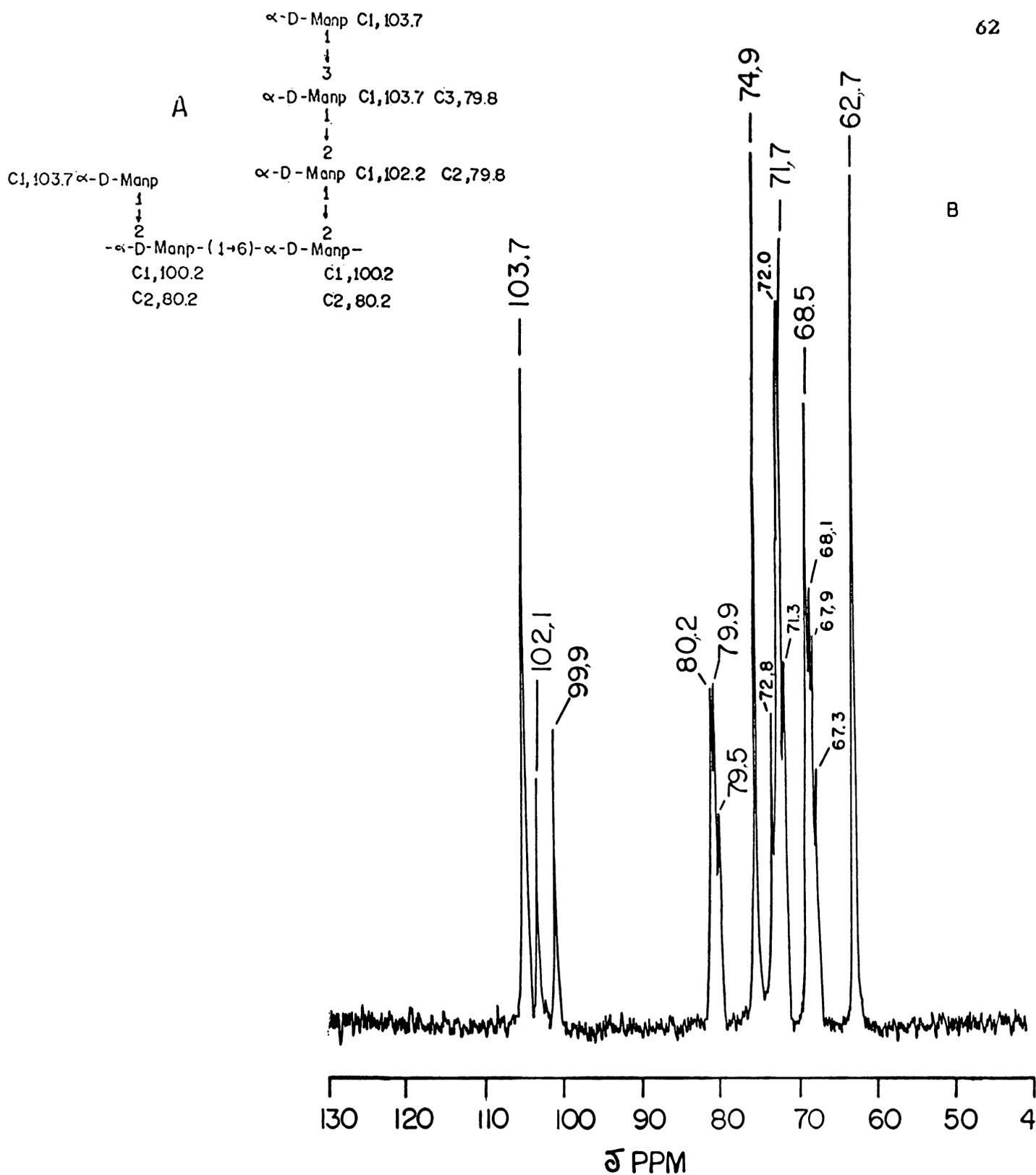


FIGURA 3- A) Representação esquemática da estrutura química de manana

B) Espectro ^{13}C -n.m.r. de manana em óxido de deutério (D_2O) a 70°C . Os deslocamentos são expressos em δ p.p.m.

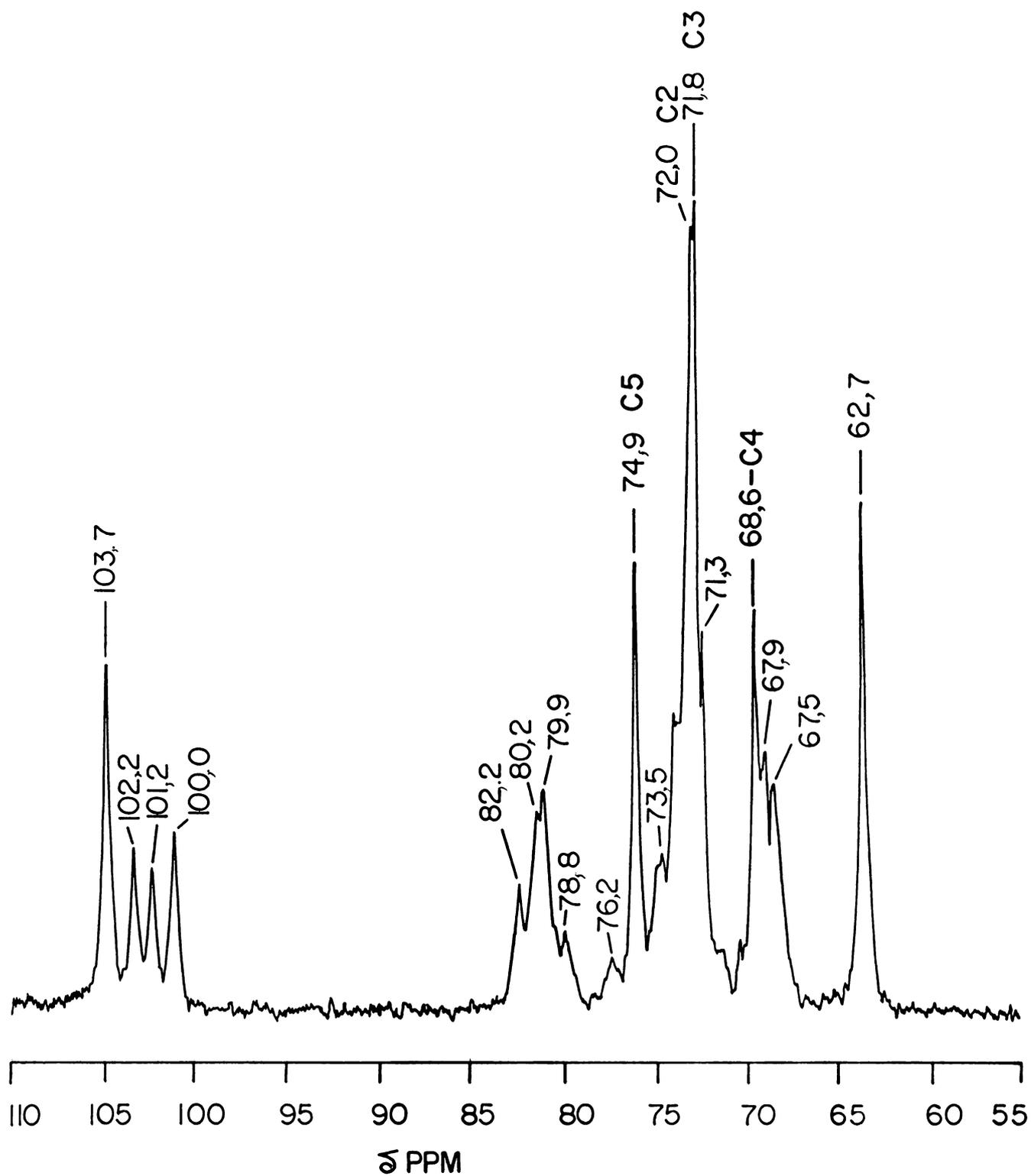


FIGURA 4 - Espectro ^{13}C -n.m.r. de CM-man, em óxido de deutério (D_2O) a 70°C . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

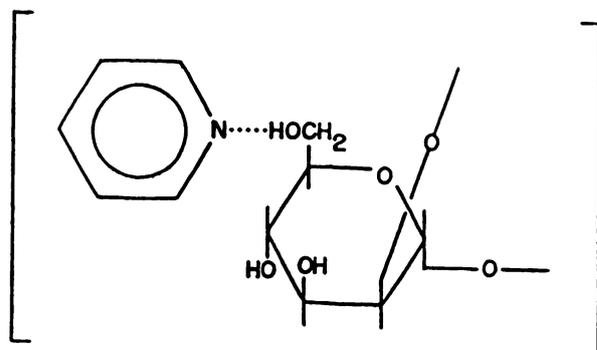
δ 73,5 compatível com um deslocamento do sinal a δ 74,9 (C-5) de -1,4 p.p.m.

Outro sinal atribuído no espectro é em δ 76,2 que aparece por causa de um deslocamento α de +8 p.p.m. do sinal δ 68 de C-4. Entretanto, essa atribuição é somente mais uma tentativa de explicação.

4. ÉSTER SULFATO DE MANANA

4.1 - Preparação do sulfato de manana.

Muitos métodos têm sido usados na produção de polissacarídeos sulfatados (Whistler & Spencer, 1954; *ibid*, 1961; O'Neill, 1955). A manana atual, em estudo, foi sulfatada com ácido clorosulfônico (O'Neill, 1955), em presença de piridina a 0°C. A piridina aumenta a reatividade da reação devido ao fato de formar pontes de hidrogênio com hidroxilas livres do polissacarídeo (XXVII), aumentando a nucleofilia dos grupos OH da manana (Haines, 1976).



XXVII

Os fatores que influenciam a reatividade dos grupos sulfatados são a geometria da molécula, a nucleofilicidade dos grupos atacantes, entre outros. A reação, neste caso, foi possivelmente favorecida pela formamida que é um solvente apolar e aprótico (Horton & Hutson, 1963). Assim, teve-se uma melhor dissolução da manana sem desativar o nucleófilo.

Por outro lado, o produto de um dado substrato depende também da temperatura. Na preparação de derivados sulfatados de alga *Laminaria* (polissacarídeo composto de unidades D-glucopirranose através de ligações β -glicosídicas (1 \rightarrow 3)) observa-se que, quando a reação ocorre entre 60 e 70°C, há um mais alto grau de sulfatação. No entanto, ocorre também a degradação do polissacarídeo com perda de suas propriedades (O'Neill, 1955). A manana em estudo foi sulfatada a 0°C conforme relatos de O'Neill (1955) e Whistler e Spencer (1961).

O alto grau de sulfatação varia com a proporção de ácido clorosulfônico adicionado numa reação (Whistler e Spencer, 1961). A sulfatação da manana com ácido clorosulfônico ocorreu facilmente, de forma que, com 0,45 mol/mol de agente sulfactante, obteve-se um DS de 0,32, conforme mostra a Tabela IV. Esta Tabela mostra também que, os DS aumentam à medida que maiores concentrações molares de ácido clorosulfônico são adicionados à reação. O DS considerado como ideal foi aquele mais próximo de 0,25, o qual foi semi-sintetizado em maiores proporções e depois o produto foi complexado com antimônio.

4.2 - Determinação do DS dos grupos sulfatados em manana

O DS de substituintes sulfatados nos vários grupos hidroxilas em manana foi controlado pela quantidade de agente surfactante adicionados à reação, quando esta foi incubada a 0°C (Tabela II).

A determinação do DS do grupo sulfato em manana foi realizada por 3 diferentes técnicas, que foram adaptadas de técnicas empregadas na determinação do sulfato de diferentes polissacarídeos.

4.2.1 - Método utilizando a precipitação do sulfato de bário. (Whistler & Spencer, 1961)

A determinação dos grupos sulfatos em manana foi avaliada pelo precipitado de sulfato de bário formado após a adição de cloreto de bário aquoso a uma solução de manana sulfatada. O refluxo do polissacarídeo com ácido clorídrico a 10 % deve hidrolisar e destruir a manana de forma que o ácido sulfúrico seja liberado e o precipitado de sulfato de bário formado possa ser estimado quantitativamente. Assim, foi possível avaliar a quantidade de grupos introduzidos no polissacarídeo, uma vez que os subprodutos foram eliminados durante o processo de lavagem do precipitado.

Esta técnica, embora seja bastante simples, requer cuidados quanto ao processo de filtração a fim de que seja reproduzível. Os resultados deste experimento estão na Tabela II.

4.2.2 - Método da resina catiônica fortemente ácida seguido por titulação.

Os ácidos sulfônicos são ácidos fortes que se encontram totalmente ionizados em solução aquosa. Seu grau de acidez deve-se ao fato do mesmo conter 2 átomos de oxigênio, ou seja, a carga do ion sulfonato encontra-se dispersa por 2 átomos de oxigênio. Assim, os ésteres sulfatados são ácidos mais fortes que os ácidos carboxílicos. Criando-se um gradiente de concentração adequado, como uma coluna de resina catiônica fortemente ácida, há uma troca efetiva dos ions sódio da manana sulfatada com os ions H^+ da resina $SO_3^-H^+$, de forma que o grupo sulfato ácido da manana pode ser avaliado, pela titulação, com hidróxido de sódio 0,1 M, que deve corresponder ao número de miliequivalente grama de manana sulfatada.

Por esta técnica, portanto, pode-se ter uma idéia do número de miliequivalentes ácidos presentes na manana, que deve corresponder, neste caso, à presença de grupos sulfatos. Os resultados desta análise estão na Tabela II.

4.2.3 - Método turbidimétrico (Dodgson & Price, 1962)

A avaliação do conteúdo éster de sulfato de polissacarídeos sulfatados, por este método, envolve hidrólise ácida, seguida pela determinação de sulfato inorgânico liberado, o qual foi medido turbidimetricamente.

Este método parece ser o mais satisfatório de todos os apresentados, devido ao fato de ser altamente sensível e muito fácil de executá-lo. É facilmente reproduzível, desde que siga a rigor, a técnica apresentada. Comparativamente, também,

pequenas quantias de material são requeridas, comparado a outros métodos. A principal limitação do método, deve-se a pequenas quantias de polissacarídeo pesado.

Na Tabela II estão os resultados desta análise. A diferença máxima encontrada para com os outros métodos apresentados não foi superior a 0,05, confirmando assim o DS de grupos sulfatados presentes na manana.

4.3 - Determinação da distribuição dos substituintes sulfatados em manana

Os derivados glicosídeos e outras hexoses, tendo o grupo hidroxila primário livre, são sulfatados primeiro nas posições C-6 e C-3, depois outras hidroxilas secundárias são substituídas. (Turvey, 1965).

Na preparação de monossacarídeos sulfatados (D-glucose, D-galactose e N-acetilglucosamina) é relatado que, utilizando-se ácido clorosulfônico a baixas temperaturas, obtém-se preferencialmente, 6-sulfato de monossacarídeos. O espectro infravermelho das frações monossulfatadas, por outro lado, mostrou uma banda de absorção típica em 1240 cm^{-1} em atribuição à vibração, envolvendo a ligação S-O. A Figura 5 mostra o espectro IV da manana e manana sulfatada, mostrando a mesma banda descrita por Lloyd (1962) em 1240 cm^{-1} na manana sulfatada.

Tendo em mente que a substituição dos grupos sulfatados ocorre principalmente na hidroxila primária da manana, a especificidade da substituição foi analisada por espectros de ^{13}C -n.m.r. O modelo encontrado por Honda et alii (1973) foi para o metil 3-O-metil-D-manopiranosose onde para o 6-sulfato

TABELA II

DETERMINAÇÃO DO DS DOS GRUPOS SULFATOS EM DERIVADOS SULFATADOS DE MANANA

Número de moles de ácido clorosulfônico ^a	DS do produto		
	Método utilizado *		
	A	B	C
0,45	0,29	0,31	0,27
0,62	0,40	0,43	0,37
1,25	0,66	0,65	0,63
1,87	1,32	1,28	1,26
2,50	1,67	1,64	1,65

A - Precipitação do sulfato de bário

B - Resina catiônica fortemente ácida, seguido por titulação

C - Turbidimétrico

^a - Refere-se ao número de moles gastos de ácido clorosulfônico para reagir com 1 mol de anidro-manose a 0°C.

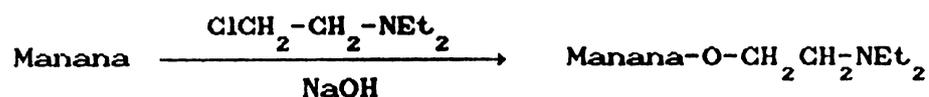
ocorre uma mudança α de +6,3 para C-5 e uma mudança β de -2,0 p.p.m.. O espectro ^{19}C -n.m.r. da manana sulfatada (Figura 5) mostrou poucas modificações em relação à manana original. A maior diferença observada é aquela cujo sinal em δ 72,8 é mais alto que na manana original, δ 74,8 o qual seria resultado sinal C-5 de unidades manopiranosil superposto a unidades sulfatadas na posição C-6, havendo um deslocamento de β de -2,0 p.p.m.

Todavia, deveria surgir um sinal C-6 sulfatado a 0-6 (δ 68-69) e não aparece porque há um deslocamento de aproximadamente +6 p.p.m., estando superpostos aos sinais C-4 de δ 67,4 para 68,6 (Figura 6).

5. DEAE-MANANA

5.1 - Preparação do DEAE-manana

A preparação de dietilaminoetilcelulose (DEAE-celulose) tem sido relatada por Hartmann (1930) e Bullock & Guthrie (1965), cujo material tem sido extensivamente usado para cromatografia de troca iônica. Com modificações adequadas, o método foi aplicado para a preparação de DEAE-manana, cuja reação é a seguir esquematizada.



A reação realizou-se a 85°C, em diferentes tempos de incubação. A Tabela V mostra que, à medida que se aumenta o tempo de incubação, o DS se eleva. O DS, considerado como ideal, foi quando a reação foi mantida a 85°C por 4 horas,

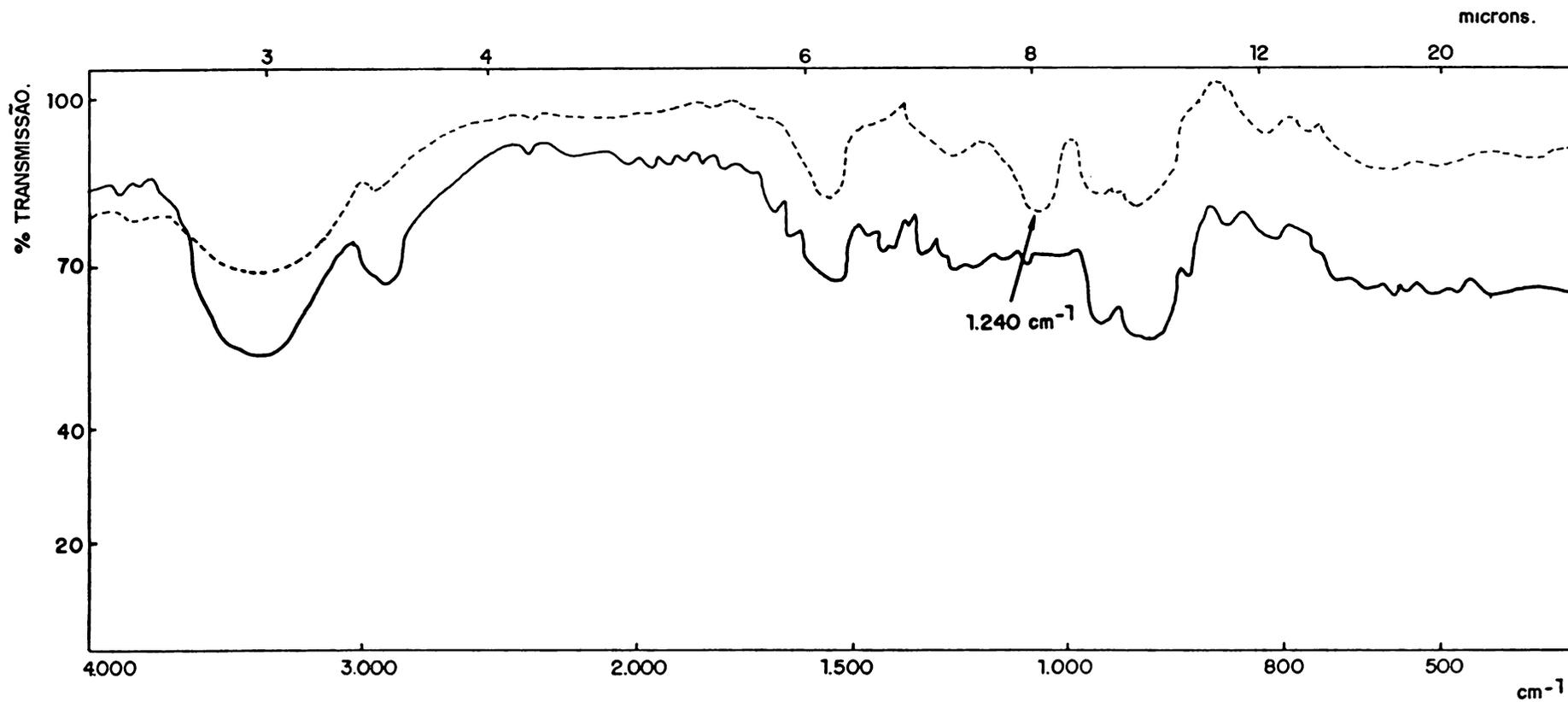


FIGURA 5 - Espectro IF de manana (————)

Espectro IF de manana sulfatada (-----)

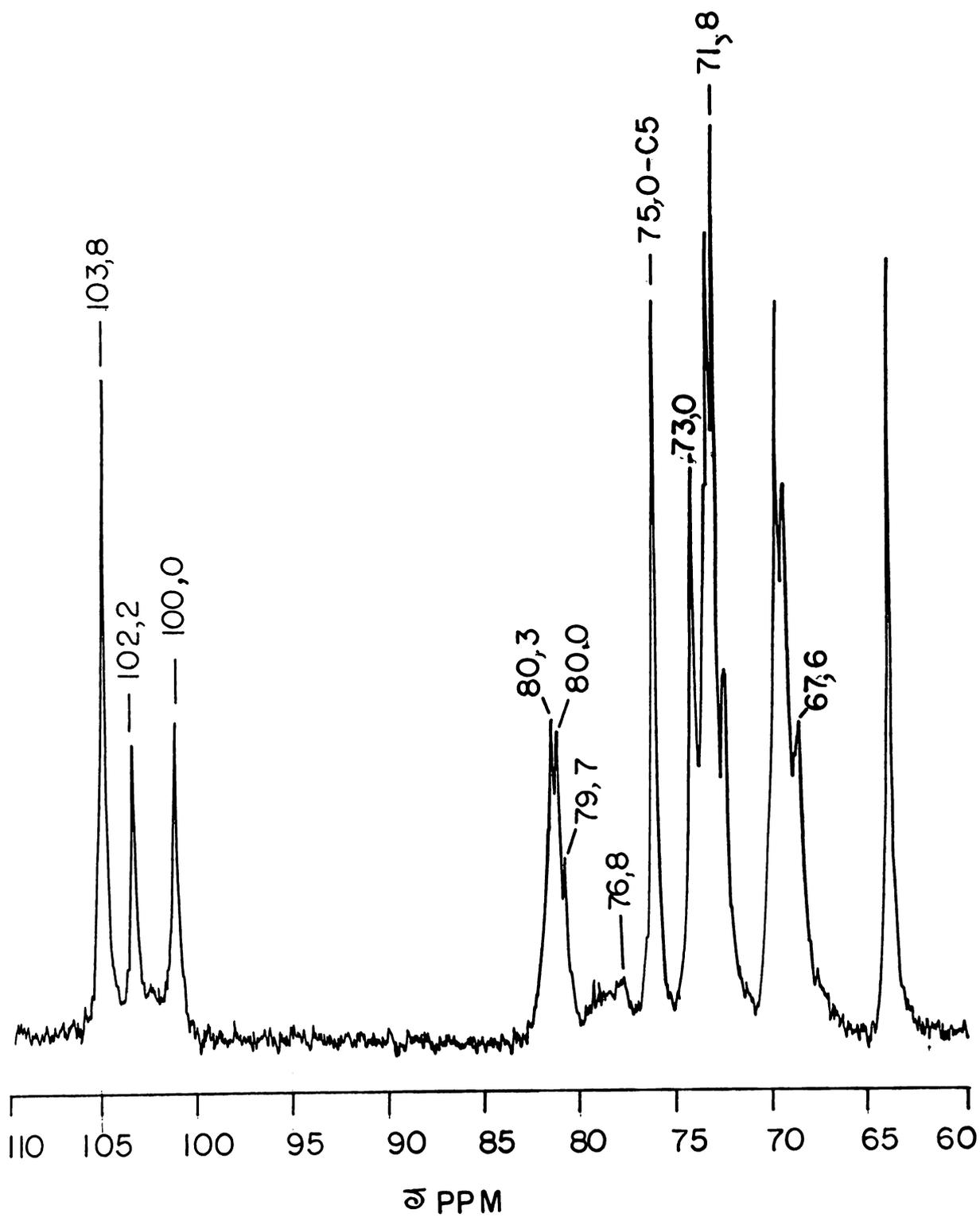
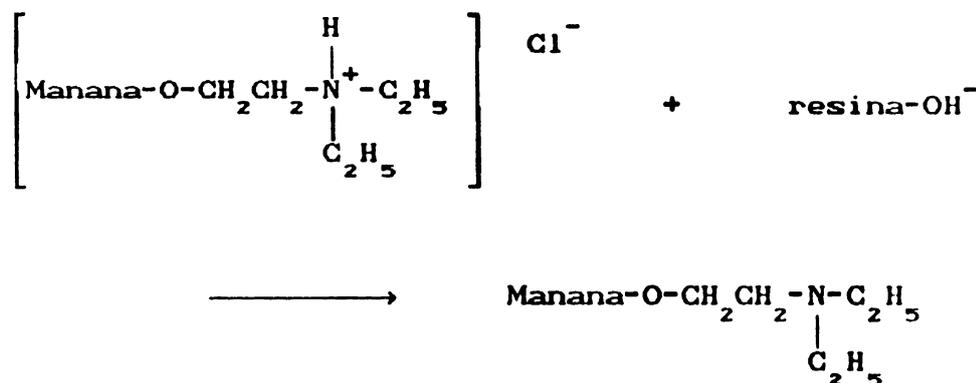


FIGURA 6 - Espectro ^{13}C -n.m.r. de manana sulfatada, em óxido de deutério (D_2O) a 70°C . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

obtendo-se um valor de 0,24 o qual foi produzido em maior escala.

5.2 - Determinação do DS dos grupos DEAE em manana

A determinação do DS do grupo DEAE em manana foi realizada somente pelo método da resina aniônica fortemente básica, seguido por titulação com ácido sulfúrico 0,05 M. Os íons H^+ do polissacarídeo substituído foram trocados pelas hidroxilas da resina, conforme esquema a seguir:



Desse modo, o produto básico foi titulado com ácido sulfúrico 0,05 M e, pelo número de equivalentes titulados pelo ácido, pode-se ter uma idéia do número de equivalentes básicos presentes na manana que, possivelmente, deve-se à presença de grupos DEAE. Os resultados deste experimento estão na Tabela III.

5.3 - Determinação dos substituintes DEAE na manana

O espectro ^{13}C -n.m.r. do derivado DEAE-manana (Figura 7) mostra sinais mais largos que os encontrados na manana original. Os sinais de DEAE-manana foram atribuídos como

segue. O sinal C-1 a δ 100,7 deveria ser uma unidade substituída a O-2 com DEAE, que sofreu um β -efeito de -3,0 p.p.m. (de δ 103,7). Este sinal foi aproximadamente do mesmo tamanho como aquele que aparece a δ 73,8 que é de C-5 e que sofreu um β deslocamento de -1,2 p.p.m. A substituição O-6, não foi encontrada porque, provavelmente, o sinal de C-6 foi superposto em outros sinais. Há também um sinal na região de δ 25,2 e 56,6 correspondente ao substituinte dietilaminoetil.

Assim, parece que há igual substituição de DEAE a O-2 e O-6 com uma menor proporção a O-4. Os sinais que surgem da substituição em O-3 não puderam ser encontrados.

6. ÉSTER FOSFATO DE MANANA

6.1 - Preparação do derivado fosfato de manana

O amido e a celulose tem sido fosforilados com o ácido tetrapolifosfórico a temperatura a 120°C (Towle & Whistler, 1972). Entretanto, a manana foi fosforilada com sais inorgânicos, devido à facilidade do método e obtenção dos sais, conforme técnica descrita por Paschall (1964).

Foi necessário utilizar 2 moles de sais inorgânicos (hidrogênio fosfato dissódico heptaidratado e di-hidrogênio fosfato de sódio monoidratado) reagentes e incubar a reação por 5 horas a 155°C a fim de se obter um produto cujo DS foi de 0,25 substituição esta considerada como ideal para a complexação com antimônio.

A Tabela IV mostra os DS quando se utilizaram 1 e 2 moles/mol de sais inorgânicos, em diferentes tempos de incubação. Observa-se que, com 1 mol/mol de fosfatos

TABELA III

DETERMINAÇÃO DO DS DO GRUPO DEAE EM MANANA PELO MÉTODO DA RESINA ANIÔNICA FORTEMENTE BÁSICA

Tempo de incubação com o reagente (horas) ^a	DS ^b
1,00	0,11
2,00	0,13
3,00	0,19
4,00	0,24
5,00	0,32
15,00	0,32

^a - Refere-se ao tempo de incubação, onde a reação foi incubada a 85°C, quando adicionou-se 2-cloro-trietilamina em uma solução de manana, mol/mol.

^b - Valores calculados a partir do nº de miliequivalentograma de manana com ácido sulfúrico 0,05 M, por grama de amostra.

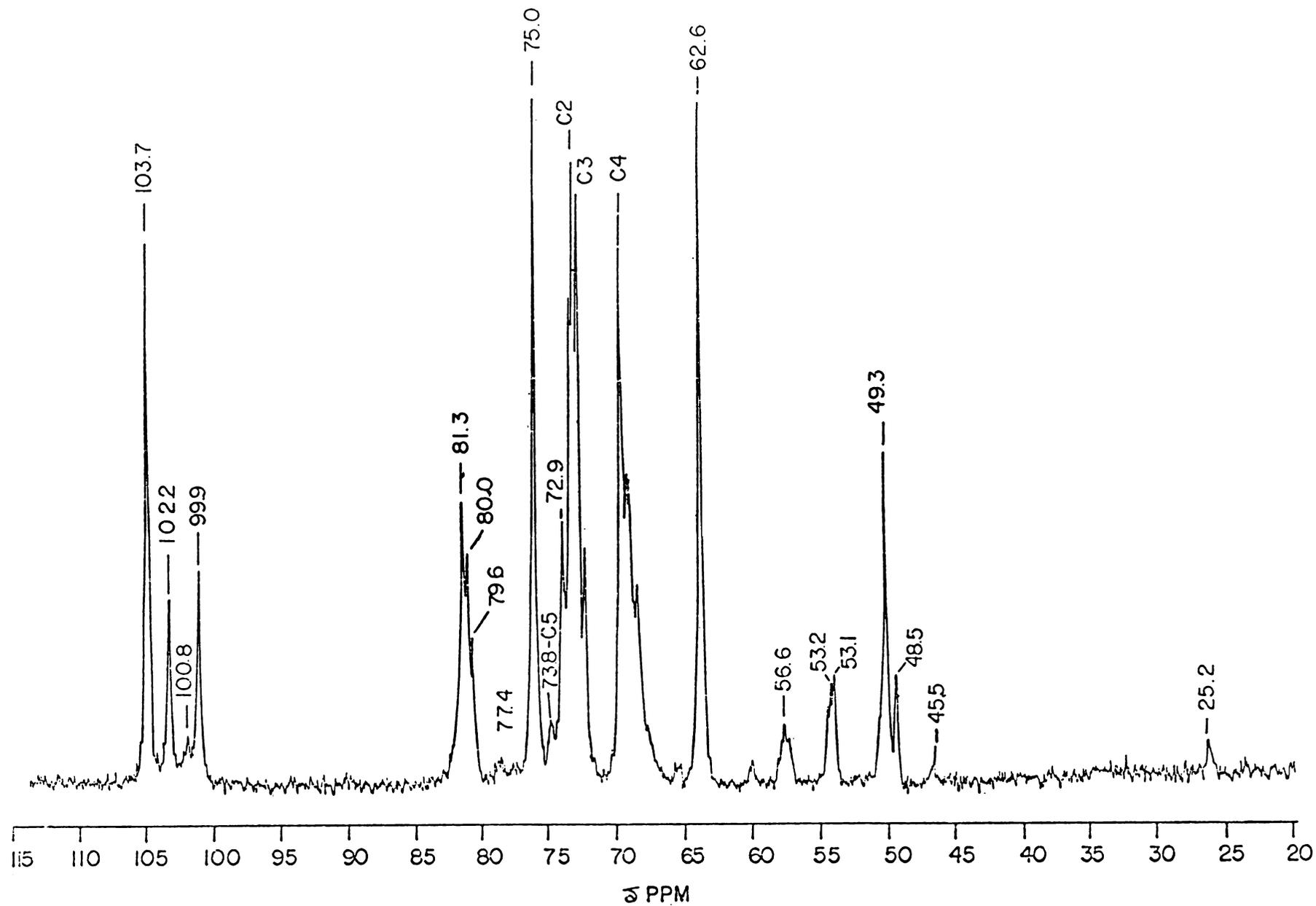


FIGURA 7 - Espectro ^{13}C -n.m.r., de DEAE-man, em óxido de deutério (D_2O) a 70°C . Os deslocamentos são expressos em δ p.p.m.

inorgânicos, o DS máximo obtido foi de 0,15. Por outro lado, com 2 moles de fosfatos inorgânicos reagentes, com 5 horas de incubação a 155°C, obteve-se um DS de 0,25. Estes resultados estão de acordo com a fosfatação do amido (Schimer et alii, 1986) onde, com um aumento da concentração de tampão fosfato de 1,0 para 2,0 M, houve um aumento significativo na velocidade da reação. Diferentes tempos de incubação e diferentes temperaturas proporcionaram diferentes DS. Assim, é provável, que temperaturas superiores a 155°C e um tempo de incubação além de 5 horas ocasione a degradação do polissacarídeo, com conseqüente perda de algumas de suas propriedades.

6.2 - Determinação do DS dos grupos fosfatos em manana

O DS de substituintes fosfatos nos vários grupos hidroxilas em manana foi controlado pelo tempo de incubação e quantidade de reagentes inorgânicos adicionados, conforme mostra a Tabela IV.

A determinação do DS do grupo fosfato em manana foi realizada por diferentes técnicas, conforme apresentamos a seguir:

6.2.1 - Método da resina catiônica fortemente ácida seguido por titulação.

A primeira forma de avaliar a substituição dos grupos fosfatos em manana, foi adicionar resina catiônica fortemente ácida a uma solução de manana fosfato de sódio, a fim de que houvesse a troca dos íons Na^+ no polissacarídeo, pelo íon da

resina.



Assim, o produto ácido foi titulado com hidróxido de sódio 0,1 M e, pelo número de miliequivalentes ácidos titulados pela base, pode-se ter uma idéia do número de equivalentes ácidos presentes na manana, que, possivelmente, deve-se à presença de grupos fosfatos. Os resultados deste experimento estão na Tabela IV.

6.2.2 - Método espectrofotométrico de molibdovanadato.

A determinação de fósforo em manana pode ser avaliada, também, por preliminar destruição da matéria orgânica e conversão do fósforo em ortofosfato. A matéria orgânica foi destruída utilizando-se ácido nítrico a 29 % e ignição a 650°C (Chen et alii, 1956).

O método consiste na formação de um complexo nitrovana-domolibdico amarelo, que é proporcional à taxa de fósforo inorgânico presente, o qual foi medido colorimetricamente.

Os resultados do experimento estão na Tabela IV, onde pode-se observar que a diferença deste método para com o método da resina catiónica fortemente ácida foi basicamente desprezível.

6.2.3 - Método espectrofotométrico, sulfomolibdico.

Este método utiliza também a destruição da matéria orgânica para determinação de fósforo. O princípio do método

TABELA IV

DETERMINAÇÃO DO DS DOS GRUPOS FOSFATOS EM DERIVADOS FOSFORILADOS DE MANANA.

Tempo de incubação com o reagente (horas) ^a	Nº de moles de reagente/ anidro manose					
	1			2		
	A	B	C	A	B	C
	DS DO PRODUTO ^b					
1,0	0,03	0,02	0,02	0,05	0,05	0,07
2,0	0,06	0,05	0,05	0,10	0,09	0,10
3,0	0,09	0,09	0,10	0,15	0,15	0,17
5,0	0,15	0,16	0,15	0,25	0,25	0,25

A - Método da resina catiônica fortemente ácida, seguido por titulação.

B - Método espectrofotométrico molibdovanadato.

C - Método espectrofotométrico sulfomolibdico.

^a - Refere-se ao tempo em que a reação foi incubada a 155°C quando, a uma solução de manana, foram adicionados 1 e 2 moles/mol de sais de fosfatos inorgânicos.

^b - Refere-se ao DS dos grupos fosfatos inseridos no polissacarídeo, quando adicionaram-se 1 e 2 moles de sais fosfatos inorgânicos a uma solução de 1 mol de manana.

baseia-se na reação dos íons fósforos com molibdênio em meio ácido, formando um complexo amarelo, que foi reduzido a azul-molibdênio, o qual foi medido colorimetricamente (Chen et alii, 1956).

Este método é facilmente reproduzível e os resultados são compatíveis com o método molibdovanadato.

6.3 - Determinação da distribuição dos substituintes fosfatos na manana.

A seletiva fosforilação da glucose tem sido realizada por reação direta da glucose com ácido metafosfórico a 80°C, deixando o sistema em incubação de 30 a 40°C (Viscontini & Olivier, 1953). A fosforilação da glucose tem sido relatada, também, pelo uso de ácido fosfórico, onde o sistema foi incubado a 25°C, por 16 horas (Seegmiller & Horecker, 1951). Em ambas as reações observou-se que a esterificação ocorreu preferencialmente na posição OH-6. Portanto, é de se esperar que com manana a reação deverá ocorrer, favorecendo a substituição do grupo fosfato nesta posição..

O espectro ^{13}C -n.m.r. (Figura 8) mostrou, por sua vez, um deslocamento do sinal de C-6 62,7 a 64,4 (deslocamento de +1,7 p.p.m.). Este valor está de acordo com o que ocorre na 6-OH fosforilação de manopiranosose (Gorin, 1973b).

7. - REAÇÃO DA MANANA E SEUS DERIVADOS COM ANTIMÔNIO

Os complexos de antimônio com carboidratos podem ser formados pela ação coloidal com pentóxido de antimônio. Tal reação foi usada no caso do *N*-metil-D-glucamina e do gluconato

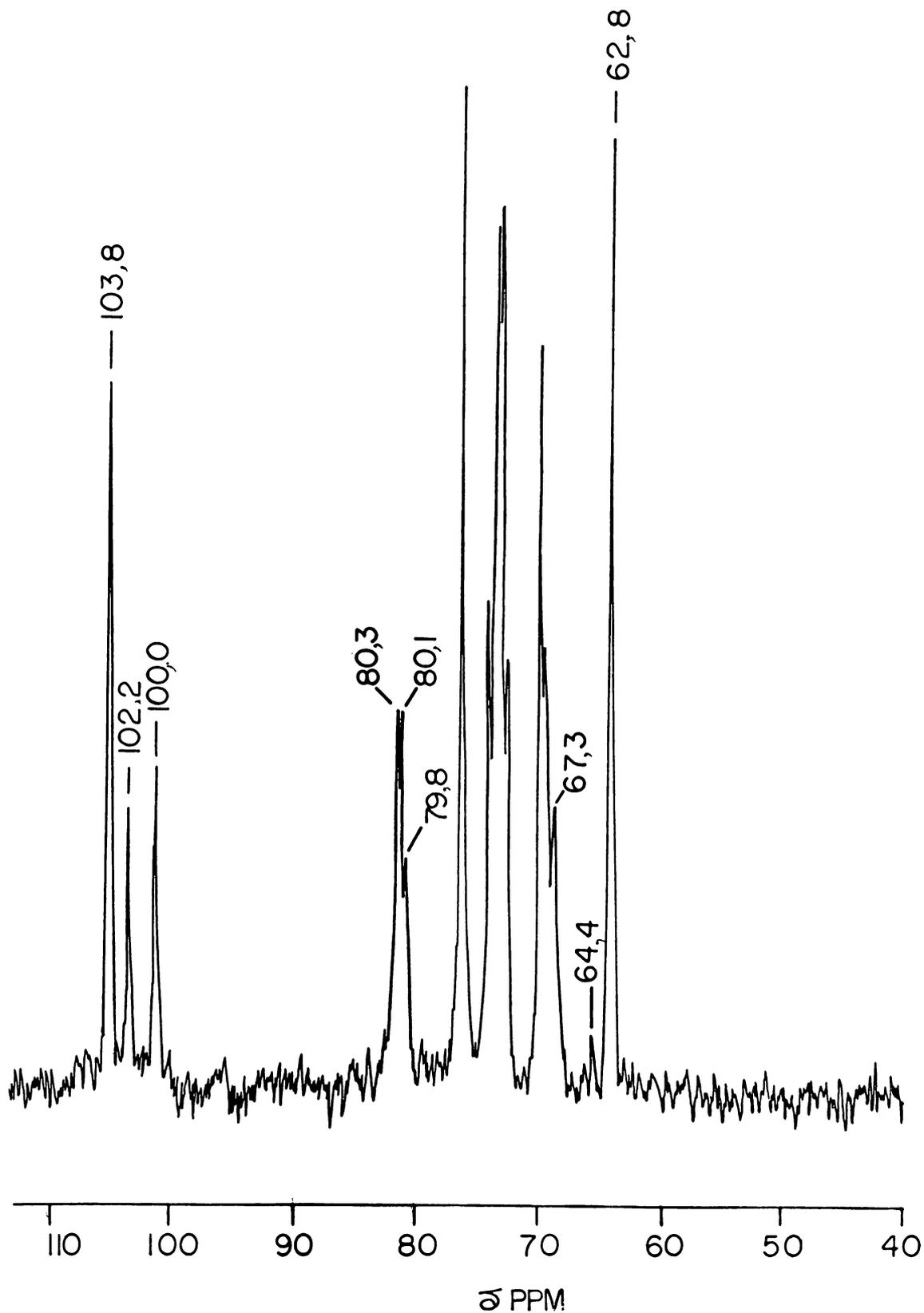


FIGURA 8 - Espectro ^{13}C -n.m.r. de Fosf-man, em óxido de deutério (D_2O) a 70°C . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

de sódio, para a preparação de drogas antimoniais para o tratamento das leishmanioses, onde um óxido de antimônio pode ser produzido. O pentacloreto de antimônio foi adicionado a uma solução de polissacarídeo em água, de forma que a concentração de ácido clorídrico produzido não fosse suficientemente alta para hidrolisar as ligações glicosídicas. Após 5 minutos, a reação foi neutralizada com bicarbonato aquoso, formando provavelmente antimoniato de sódio $[\text{NaSb}(\text{OH})_6]$ (Jolly, 1966), que é pouco solúvel em água. O aquecimento a 60°C fez necessário a fim de liberar todo dióxido de carbono formado durante a reação, bem como delimitar o término da reação de pentóxido de antimônio com a manana e seus derivados. Todos os produtos formados insolúveis em água foram eliminados após o processo de centrifugação:



O cloreto de sódio, foi também eliminado quando o complexo polissacarídeo-antimoniato foi precipitado em metanol ou quando a solução foi dialisada e o produto preparado foi liofilizado.

8. - ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ANTIMÔNIO DOS POLISSACARÍDEOS COMPLEXADOS

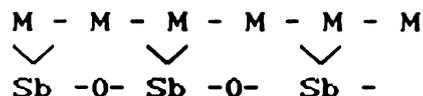
Diferentes quantidades de pentacloreto de antimônio foram adicionadas a manana e mananas substituídas, seguido do processo de precipitação em metanol ou diálise. A Tabela V

mostra que o conteúdo de antimônio em tais compostos é proporcional ao agente complexante adicionado. Essa Tabela mostra também que o conteúdo de antimônio de amostras dialisadas é menor que aquele, quando precipitado em metanol. Esta diferença deve-se provavelmente a perda de Sb pela diálise (Esquema I). Entretanto, parece que nem todo antimônio passa através do saco de diálise. Possivelmente, isto deve-se a formação de um complexo multivalente de manana com um polímero de Sb_2O_5 (II) conforme mostra o Esquema II.

ESQUEMA I



ESQUEMA II



A determinação do conteúdo de antimônio foi realizada por 2 diferentes técnicas, das quais foram modelos adaptados da literatura.

8.1 - Método espectrofotométrico (Vogel, 1981, p. 544)

O princípio deste método baseia-se na formação do ácido tetraiodo antimônico ($HSbI_4$) quando o antimônio V é tratado com excesso de solução de iodeto de potássio, em solução de ácido sulfúrico.

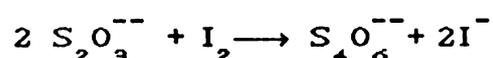
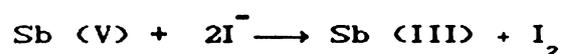
Na Tabela V estão os resultados desta análise, onde

podemos observar que o conteúdo de antimônio é proporcional a quantidade de pentacloreto de antimônio adicionado na reação. Assim, quando utilizou-se 2,3 moles/mol de pentacloreto de antimônio e o polissacarídeo foi precipitado em metanol obteve-se um % de Sb de 9,7 para manana, 8,6 CM-man, 7,9 para Sulfato-man, 8,8 para DEAE-man e 8,5 para Fosf-man. Para cada um desses compostos o conteúdo de Sb diminui quando se utiliza 1,56 moles de pentacloreto de antimônio e decai ainda mais quando utiliza-se 0,78 mol do mesmo reagente. Assim, fica evidente que a concentração do reagente é fator determinante no conteúdo de antimônio encontrado.

Esta Tabela indica também que a presença de grupos substituintes na manana desfavorece a complexação do antimônio com o polissacarídeo, provavelmente devido a impedimento estérico e pelo fato de ter menor número de hidroxilas livres para complexar com antimônio.

8.2 - Método da titulação (Vogel, 1981, p. 285)

Este método baseia-se na redução de antimônio V para antimônio III, com liberação de iodo livre, o qual titula-se com tiosulfato de sódio em presença de amido. O desaparecimento de cor azul indica o final da titulação. O ácido tartárico se faz necessário nesse processo de titulação



para atuar como agente complexante e impedir a

TABELA V

DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ANTIMÔNIO COM MANANA E MANANAS SUBSTITUÍDAS PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO (Vogel , 1981 p. 544).

MATERIAL COMPLEXADO	A (2.3)		B (1.56)		C (0.78)	
	d	D	d	D	d	D
Manana	9,7	3,6	6,4	2,5	3,1	1,5
CM-man	8,6	1,3	4,8	0,9	2,9	0,5
Sulfato-man	7,9	1,1	4,3	0,8	2,5	0,3
Fosf-man	8,5	1,2	5,1	0,9	2,8	0,4
DEAE-man	8,8	1,4	4,7	1,0	2,6	0,5

A, B e C - Refere-se ao percentual de antimônio quando utilizaram-se na reação 2,3; 1,56 e 0,78 moles/mol de pentacloreto de antimônio respectivamente.

d e D - Refere-se a complexação de polissacarídeos com antimônio quando estes foram precipitados em metanol e dialisadas, respectivamente.

NOTA: O conteúdo de Sb foi determinado também para o Glucantime e foi igual a 21,8%.

TABELA VI

DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ANTIMÔNIO NO COMPLEXO MAN-Sb
E MAN-Sb SUBSTITUÍDAS PELO MÉTODO DE TITULAÇÃO (Vogel,
1981, p. 285)

Material Complexado ^a	A
Manana	3,6
CM-man	3,0
Sulfato-man	2,8
DEAE-man	2,9
Fosf-man	3,0

A - Refere-se ao percentual de antimônio quando utilizou-se
0,78 mol/mol de pentacloreto de antimônio.

^a - Refere-se aos complexos de polissacarídeos com antimônio
quando estes foram precipitados em metanol.

NOTA: O conteúdo de Sb foi determinado também para o
Glucantime e foi igual a 21,8%.

precipitação de antimônio sob a forma de hidróxido ou como sal básico em solução alcalina. O conteúdo de antimônio é estimado a partir do número de equivalentes gastos que deve corresponder, possivelmente, ao número de equivalentes de antimônio.

Na Tabela VI encontram-se os resultados do conteúdo de antimônio quando o complexo polissacarídico foi precipitado em metanol e quando a quantidade de reagente utilizada na reação foi de 0.78 mol/mol. Os valores encontrados para este método em relação ao método espectrofotométrico não foram superiores a 0.05, mostrando uma maior confiabilidade aos resultados encontrados anteriormente.

9. - TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

9.1 - Obtenção de culturas de macrófagos e de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Os macrófagos são células capazes de ingerir partículas e substâncias solúveis. As espécies do gênero *Leishmania* têm como habitat o próprio SMF. Assim, os testes biológicos foram realizados a partir de culturas de macrófagos infetados por formas amastigotas da espécie *L. (L.) amazonensis* o qual foi obtido da lesão da pata de hamster ou camundongo Balb/c .

Embora as leishmanias não possuam ação tóxica sobre os macrófagos, esses acabam por romper-se devido à reprodução intracelular intensa do parasita (Medina et alii, 1955). Por outro lado, os macrófagos não destroem as leishmanias, de forma que a reprodução do parasita e a invasão de outros

macrófagos contribuem para a evolução da lesão leishmaniótica.

Experimentalmente consegue-se pois reproduzir a doença retirando formas amastigotas do parasita de uma lesão e inoculá-las em uma cultura de macrófagos *in vitro* ou em animais. A escolha do hamster utilizado nos testes biológicos deve-se ao fato de que a infecção desenvolvida nesses animais produz um quadro muito semelhante aos que se verifica em outros mamíferos. Por outro lado, o granuloma formado no camundongo não regride espontaneamente, apresentando, via de regra, um grande número de amastigotas (Medina et alii, 1955).

9.2 - Determinação da atividade leishmanicida da Man-Sb e seus derivados sobre macrófagos peritoniais de camundongos albinos infetados com *L. (L.) amazonensis*

As drogas escolhidas para testes preliminares *in vitro* foram aquelas cuja conteúdo de antimônio foi em torno de 3.1.%* ou seja, aquelas drogas preparadas com 0,78 mol/mol de pentacloreto de antimônio e precipitadas em metanol. A escolha de tais compostos deve-se ao fato de que maior conteúdo de antimônio leva também a uma maior insolubilização do produto. Comparativamente, como controle, utilizou-se manana em iguais condições. As concentrações utilizadas de tais compostos foram de 1,0, 2,0 e 3,0 mg/ml.

Os resultados deste experimento estão na Tabela VII onde

* Como os complexos de antimônio com os polissacarídeos precipitados em metanol, mostraram-se parcialmente insolúveis em água, foi necessário separar a parte solúvel, (com rendimento de aproximadamente 50%) e determinar o conteúdo de antimônio que foi 0.88%. Este foi o percentual real da drogas testadas.

TABELA VII

RESPOSTA *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS ALBINOS INFETADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis* COM A MANANA-Sb E SEUS DERIVADOS COMPLEXADOS COM ANTIMÔNIO.

Polissacarídeo	Concentração do polissacarídeo								
	1 mg / ml			2 mg / ml			5 mg / ml		
	I ^a	AM ^b	IF ^c	I ^a	AM ^b	IF ^c	I ^a	AM ^b	IF ^c
Manana	95	3	285	94	3	282	MφD	*	*
Man-Sb	54	1,7	91,3	16	0,16	2,56	5,0	0,06	0,12
CM-Man-Sb	58	1,75	101,5	35	1,27	44,5	30	0,65	*
Sulfato Man-Sb	70	1,2	84	Mφd	*	*	*	*	*
DEAE-Man-Sb	26	0,4	10,4	Mφd	*	*	MφD	*	*
Fosf-Man-Sb	92	1,5	138	3,0	1,43	42,9	2,8	0,67	*

I^a- Porcentagem de macrófagos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*

AM^b- Número médio de protozoário por macrófago

IF^c- Índice fagocitário (I x AM)

MφD - Macrófago destruído

Mφd - Macrófago danificado

* - Experimentos não realizados

podemos observar que a porcentagem de destruição dos parasitas para culturas tratadas com 1 mg/ml de Man-Sb foi de 68% e 99% quando se utilizou 2 mg/ml de Man-Sb comparadas ao controle (macrófagos tratados com Man). Com esses dados podemos concluir que, embora os macrófagos tenham receptores para manosídeos, o antimônio é um elemento necessário para destruição dos parasitas.

Conforme podemos observar ainda na Tabela VII os melhores derivados foram DEAE-man-Sb seguido de Sulfato-man-Sb quando se compara os resultados na concentração de 1 mg/ml. Embora o DEAE-man-Sb tenha destruído 96% dos amastigotas intracelulares na concentração de 1 mg/ml, a nossa escolha por Man-Sb não substituída foi devido a solubilidade deste complexo quando comparado à DEAE-man-Sb. Além disso, o DEAE-man-Sb causou alterações morfológicas ou destruiu os macrófagos nas concentrações de 2 e 5 mg/ml respectivamente. A relativa eficiência dos complexos de Man-Sb e seus derivados utilizando-se 2 mg/ml foi: Man-Sb > Fosf-man-Sb e CM-man-Sb . Portanto, a droga de escolha para os experimentos posteriores foi a forma mais simples: o próprio complexo Man-Sb.

9.3 - Cinética da ação de diferentes concentrações de Man-Sb sobre macrófagos peritoniais de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*

A atividade leishmanicida do complexo Man-Sb foi examinada utilizando-se macrófagos peritoniais de camundongos albinos infectados com formas amastigotas de *L. (L.)*

amazonensis.

Os testes foram realizados *in vitro* e *in vivo* com diferentes concentrações de Man-Sb, (corresponde a 4,4 $\mu\text{g/ml}$ de Sb). Os controles utilizados foram os macrófagos infectados tratados com PBS, manana e Glucantime.

A Figura 9a mostra os macrófagos 2 dias após a infecção, quando iniciado o tratamento com Man-Sb. A seta indica o vacúolo parasitóforo contendo inúmeras formas amastigotas. A Figura 9b mostra os macrófagos infectados 3 dias após o tratamento com 500 $\mu\text{g/ml}$ de Man-Sb (corresponde a 4,4 $\mu\text{g/ml}$ de Sb). É possível observar-se que os macrófagos readquiriram o seu aspecto normal, tendo desaparecido o vacúolo parasitóforo e as formas amastigotas. A viabilidade das células no início do tratamento e 3 dias após, foi de 98%, como avaliada pela exclusão do azul de Trypan.

A Figura 10 representa a cinética de destruição das formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* nos macrófagos tratados com diferentes concentrações de Man-Sb. Pode-se observar que a manana por si só não é ativa. Por outro lado, quando se utiliza o complexo Man-Sb nas concentrações de 4,4 e 6,6 $\mu\text{g/ml}$ de Sb, em apenas 3 dias há acentuada destruição das formas amastigotas. Pode-se observar ainda por essa Figura que após 5 dias de tratamento houve uma destruição de aproximadamente 3 vezes mais parasitas quando foi utilizado Man-Sb em relação ao Glucantime na mesma concentração de Sb. Por outro lado, a manana não apresentou qualquer efeito sobre as formas amastigotas nos macrófagos.

9.4 - Efeito leishmanicida do complexo Man-Sb na presença de manana e manose

Com o objetivo de verificar se a penetração de Man-Sb nos macrófagos ocorre via receptor de manose foi feito um ensaio de competição com manana e manose.

A Figura 11 mostra que concentrações crescentes de manana administrada concomitantemente à Man-Sb inibem proporcionalmente a destruição mediada pelo complexo. Resultados semelhantes foram obtidos quando se utilizaram concentrações crescentes de manose. Os dados mostram assim que há uma gradativa penetração da droga no macrófago, provavelmente via receptor de manose. Este receptor é muito bem caracterizado, estando presente exclusivamente na superfície de macrófagos. Assim, pudemos observar que a ação do complexo Sb é dependente do receptor manosil, pois aumentado a concentração de manana ou manose há uma diminuição proporcional na destruição do parasita.

9.5 - Efeito do complexo Man-Sb sobre as lesões de pata de hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Os hamsters foram infectados com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e 45 dias após a infecção iniciou-se o tratamento com Man-Sb por via sub-cutânea, como descrito.

Como pode ser visto na tabela VIII até cerca de 22 dias após o tratamento houve uma significativa redução do tamanho das lesões nos animais tratados com Man-Sb, comparável àquela observada nos animais tratados com Glucantime.

Os animais tratados com Man-Sb por via intraperitoneal

não apresentaram redução das lesões em relação aos controles, assim como aqueles tratados com Glucantime (dados não mostrados).

Nossos dados mostram claramente, que embora sejam necessários outros experimentos, para otimizar a administração de Man-Sb em termos de dose e frequência, este complexo é comparável em eficiência ao Glucantime, pois houve uma destruição efetiva do protozoário em concentrações que foram inferiores 160 vezes ao Glucantime. Maiores concentrações do Man-Sb são ainda de uso limitado devido a insolubilidade dos complexos e soluções fisiológicas. A utilização de fragmentos maiores de manana como carreadores de Sb, assim como outras alternativas de solubilização do complexo são necessárias para resolver este problema.

Podemos dizer que o proposto mecanismo de ação de Man-Sb envolve: a) endocitose pelo macrófago via receptor manosil; b) fusão de visículas envolvendo o complexo e vacúolo parasitóforos (PV); c) dissociação do complexo em pH ácido do PV com formação de pentóxido de antimônio tóxico; d) destruição dos parasitas sem afetar a viabilidade do macrófago.

Embora essa sequência de eventos pode envolver passos adicionais, aqueles sugeridos são baseados na observação prévia dos macrófagos infetados com *Leishmania*. Assim, a ocorrência da fusão entre PV e lisosomas secundários tem sido demonstrada por diferentes autores (Oda et alii, 1983; Wyler & Suzuki, 1983; Tietze et alii, 1982) utilizando diferentes drogas lisosomais.

O baixo pH do compartimento fagolisosomal não é alterado pela presença na *Leishmania* que inclusive apresenta um metabolismo aumentado (Mukkada et alii., 1985). Além disso, experimentos preliminares mostraram que o tratamento de macrófagos infectados com *Leishmania*, com uma base fraca tal como NH_4Cl aumenta o pH interno do PV (próximo a neutralidade) prevenindo a destruição de parasitas pelo Man-Sb (dados não mostrados). Isto é uma evidência de que o pH ácido é necessário para dissociar o complexo liberando antimônio (Sb_2O_5) para realizar o efeito leishmanicida. A prévia decomposição do complexo é necessária, pois, para matar os parasitas.

Experiências recentes foram realizadas reagindo a manana com antimoniato de potássio (KH_2SbO_4 ; 0,18 mol/mol). Uma solução do produto (Sb 11,1%) em D_2O forneceu um espectro ^{13}C -n.m.r., que apresentou sinais idênticos ao da manana original, mostrando uma falta de complexação íntima. Experiências realizadas *in vitro* mostraram que o composto em questão não tinha nenhuma atividade leishmanicida e que provavelmente a associação de manana e antimoniato é muito fraca e portanto o antimônio não atinge o macrófago. Isto contrasta com o efeito do complexo na forma sódica e pode ser postulado que o complexo existe como composto covalente que não sofre dissociação no sistema biológico.

Em suma a eficiência do complexo Man-Sb na destruição de formas amastigotas de *Leishmania* *in vitro* e *in vivo* abre uma perspectiva para introdução deste complexo como droga alternativa para o tratamento de leishmanioses humanas com a

grande vantagem de utilizar baixas doses de antimônio e obter uma menor toxicidade.

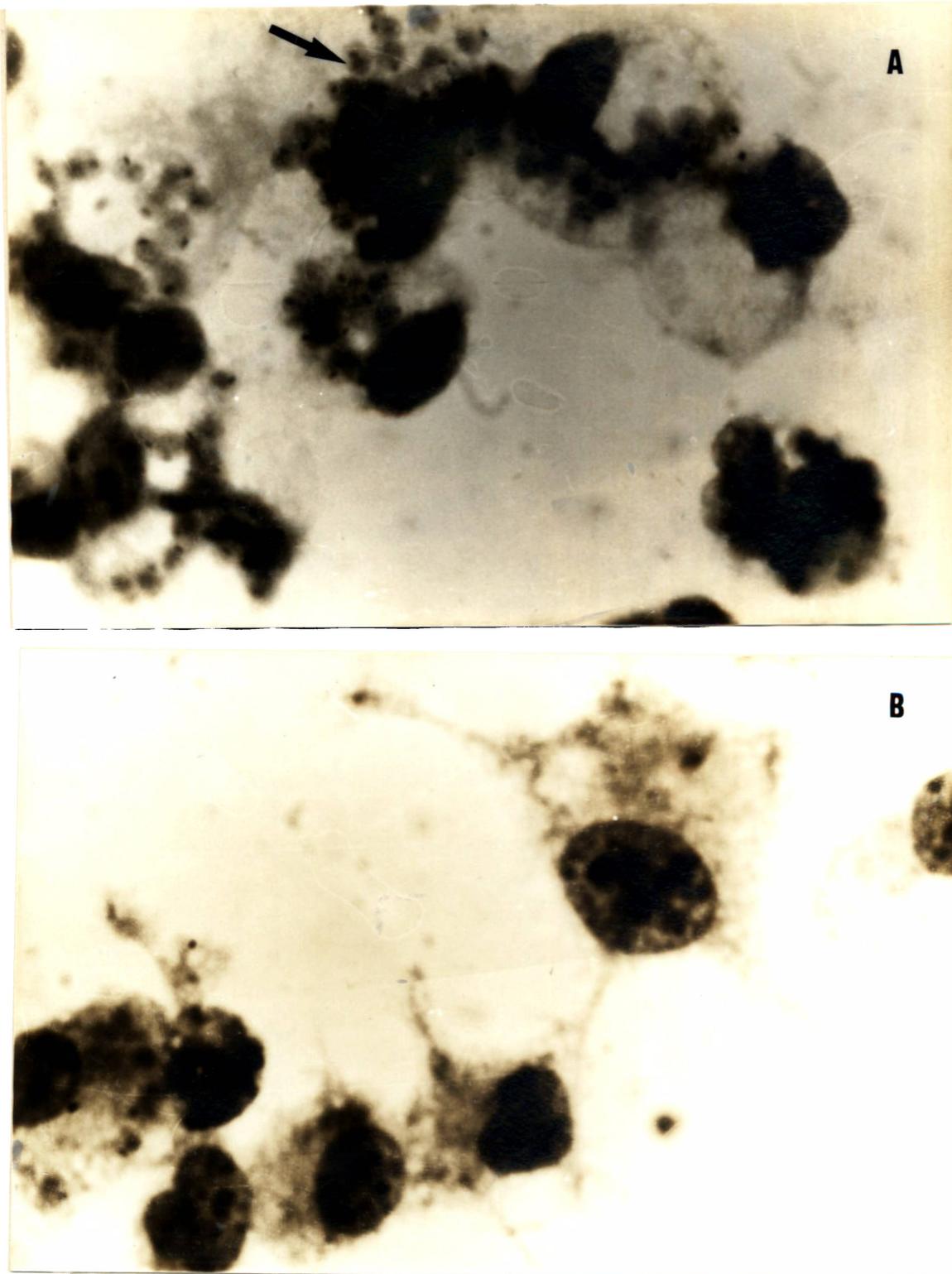


FIGURA 9 a - Macrófagos peritoneais de camundongos infectados com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* 2 dias após a infecção.

b - Macrófagos peritoneais de camundongos infectados com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 3 dias de tratamento com Man-Sb 500 mg/ml (4.4 µg/ml de Sb).

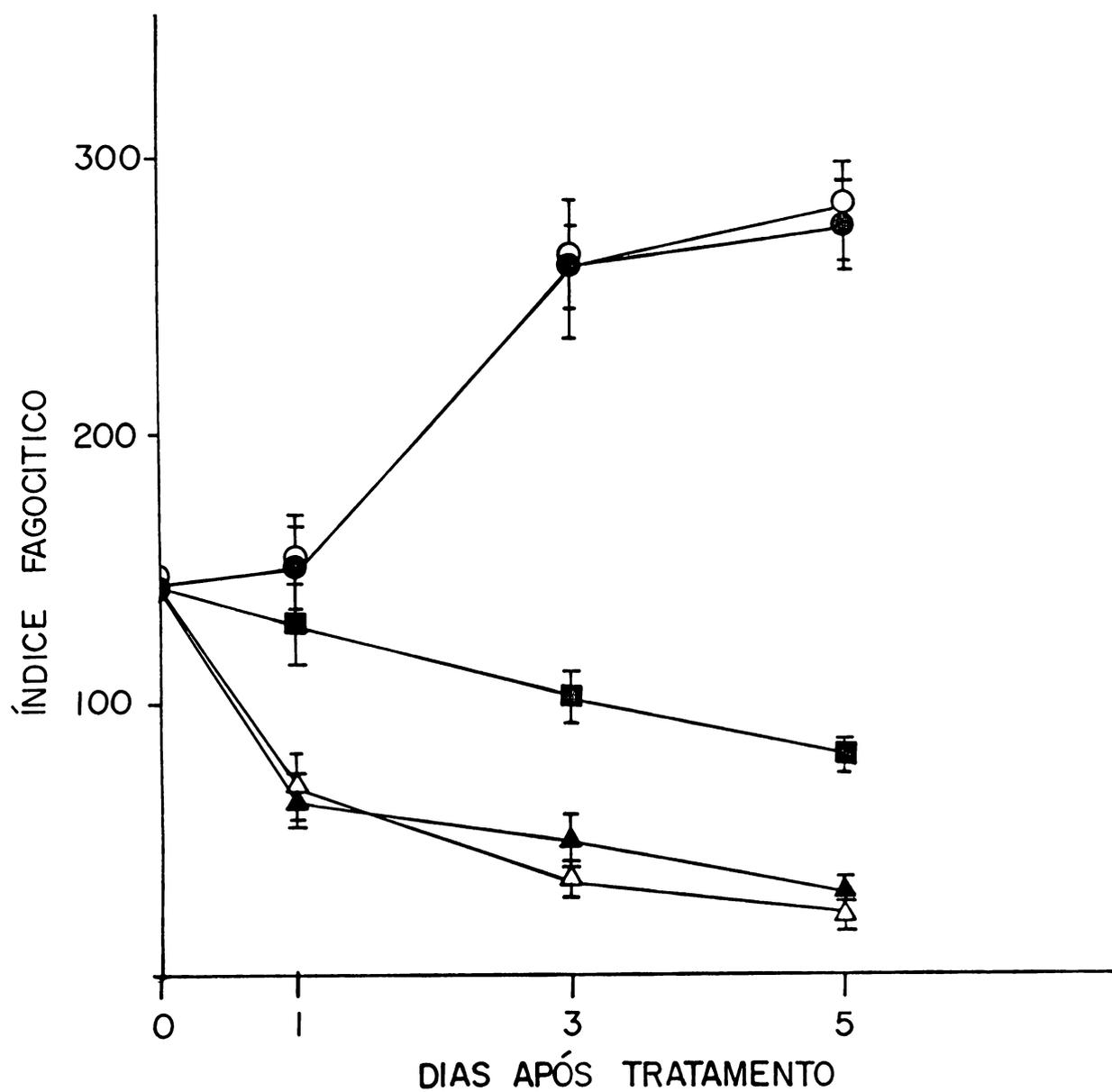


FIGURA 10 - Tratamento de macrófagos peritoneais com diferentes concentrações de Man-Sb.

-●- -PBS; -○- manana 750 µg/ml; -▲- Man-Sb 500 µg/ml (4,4 µg/ml Sb); -△- Man-Sb 750 µg/ml (6,6 µg/ml Sb); -■- Glucantime (6,6 µg/ml Sb)

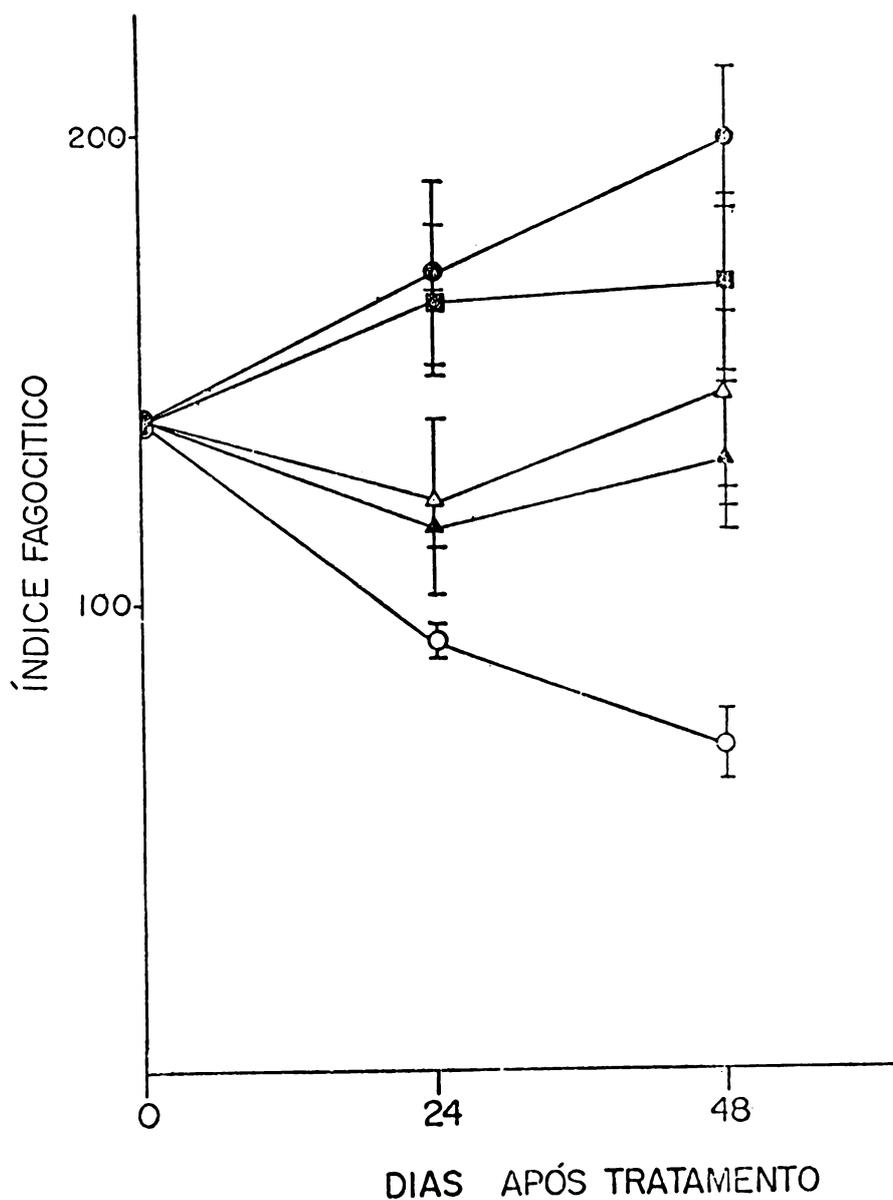


FIGURA 11 - Inibição do efeito leishmanicida de Man-Sb pelo aumento da concentração de manana.

- ● - Controle de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*; - ○ - tratamento com Man-Sb a 750 µg/ml; - ▲ - Man-Sb e manana 250 µg/ml; - △ - Man-Sb e manana 500 µg/ml; - ■ - Man-Sb e manana 1 mg/ml.

TABELA VIII

TRATAMENTO DAS LESÕES DA PATA DE HAMSTER COM MAN-Sb E
GLUCANTIME

Tratamento	Dias após tratamento			
	0	11	22	33
Controle (não tratado)	8,1	8,5	8,5	8,7
PBS	8,0	8,5	8,1	7,7
Manana 46 mg	8,3	8,9	8,0	7,5
Man-Sb 390 μ g Sb	6,4	4,3	4,2	5,1
Glucantime 65,4 mg Sb	7,3	4,2	3,7	4,2

Os valores representam o tamanho da lesão (diâmetro em mm) medidos como descrito e Materiais e Métodos, e equivale a média de duas determinações. O diâmetro normal da pata é 3,5 mm.

CONCLUSÕES

- 1 - Os complexos de antimônio com carboidratos possuem ação leishmanicida.
- 2 - A manana por si só não é ativa, embora os macrófagos, sítios celulares de residência para as espécies do gênero *Leishmania*, apresentem receptores manosil.
- 3 - O valor ideal do DS dos substituintes CM, sulfato, fosfato e DEAE foi considerado 0.25, valor este tido como suficiente para promover a complexação com antimônio sem modificar a estrutura da manana.
- 4 - A técnica que se mostrou mais viável para determinação dos substituintes em manana derivatizada foi a espectroscopia de ^{13}C -n.m.r.
- 5 - O pentacloreto de antimônio é um bom reagente para formar complexos com a manana e mananas substituídas. Entretanto relações superiores a 0.78 mol/mol desse reagente podem levar a hidrólise dos polissacarídeos. A precipitação com metanol, também, garante melhores rendimentos.
- 6 - A manana e mananas substituídas com concentrações superiores a 3.1 % de antimônio (concentração real, 0.88%) *in vitro* levaram a destruição de macrófagos.
- 7 - O complexo de antimônio com manana e mananas substituídas mostrou-se parcialmente insolúvel. Maiores investigações necessitam em face ao apresentado.
- 8 - O complexo Man-Sb foi de todas as drogas testadas a de

- 9 - Os testes *in vitro* do complexo Mn-Sb mostraram-se uma atividade de 3 vezes superior que o Glucantime.
- 10 - O complexo Man-Sb *in vivo* mostrou-se 160 vezes mais ativo que o Glucantime para a espécie *Leishmania (L.) amazonensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOK, K.; FREDRIKSSON, B.A.; BRUNK, U. An experimental model system for leishmaniasis. An ultrastructural study on cultured macrophages exposed to *Leishmania* parasites and sodium stibogluconate. *APMIS*, v. 96. p. 589-95, 1988.
2. ADINOLFI, L.E.; BONVENTRE, P.F.; PAS, M.V.; EPPSTEIN, D.A. Synergistic effect of Glucantime and a liposome-encapsulated muramyl dipeptide analog in therapy of experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immunity*, v. 48 n°2, p. 409-16, 1985.
3. AVILA, J.L. & AVILA, A. Correlation of sinefungin susceptibility and drug-affinity for protein carboxymethyltransferase activity in American *Leishmania* species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 26, p. 69-76, 1987.
4. BELFORT, E. & MEDINA, R. Tratamiento de la leishmaniasis tegumentaria americana en su forma mucosa. *Dermatol. Venez.*, v. 10, p. 1121-47, 1971.
5. BERMAN, J.D.; GALLALEE, J.V.; BEST, J.M. Sodium stibogluconate (Pentostan) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid β -oxidation in *leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem. Pharmacol.*, v.36, p. 197-201, 1987a.
6. BERMAN, J.D. & GROGL, M. *Leishmania mexicana*. Chemistry and biochemistry of sodium stibogluconate (Pentostan). *Exp. Parasitol.*, v. 67, p. 96-103, 1988.

7. BERMAN, J.D. & LEE, L.S. Activity of oral drugs against *Leishmania tropica* on human macrophages in vitro. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 32 n°5, p. 947-951, 1983.
8. BERMAN, J.D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev. Infect. Diseases*, v. 10 n°3, p. 560-586, 1988.
9. BOESEKEN, J. The use of boric acid for determination of the configuration of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, v. 4, p. 189-207, 1949.
10. BRAHMACARI, U.N. Chemotherapy of antimonial compounds in kala-azar infection. Part V. Amino-antimonyl tartrates. *Ind. J. Med. Res.*, v. 11, p. 405-410, 1923.
11. BRAHMACARI, U.N. Chemotherapy of antimonial compounds in kala-azar infection. Part VIII. Quantitative studies in excretion of antimony. *Ind. J. Med. Res.*, v. 11, p. 829-38, 1924.
12. BRAHMACARI, U.N. Fourth report on the treatment of Kala-azar and some blood reactions in this disease. *Ind. Med. Gaz.*, v. 52, p.319-322, 1917.
13. BRYCESON, A.D.M.; CHULAY, J.D.; MUGAMBI, M.; GACHIHI, G.; CHUNGE, C.N.; MUGAI, R.; BHAIT, S.M.; SPENCER, H.C.; MEME, J.; ANABWANI, G. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. II. Response to high dosage sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 79, p. 705-14, 1985.
14. BULLOCK, L. & GUTHRIE, J.D. Etherification: diethyl-aminoethylcellulose. *Methods Carbohydr. Chem.*, vol.

- 5, p. 409-10, 1965.
15. BUTLER, P. Levamisole and immune response phenomena in cutaneous leishmaniasis. *J. Amer. Acad. Dermatol.*, v. 6, p. 1070-77, 1982.
 16. CARTER, K.C.; BAILLIE, A.J.; ALEXANDER, J.; DOLAN, T.F. The therapeutic effect of sodium stibogluconate in Balb/c mice infected with *Leishmania donovani* is organ-dependent. *J. Pharmacol.*, v. 40, p. 370-373, 1988.
 17. CARVALHO, O. Tratamento de prova com o antimoniato de N-metil-glucamina no diagnóstico do calazar infantil. *O Hospital*, v. 54, p. 143-47, 1958.
 18. CASTELLANI, A. Breve nota sulla cura di un caso di Kala-azar. *Pediatria.*, v. 23, p. 241-243, 1915.
 19. CASTRO, R.M. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Ann. bras. Dermatol.*, v 55 n° 2 p. 87-89, 1980.
 20. CHAKRAVARTI, R.N. & SEN GUPTA, P.C. Urinary excretion of antimony after administration of methyl glucantime antimonate. Preliminary observation. *Ind. Med. Gaz.*, v. 85, p. 388-91, 1950.
 21. CHAPMAN, W.L.; HANSON, W.L.; ALVING, C.R.; HENDRICKS, L.D. Anti-leishmanial activity of liposome-encapsulate meglumine antimonate in the dog. *Amer. J. Vet. Res.*, v. 45 n° 5 , p. 1028-30, 1984.
 22. CHEN, P.S.; TORIBARA, T.Y.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, v. 28 n° 11, p. 1756-8, 1956.

23. CORBETT, C.E. *Farmacodinâmica*, 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982, p 845-50.
24. CHULAY, J.D.; FLECKENSTEIN, L; SMITH, D.H. Pharmacokin- of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimonate. *Trans. Royal Soc.*, v. 82, p. 69-72, 1988.
25. CHULAY, B.; SPENCER, H.C.; MUGAMBI, M. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Amer. J. Trop. Hyg.*, v. 34, n^o 4, p. 702-709, 1985.
26. DI CRISTINA, G. & CORONIA, G. Sulla terapia della leishmaniosi interna. *La Pediatria*, v. 23, v. 23, p. 81-92, 1915.
27. DODGSON, K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem. J.*, v. 78, p. 312-329, 1961.
28. DODGSON, K.S. & PRICE, R.G. A note on the determination of the sulphate ester content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* , v. 84, n^o 106, p. 106-109, 1962.
29. DOREA, J.G.; HAMANN, E.M.; RYAN, D.E.; HOLZBECHER, J. Retection of antimony in hair during leishmaniasis treatment. *Clin. Chem. Acta*, v. 179, p. 341-346, 1989.
30. DUBOIS, M.; GILLES, J.K.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v. 28 , p. 350-356, 1956.

31. DUFF, R.B & PERCIVAL, E.G.V. Carbohydrate sulphuric esters. Part II. The isolation of 3,6-anhydro-methyl hexosides from methyl hexopyranoside sulphates. *J. Chem. Soc.*, p. 830-834, 1941.
32. EYLER, R.W.; KLUG, E.D.; DIEPHUIS, F. Determination of degree of substitution of sodium carboxymethylcellulose. *Anal. Chem.*, v. 19, n^o 1, p. 24-27, 1947.
33. FRANCIS, C.V. Sodium carboxymethylcellulose: determination of degree of substitution active agent. *Anal. Chem.*, v. 25, n^o 6, p. 941-945, 1953.
34. FURTADO, T.A. Clinical results in the treatment of American leishmaniasis with oral and intravenous Amphotericin. *Antibiot. Ann.*, p. 1959-60, pp. 631-637, 1960.
35. GOLD, W.; STOUT, H.A.; FAGANO, J.S. Amphotericins A and B: antifungal antibiotic produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot. Ann.*, 1955-6, 579-586. Medical Encyclopedia, New York, 1956.
36. GOODWIN, L.G. & PAGE, J.E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem. J.*, v. 37, p. 198-209, 1943.
37. GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, v. 38, p.13-37, 1981.
38. GORIN, P.A.J. Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. *Can. J. Chem.*, v. 51, p. 2375-2383, 1973.

39. GORIN, P.A.J. The position of phosphate groups in the phosphonomannan of *Hansenula capsulata*, as determined by carbon-13 magnetic resonance spectroscopy. *Can. J. Chem.*, v. 51, p. 2105-9,
40. GORIN, P.A.J. Structure of the amino sugar component in baker's yeast mannan. *Can. J. Chem.*, v. 49, 527-29, 1971.
41. GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. Proton magnetic resonance spectroscopy: an aid in identification and classification of yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 13, p. 15-89, 1970.
42. GREEN, J.W. O-Carboxymethylcellulose. *Methods Carbohydr. Chem.*, v. 3, p. 322-325, 1963.
43. GUZMAN BARRON, E.S. Thiol groups of biological importance. *Adv. Enzymol.*, v. 11, p. 233-243, 1951.
44. HAINES, A.W. Relative reactivities of hydroxyl groups carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem.*, v. 33, p. 11-110, 1976.
45. HARTMANN, M. Cellulose ethers and process of making U.S. Patent Oct. 1,777,970. *Chem. Abstracts*, v. 25, p. 409-10, 1965.
46. HEIMGARTNER, E. & HEIMGARTNER, V. Leishmaniasis tegumentaria sudamericana in Gebiet des Rio Pachietea *Dermatol.*, v. 149, p. 1539-1546, 1974.
47. HEUNG CHONG, B.A. A look at trends in and approaches to the treatment of leishmaniasis. *Inf. J. Dermatol.*, 25, p. 615-623, 1986.
48. HONDA, S.; YURI, H.; TAKIURA, K. Fourier transform ^{13}C

- nuclear magnetic resonance spectra of D-glucose 3- and 6-sulfates *Carbohydr. Res.*, v. 28, p. 150-3, 1973.
49. HORTON, D. & HUTSON, D.H. Developments in the chemistry of thio sugars. *Adv. Carbohydr. Chem.*, v. 18, p. 163, 1963.
50. HORWITZ, M.A. & MARFIELD, F.R. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell. Biol.*, v. 89, p. 1936-46, 1984.
51. HOUGH, L. & JONES, J.K.N. Chromatography on paper. *Methods Carbohydr. Chem.*, v. 1, p. 21-31, 1962.
52. JARDIM, M.L. & FERRAZ, G. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana por injeções intra-arteriais de antimoniato de N-metilglucamina. *O Hospital.*, v. 68, n^o 3, p. 157-61, 1965.
53. JEMMA, R. Brief historical notes on the introduction of antimony in the therapeutics of internal leishmaniasis. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 1, p. 1-3, 1918.
54. JEMMA, R. La cura específica della leishmaniosi nei bambini. *Pediatria.*, v. 2, p. 1-5, 1916.
55. JENSEN, M.S. & BAINTON, D.F. Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear neutrophilic leucocyte. *J. Cell. Biol.*, v. 56, p. 379-88, 1973.
56. JOLLY, W.L. *A Química dos não metais*. Editora Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1966.
57. JONES, J.K.N. & STOODLEY, R.J. Fractionation using copper complexes. *Methods, Carbohydr. Chem.*, v. 5, p. 36-38, 1965.

58. KANDIL, E. Treatment of cutaneous leishmaniasis with trimetropinsulphamethoxazole. *Dermatol.*, v. 146, p. 306-30, 1973.
59. KARABINOS, J.V. & HINDERT, M. Carboxymethylcellulose. *Adv. Carbohydr. Chem.*, v. 9, p. 285-301, 1954.
60. LACAZ, G.S.; PAIVA, L.; SAMPAIO, S.A.P.; GODOY, J.T.; MION, D. O tratamento da leishmaniose tegumentar americana com Anfotericina B. *Rev. Paul. Med.*, v. 55, p. 86, 1959.
61. LEE, Y.-C. & BALLOU, C.E. Preparation of mannobiose, mannotriose, and a new mannotetraose from *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *Biochemistry.*, v. 4, p. 257-264, 1965.
62. LLOYD, A.G. Fractionation of the products of the direct sulphation of monosaccharides on anion-exchange resin. *Biochem. J.*, v. 83, 9. 455-459, 1962.
63. LONGO, A. Sopra alcuni casi de Kala-azar infantil trattati e col tartaro stibiato. *Pediatria*, v. 85, p. 449-468, 1917.
64. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
65. MANSON-BAHR, P.E.C. & HEISCH, R.B. Studies on leishmaniasis in East Africa. III. Clinical features and treatment. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 50, p. 465-471, 1956.
66. MARR, J.J. Pyrazolpyrimidine metabolism in *Leishmania* and trypanosomes: significant differences between host and

- parasite. *J. Cell Biochem.*, v. 22, p. 187-196, 1983.
67. MAYER, P.J.T. Zur amerikanischen Haut-Scheimhautleishmaniasis und ihrer Behandlung mit Amphotericin B. *Munch. Med. Wschr.*, v. 116, p. 1539, 1546. 1974.
68. McLAUGHLIN, R.R. & HERBST, J.H.E. The determination of the degree of substitution of carboxymethylcellulose over the entire substitution range. *Can. J. Res.*, v. 28, p. 737-741, 1950.
69. MEDINA, H.; SLOBODIAN, F.; AMARAL, D.; VOSS, D.O.; BACILA, M. Efeito dos antimoniais sobre a glicólise anaeróbica e a respiração da *Leishmania brasiliensis*, Vianna 1911, e do diafragma isolado de comundongo. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 10, n^o 5, p. 121-165, 1955.
70. MUIR, E. Some further hints on the treatment of kala-azar with antimony tartrate. *Ind. Med. Gaz.*, v. 52, p. 317-319, 1917.
71. MUKKADA, A.J.; MEADE, J.C.; GLASER, T.A.; BONVENTRE, P.F. Enhanced metabolism of *L. donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth. *Science*, v. 229, p. 1099-1101, 1985.
72. NEAL, R.A.; CROFT, S.L.; NELSON, D.J. Antileishmanial effect of allopurinol, ribonucleoside and the related compounds allopurinol ribonucleoside and of formycin, B sinefungin and lepedine WR 6026. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 79, p. 122-128, 1985.
73. NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*, Rio de Janeiro, Livraria Ateneu, 1988, p. 29-58.
74. NEVES, J. Atualização e terapêutica e conceituação de

- cura da leishmaniose visceral americana (calazar). *J. Bras. Med.*, v. 10, n^o 3, p. 265-275, 1966.
75. NEVES, J. Tratamento da leishmaniose visceral americana pelo antimoniato de N-metilglucamine. *Tese de concurso para docência livre.*, 1963, Belo Horizonte.
76. NICOLLE, C. Le kala-azar infantile. *Ann. Inst. Pasteur.*, v. 23, p. 361-401, 1909.
77. NORTHCOTE, D.H. & HORNE, R.W. The chemical composition and structure of yeast cell wall. *Biochem. J.*, v. 51, p. 232-6, 1952.
78. ODA, L.M.; KUBELKA, C.F.; ALVIANO, C.S.; TRAVASSOS, L.R. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, v. 39 n^o 2, p. 497-504, 1983.
79. O'NEILL, A.N. Sulphated derivatives of laminarin. *Can. J. Chem.*, v. 33, p. 1097-1101, 1955.
80. OSTER, C.N.; CHULAY, J.D.; HENDRICKS, L.D.; PAMPLIN, C.L.; BALLOU, W.R.; BERMAN, J.D.; TAKAFUJI, E.T.; TRAMONT, E.G.; CANFIELD, C.J. American cutaneous leishmaniasis :a comparison of three sodium stibogluconate treatment schedules. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 34 n^o 5, p. 856-860, 1985.
81. OTTO, G.F.; MAREN, T.H.; BROWN, H.W. Blood levels and excretion rates of antimony in persons receiving trivalent and pentavalent antimonials. *Amer. J. Hematol.*, v. 46, p. 193-211, 1947.
82. PAREEK, S.S. Combination therapy of sodium stibogluconate and rifamycin in cutaneous leishmaniasis. *Int. J.*

- Dermatol.*, v. 23 p. 70-71, 1984.
83. PARFONDY, A.J. & PERLIN, A.S. ^{13}C -n.m.r spectroscopy of cellulose ethers. *Carbohydr. Res.*, v. 57, n° 977, p. 39-49, 1976.
84. PASCHALL, E.F. Phosphation with inorganic phosphate salts. *Methods Carbohydr. Chem.*, v. 4, p. 294-6, 1964.
85. PERSON, R. Antileishmanial activity of chlorpromazine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 25, p. 571-74, 1984.
86. PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. *Parasitologia Médica*. 10 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, p. 66-124 , 1977.
87. PRADO, J.B. Tratamento das formas mucosas da leishmaniose pela Anfotericina B. *Rev. Ass. Med. Bras.*, v. 9, p. 117-22, 1963.
88. PUPO, J.A. Tratamento da leishmaniose da mucosa pelo "Eparseno" (amino-arseno-phenol, de pomaret). *Brasil Médico.*, v. 1, p. 201-3, 1926.
89. REY, L. *Parasitologia*. Rio de Janeir: Guanabara Koogan, p. 179-208 , 1972
90. ROGER, L. Further work on the treatment of Kala-Azar with special reference to leucocyte increasing methods, spleen tabloids and alkalies. *Ind. Med. Gaz.*, v. 50, p. 163-170, 1915.
91. ROMERO, D.A. Siete casos de leishmaniosis cutanea tratados con Astaril. *Rev. Med. Costa Rica.*, v. 1, p. 413-4, 1948.
92. SCHIMER, M.A.; TOLEDO, M.C.F.; REYS REYS, F.G. Amido fosfatado de milho. Parte II: obtenção e propriedades.

- Boletim SBCTA.*, Campinas , v. 20, p. 153-9, 1986.
93. SEEGMILLER, J.E. & HORECKER, B.L. The synthesis of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate. *J. Biol. Chem.*, v. 192, p. 175-180, 1951.
 94. SHARQUIE, K.E.; AL-TALIB, K.K.; CHU, A.C. Intralesional Therapy of cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate antimony. *Brit. J. Dermatol.*, v. 119, p. 53-57, 1988.
 95. STAHL, P. & GORDON, S. Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids. *J. Cell. Biol.*, v. 93, p. 49-56, 1982.
 96. STONE, B.A. O-Carboxymethylpachyman. *Methods Carbohydr. Chem.*, v. 1, p. 408-9, 1962.
 97. SUN-SANG J.S.; NELSON, R.S.; SILVERSTEIN, S.J. Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of Zymosan by mouse peritoneal macrophages. *J. Cell. Biol.* v. 96, p. 160-66, 1983.
 98. THAKUR, C.P.; KUMAR, K.; SINHA, P.K.; MISHRA, B.N.; PANDEY, A.K. Treatment of post kala-azar dermal leishmaniasis with sodium stibogluconate. *Brit. Med. J.*, v. 295 n° 10, p. 886-887, 1987.
 99. TIETZE, C.; SCHLESINGER, P.; STAHL, P. Mannose-specific endocytosis receptor of alveolar macrophages: demonstration of two functionally distinct intracellular pools of receptor and their roles in receptor recycling. *J. Cell Biol.*, v. 92, p. 417-424, 1982.
 100. TOWLE, G.A. & WHISTLER, R.L. Phosphorylation of starch

- and cellulose with an amine salt of tetrapolyphosphoric acid. *Methods Carbohydr. Chem.*, v. 6, p. 408-410, 1972.
101. TRAGER, W.; TERSHAKOVEC, K.; CHIANG, P.K.; CANTONI, G.L. *Plasmodium falciparum*: antimalarial activity in culture of sinesfungi and other methylation inhibitors. *Exp. Parasitol.*, v. 50, p. 83-89, 1980.
102. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms by use of dipping reagents. *Nature*, v. 166, p. 444-445, 1950.
103. TURVEY, J.R. Sulfates of the simple sugars. *Adv. Carbohydr. Chem.*, v. 20, p. 183-218, 1965.
104. URCUYO, F.J. & ZAIAS, M.D. Oral ketoconazole in the treatment of leishmaniasis. *Pharmacol. Therapeutics*, v. 21, p. 414-416, 1982.
105. VAN BUEREN, N.J. & HOOPER, G. The activity of nitrofurazone and furazolidone against *Leishmania donovani*, *L. major*, and *L. enrietti* in vitro and in vivo. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 82, n^o 5, p. 453-456, 1988.
106. VERONESI, R. *Doenças Infecciosas e Parasitarias*. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982, p. 733-736.
107. VIANNA, G. Sobre o tratamento da leishmaniose tegumentar. *Ann. Paul. Med. Cirurgia*, v. 6, 167-169, 1914.
108. VISONTINI, M. & OLIVIER, C. La phosphorylation du glucose par l'acide metaphosphorique. *Helv. Chim. Acta*, v. 36, 466-470, 1953.
109. VOEGTLIN, C. & SMITH, H.W. Quantitative studies in chemotherapy. The trypanocidal action of arsenic and antimony compounds. *U.S. Pub. Health Service Rept.*, v.

- 24, p. 2264-2273, 1920.
110. VOGEL, A. *Análise Inorgânica Quantitativa*. 4 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, S.a. 1981, p. 285.
111. VOGEL, A. *Análise Inorgânica Quantitativa*. 4 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, S.A., 1981, p. 544.
112. WHISTLER, R.L. & SPENCER, W.W. Preparation and properties of several polysaccharide sulfates. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 95, p. 36-44, 1961., 1961.
113. WHISTLER, R.L. & SPENCER, W.W. Sulfation. *Methods Carbohydr. Chem.*, v. 4, p. 297-298, 1964.
114. WILSON, M.E. & PEARSON, R. Roles of CRS and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.*, v. 56, n^o 2, p. 363-369, 1987.
115. WYLER, D.J. & SUZUKI, K. In vitro parasite monocyte interactions in human leishmaniasis: effect of enzyme treatments on attachment. *Infect. Immunity*, v. 42 n^o 1, p. 356-61, 1983.