

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

VANIA FERRAZ FRAGA

DERIVATIZAÇÃO DA PENTAMIDINA

Porto Alegre, dezembro de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

VANIA FERRAZ FRAGA

DERIVATIZAÇÃO DA PENTAMIDINA

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado junto a Disciplina de Projeto
Tecnológico do curso de Química Industrial, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Químico Industrial.

Prof. Dr. Aloir Antonio Merlo
Orientador

Porto Alegre, dezembro de 2007.

1.INTRODUÇÃO	2
1.1.HISTÓRICO	2
1.2.ÁREAS ENDÊMICAS.....	4
1.3.VETORES	5
1.4.DIAGNÓSTICO DA DOENÇA.....	7
2.OBJETIVO	8
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1.FÁRMACOS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DA LEISHAMIOSE	9
3.2.ANTIMONIAIS TRIVALENTES.....	10
3.3.ANTIMONIAIS PENTAVALENTES	11
3.4.OS ANIMONIAIS EMPREGADOS NO BRASIL	13
3.5.ANFOTERICINA B	14
3.6.PARAMOMICINA.....	15
3.7.MILTEFOSINE	16
3.8.PENTAMIDINA	17
4.METODOLOGIA	20
4.1.PROPOSTA.....	20
4.1.1.ESCOLHA DA PENTAMIDINA – A INSPIRAÇÃO CIENTÍFICA.....	20
4.2.ALTERAÇÃO DA CADEIA CENTRAL – FORMAÇÃO DO “PRODUTO A”.....	23
4.2.1.ESCOLHA DO FOSFATO DE ALQUILA COMO ALTERNATIVA PARA CADEIA CENTRAL...	24
4.2.2.SÍNTESE DA MILTEFOSINE	25
4.2.3.SÍNTESE DO FOSFATO DE ALQUILA.....	26
4.2.4.SÍNTESE DO “PRODUTO A”	27
4.3.ALTERAÇÃO DAS EXTREMIDADES DA MOLÉCULA – FORMAÇÃO DO “PRODUTO B”	28
4.3.1.SÍNTESE DO “PRODUTO B”	30
5.CONCLUSÕES CRÍTICAS.....	31
6.REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO

A Leishmaniose é uma doença causada por protozoário no qual o vetor é um Flebotomídeo fêmea (mosquito). Existem três formas da doença, no qual a forma mais grave é a Leishmaniose visceral. Esta doença é característica de países subdesenvolvidos. A falta de recursos, as migrações, a colonização predatória de novas fronteiras, o sistema de saúde precário e a urbanização descontrolada das cidades compõem o quadro social que possibilita a expansão da leishmaniose pelo mundo.

A doença cutânea é conhecida desde a antigüidade, particularmente pelos médicos árabes, incluindo Avicenna no Oriente Médio e Pérsia. Mohammad e Muna Al-Taqui citam a ocorrência de úlcera oriental por volta do século X, e em detalhes no século XV. Cunningham, em 1885, na Índia, foi quem primeiro observou os parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* em casos de Calazar. Posteriormente, em 1898, Borovisky descreveu esses parasitas em casos de leishmaniose cutânea, sem, contudo, tê-los nomeado. Em 1908, Leishman reconhece a semelhança com a forma arredondada observada nas infecções pelo *Trypanossoma*, e, em julho desse mesmo ano, Donovan descreve o parasita no Calazar. É criado o termo *Leishmania*, por Ross em 1903, recebendo a denominação de *Leishmania donovani* o parasita causador do calazar. Wright, em 1903, descreve o parasita encontrado no botão do Oriente, denominando-o *Leishmania tropica*. Nicole (1908) denominou *Leishmania infantum* ao parasita do Calazar do Mediterrâneo [1].

A leishmaniose é considerada doença autóctone no continente americano. Os índios ceramistas do Peru pré-colombiano representam em seus huacos lesões muito semelhantes às encontradas na leishmaniose. Parece ter sido Tamayo, em 1908, o primeiro a identificar as lesões dos huacos como a doença conhecida no Peru com o nome de uta, isto é, leishmaniose mucocutânea. Weiss relata que as primeiras observações sobre a doença na América se devem a Frei Rodrigo de Loayza que, em 1586, verificara a presença de lesões nasais tanto nos índios como nos colonizadores espanhóis na região dos Andes [2].

Quanto às primeiras descrições no Brasil, Rabello, em 1917, relata ter encontrado referências de uma viagem feita pelo Frei Don Hipolito Sanches Rangel de Fayos y Quirós, desde Tabatinga até o Pará, onde há menção a presença da doença nas regiões da Amazônia desde o ano de 1827. Em 1895, Breda descreveu-a observando-a em italianos que haviam

retornado de São Paulo. Moreira, em 1895, identifica no Brasil a existência do botão endêmico dos países quentes, sendo denominado botão da Bahia [3]

No início do século passado, por volta de 1905, com o início da construção da Estrada de Ferro Noroeste, surge no estado de São Paulo, na região de Bauru, uma epidemia de úlceras cutâneas, que posteriormente davam lugar a localizações mucosas, sendo principalmente encontrada entre os operários da estrada de ferro. Com o crescente afluxo de doentes à Santa Casa de São Paulo provenientes da região noroeste do estado, cresce o interesse pelo estudo da doença. Recebeu várias denominações, como úlcera-de-bauru, feridas bravas, úlcera-da-noroeste, entre outras. Foi Lindenberg, em 1909, que identificou os corpúsculos de Leishman Wright, sendo esse achado confirmado no dia seguinte por Carini e Paranhos. Miranda, em 1910, descreve o primeiro caso da forma mucosa em São Paulo, e, no mesmo ano, Splendores encontra o parasita em lesões mucosas. Em 1911, Pedroso e Silva obtêm culturas de leishmanias em meio NNN (Nicole-Novy-MacNeal). Nesse mesmo ano, Gaspar Vianna, estudando as características morfológicas do parasita, encontra diferenças entre este e *L. tropica*, denominando-o *Leishmania brasiliensis*. Vianna, em 1912, descobre o tratamento específico da leishmaniose com injeções endovenosas de tártaro emético [4].

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde considerou a Leishmaniose como a segunda doença de importância pública, causada por protozoário.

1.2. ÁREAS ENDÊMICAS

A leishmaniose prevalece nos quatro continentes, sendo considerada endêmica em 88 países, dos quais 72 são países considerados em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde 90% dos casos de leishmaniose visceral são registrados em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão; 90% dos casos da leishmaniose mucocutânea ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru e 90% dos casos da leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria [5].

No Brasil, a leishmaniose encontra-se disseminada em 17 estados das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Entre 1985 e 2000, a leishmaniose atingiu no Brasil 422,5 mil pessoas e nos últimos dois anos foram detectados 66,8 mil novos casos da doença, que permanece sem controle [6]. De 1999 a 2001, foram registrados no Estado de São Paulo, 87 casos de leishmaniose, sendo que em sete casos a doença levou a óbito [7].

1.3. VETORES

Os vetores da leishmaniose são dípteros da família *Psychodida*, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. Somente as fêmeas são hematófagas. Pertencem ao tipo dos dípteros de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos. São encontrados em tocas de animais silvestres, buracos de pau e ocos de bambu [8]. Na Figura 1 podemos visualizar um Flebotomíneo.



Figura 1 - Flebotomíneo sobre a pele (Meddía)

Os flebótomos fêmeas infectam-se ao picar um animal portador da doença, aspirando macrófagos parasitados ou parasitas livres no sangue ou tecidos e podem, assim, transmitir a doença ao homem [9]. Os parasitas da *Leishmania* comumente podem existir em duas formas distintas, a móvel promastigota (flagelado e extracelular), do inseto vetor e a sésil amastigota (intracelular), presente no mamífero hospedeiro. Os mamíferos portadores da leishmaniose são geralmente animais silvestres como a preguiça, o tamanduá, roedores, raposas e outros, sendo que grande parte das lesões nestes não é aparente. No Brasil, o mais importante reservatório animal é o cão e a raposa [10]. A partir de estudos patofisiológicos foi verificado que a transmissão da doença para o homem ocorre quando o flebotomíneo promove seu repasto sangüíneo (enquanto o inseto vetor suga o sangue do hospedeiro vertebrado, ele transfere promastigotas metacíclicas); estas formas tendem a infectar células do sistema fagocítico mononucleares do homem (principalmente macrófagos) e quando se encontram no interior do macrófago, os promastigotas se transformam em amastigotas, que se multiplicam, levando ao rompimento desta célula hospedeira. A lise leva à liberação de grande quantidade

de parasitas, que infectam outros macrófagos. A multiplicação dos amastigotas ocorre em macrófago de diferentes tecidos, originando uma das formas da doença [11].

Na Figura 2 temos o ciclo biológico do parasita e as suas duas formas de existência, amastigota e promastigota que podem ser observadas também na Figura 3.

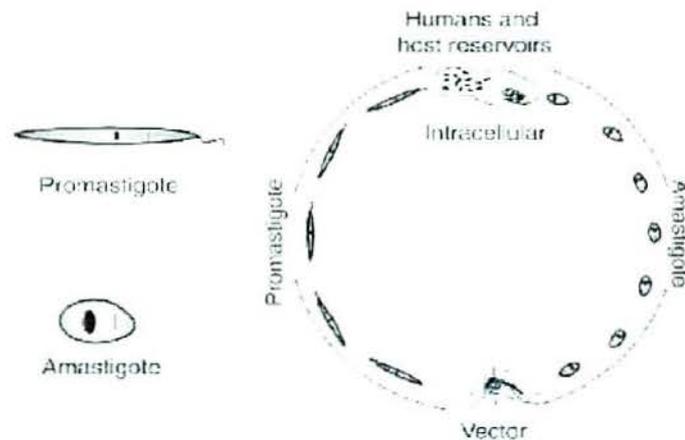


Figura 2 - Formas do parasita Leishmania e seu ciclo biológico.

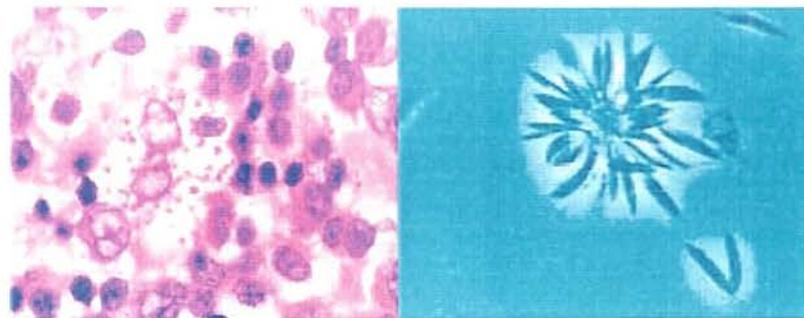


Figura 3 - Formas amastigotas e promastigotas, respectivamente, da Leishmania no hospedeiro. A forma promastigota pode ser encontrada inclusive no intestino do vetor [1].

Basicamente podemos diferenciar três formas de manifestação da leishmaniose:

- A. *VISCERAL OU CALAZAR*, causada principalmente por *L. donovani*, mas também pode ser causada por *L. infantum* e *L. chagasi*, possui período de incubação de 3-6 meses e é caracterizada por aumento do fígado e baço, febre, anemia e emagrecimento. A doença visceral sintomática frequentemente termina em morte na ausência de tratamento.
- B. *MUCOCUTÂNEA*, geralmente causada por *L. braziliensis*, compreendendo lesões que podem se manifestar meses ou até anos após a picada e atingem parcial ou totalmente a mucosa nasal e oral. Os principais efeitos a longo prazo da doença mucocutânea e cutânea são as cicatrizes e deformidades.
- C. *CUTÂNEA*, causada geralmente por *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. major*. A Leishmaniose cutânea pode manifestar-se no organismo como uma única ulceração da pele no

local da mordida do inseto, aparecendo logo após a infecção ou até um mês mais tarde com lesões ulcerativas em áreas expostas (braços, pernas, entre outras).

1.4. DIAGNÓSTICO DA DOENÇA

De modo geral o diagnóstico da doença é baseado no exame clínico dos sintomas e histórico fornecidos pelo paciente. Um dos principais problemas quanto a esse diagnóstico inicial é a semelhança do quadro clínico da leishmaniose com algumas doenças linfoproliferativas e com a esquistossomose mansônica associada à bacteriose septicêmica prolongada. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por:

- (i) - Ensaio sorológicos, entre os quais destaca-se o ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) e o de imunofluorescência indireta (IFI);
- (ii) - Exame parasitológico, realizado no material colhido por punção na medula óssea, baço ou fígado, onde o material é examinado em lâminas coradas, inoculado em cultura ou em hamster ou cultivado em meios apropriados.

Ainda podem servir para diagnosticar a doença a análise do hemograma e dosagem de proteínas. Dependendo da forma clínica, pode ocorrer uma diminuição do número total de hemáceas, leucopenia com linfocitose relativa e plaquetopenia, bem como inversão da relação albumina/globulina [12].

2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo propor teoricamente duas novas estruturas análogas do fármaco leishmanicida Pentamidina. Espera-se que essas novas estruturas sejam posteriormente sintetizadas para que então se possam realizar testes *in vitro* e *in vivo* para verificação da atividade dos produtos com medicamento leishmanicida. Em outras palavras, apresentar uma proposta tecnológica focada numa derivatização de um fármaco leishmanicida com intuito de apresentar novas estruturas que podem futuramente ser testadas como novas alternativas para o tratamento. A idéia é que esta proposta técnica apresente bons resultados nos tratamentos e que possua menores efeitos adversos, já que o maior problema relacionado a fármacos leishmanicidas são os efeitos colaterais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. FÁRMACOS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DA LEISHAMIOSE

O controle das leishmanioses está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor e no extermínio de cães infectados, que são reservatórios de parasitas em áreas peridomiciliares, bem como no tratamento dos indivíduos infectados com diversos fármacos disponíveis no mercado mundial. Entretanto, tais fármacos apresentam uma série de problemas, como resistência do parasita [12], [13][14], e indução de efeitos colaterais, que limitam a utilização e, principalmente, a eficácia deles.

Além disso, todos os fármacos disponíveis atualmente são de administração parenteral, o que exige colaboração do paciente. Infelizmente, muitos abandonam o tratamento, fato que favorece o aparecimento de cepas resistentes [15]. Para a utilização de novos quimioterápicos em humanos, faz-se necessária prévia avaliação desses compostos *in vitro* e *in vivo*. Diversas substâncias estão sendo testadas *in vitro* como quimioterápicos às leishmanioses, sendo que as principais estão direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita.

Diversos extratos naturais de plantas também têm sido alvos de estudos contra a leishmaniose. A finalidade é se encontrar novos agentes leishmanicidas com menores efeitos colaterais e ótima biodisponibilidade. Além disso, pesquisam-se também outras formas farmacêuticas que viabilizem a aplicação desses fármacos, o que tornaria desnecessária a internação do paciente para se efetuar o tratamento.

Muitos dos medicamentos utilizados contra a leishmaniose atualmente são do conjunto terapêutico dos antimoniais. Além dos antimoniais, outras drogas têm sido empregadas no tratamento das diversas formas da leishmaniose, entre as quais se destacam a Pentamidina, Anfotericina B, Paromomicina e Miltefosine.

3.2. ANTIMONIAIS TRIVALENTES

Apesar do uso medicinal de compostos de antimônio já ser conhecido desde a Antigüidade, séculos antes da era cristã, para diversos fins terapêuticos, estes foram usados pela primeira vez na terapêutica da leishmaniose pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912,

Na sua forma trivalente (antimônio trivalente – Sb^{+3}), o chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio), representado pela Figura 4, obteve algum sucesso, visto que naquela época 90% dos casos evoluíam para óbito por não haver tratamento [16]. No entanto, esta formulação apresentava toxicidade, ocasionando tosse, dor no peito, intolerância gastrointestinal, efeitos cardiotóxicos e depressão. Além disso, era de difícil administração.

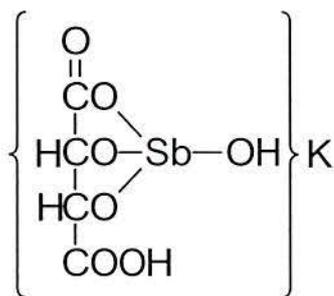


Figura 4 - Fórmula estrutural do Tártaro Emético

Abaixo estão representados as Figura 5 e Figura 6, outros fármacos antimoniais trivalentes, com seu nome químico e comercial respectivamente.

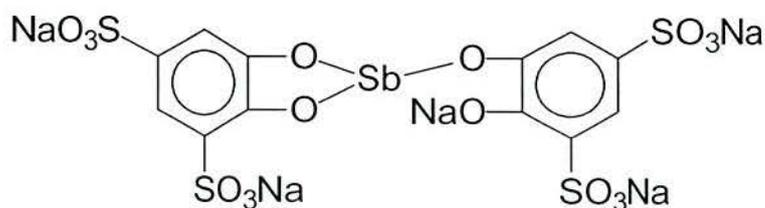


Figura 5 - Antimoniato de *bis*-catecol-3,5-dissulfonato sódico - Stibophen, Repodral, Fuadina

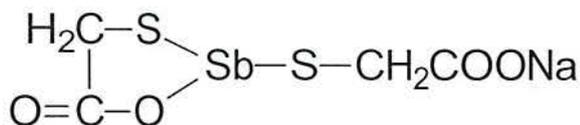


Figura 6 - Tioglicolato de sódio e antimônio

3.3. ANTIMONIAIS PENTAVALENTES

Devido aos efeitos tóxicos e graves efeitos colaterais indesejáveis associados ao emprego do tártaro emético, os antimoniais trivalentes foram sendo substituídos por compostos estibiados pentavalentes. Bramachari, em 1920, desenvolveu o primeiro composto à base de antimônio pentavalente, o uréia estibamina, derivado uréico do ácido *p*-aminofenil estibínico. Em 1936, Schmidt introduziu na terapia médica o gluconato de antimônio(V) sódico, conhecido comercialmente como Solustibosan® (Bayer) ou Pentostam® (Glaxo Wellcome Foundation, Londres, Inglaterra) [17]. Durante a Segunda Guerra Mundial, surgiu na França um medicamento alternativo ao até então gluconato de antimônio(V) sódico; antimoniato de *N*-metilglucamina, comercializado como Glucantime® (Rhone Poulenc, Paris, França) ou antimoniato de meglumina. Enquanto o Pentostam® é distribuído, até hoje, nos países de língua inglesa, o Glucantime® manufaturado é comercializado nos países de línguas francesa, espanhola e portuguesa (Brasil). Os antimoniatos são receitados, de acordo com a quantidade de Sb(V) e são geralmente considerados como equivalentes em termos de eficácia e toxicidade. Estas drogas devem ser administradas em forma de 20 a 28 injeções ao longo de um dia e com duração do tratamento de, no mínimo, 20 dias.

Porém, os compostos antimoniais apresentam efeitos colaterais, tais como náuseas e efeitos colaterais tóxicos graves, tais como hepatite, nefrite e miocardite [18].

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes continua pouco compreendido, mas parece ser um evento que envolve diversos aspectos do metabolismo do parasita. Tem sido sugerido que algumas particularidades químicas na composição destes fármacos podem contribuir para seus efeitos farmacológicos. Por exemplo, os carboidratos, como o ácido glicônico (presente no Pentostan® ou no Glucantime®), são capazes de formar complexos solúveis em água com o átomo de antimônio, o que pode distribuir os agentes antimoniais para os macrófagos infectados [19]. Além disso, como a forma pentavalente apresenta pouca toxicidade, é possível que esta forma seja um prófármaco, que se converte na forma mais tóxica, trivalente, próxima de seu local de ação, ou seja, no interior dos macrófagos ou próximo destas células. Esta conversão foi sugerida há mais de 60 anos [20] e tem sido corroborada pela evidência em soro de pacientes tratados com Glucantime®, que apresenta 15 a 25% de compostos com antimônio trivalente. Foi demonstrado que compostos de antimônio trivalente são extremamente ativos para promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, enquanto a forma pentavalente é menos ativa [21]. Os antimoniais pentavalentes (ou a forma ativa, trivalente) parecem interferir na produção de energia em amastigotas de *Leishmania*,

inibindo tanto a glicólise como a β -oxidação de ácidos graxos [22]. Além destes mecanismos, foi demonstrado que o agente ativo do Pentostan® é capaz de inibir a enzima topoisomerase II purificada de *L. donovani*. A demonstração de que o tratamento de promastigotas de *L. panamensis* com antimoniais pentavalentes é capaz de estabilizar complexos DNA-proteína está de acordo com a inibição da topoisomerase I [23].

Em geral, os antimoniais pentavalentes são bem tolerados, mas algumas reações colaterais podem ocorrer, como dor no local da injeção, disfunção gastrintestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias e pancreatite. Elevação das transaminases hepáticas também foi observada, mas de maneira reversível, cessando com o fim do tratamento [24].

As dificuldades quanto à administração e a duração do tratamento (aplicações diárias, 20 a 28 injeções, durante aproximadamente 20 dias), paralelamente aos efeitos colaterais, têm estimulado pesquisadores do mundo todo a buscar novas formas farmacêuticas para este fármaco.

Da Figura 7 à Figura 9, estão representadas as estruturas químicas dos principais antimoniais pentavalentes utilizados como fármaco contra a leishmaniose. Com seu nome químico e comercial, respectivamente.

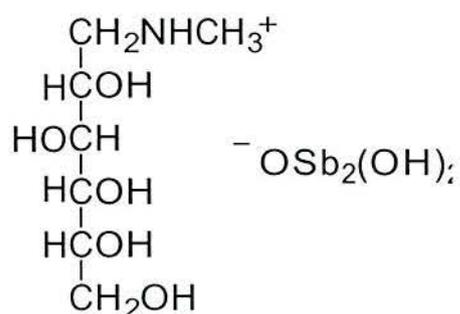


Figura 7 Antimoniato de *N*-metilglucamina - Glucantime®, Antimoniato de meglumina.

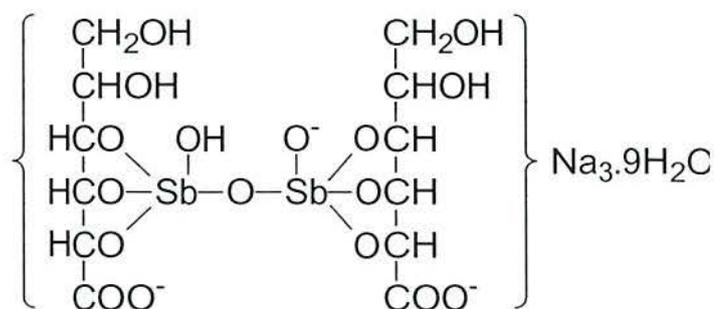


Figura 8 Gluconato de antimônio(V) sódico - Pentostam®, Solustibosan®.

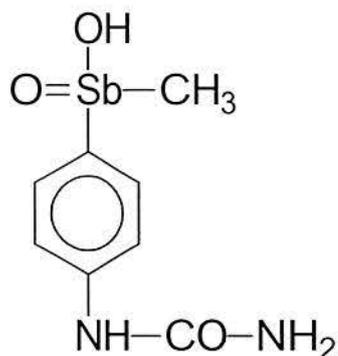


Figura 9 Uréia estibamina – Estibamine.

3.4. OS ANIMONIÁTOS EMPREGADOS NO BRASIL

No Brasil, o medicamento à base de antimônio, utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose, é o antimoniato metilglucamina. O composto é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metil-glucamina, sendo a última obtida previamente a partir da aminaçãõ redutora da glicose em presença de metilamina. O composto, de fórmula estrutural não definida, é solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos.

O antimoniato de metilglucamina é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como provoca a esterilização do parasita. Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e conseqüente aumento das formas resistentes de parasitas [25][27]. A Organização Mundial de Saúde preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia, não se ultrapassando o limite de 850 mg de antimônio, devido à sua elevada toxicidade. Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos são efeitos colaterais freqüentemente associados ao uso destas drogas [5].

Após administração endovenosa ou intramuscular, o antimoniato de metilglucamina é rapidamente absorvido e, praticamente, 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48 h pelos rins. Em conseqüência, faz-se necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos e, assim, obter a eficácia do tratamento. Efeitos colaterais como nefrites, distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares e respiratórios têm sido observados [28].

Antimoniais pentavalentes são geralmente 10 vezes menos tóxicos em células de mamíferos, quando comparados aos antimoniais trivalentes (tártaro emético), utilizados

primeiramente por Vianna em 1912 [27]. Em determinados casos, além de destruir o parasita, o medicamento acaba por levar o paciente ao óbito. O antimônio ainda pode ser detectado no cabelo do paciente tratado com antimoniais pentavalentes após um ano do término do tratamento [29].

Apesar do emprego do antimoniato de metilglucamina no tratamento da leishmaniose por mais de 50 anos, a estrutura e composição do composto, igualmente ao gluconato de antimônio (V) sódico, ainda permanecem indeterminadas. Há indícios que o Sb(III) é substancialmente mais potente do que o Sb(V) contra promastigotas e amastigotas de, pelo menos, três espécies de *Leishmania*. Esses resultados reforçam a hipótese de uma conversão metabólica intramacrofágica do Sb(V) em Sb(III) sendo, neste caso, o Sb(III) o elemento tóxico às leishmanias no estado intracelular [26].

Pouco se compreende ainda sobre o mecanismo de ação desta droga e, sugere-se que o antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, sendo convertido a antimônio trivalente após sua administração [30]. Recentemente foi verificado que, após administração intramuscular de antimoniato de N-metilglucamina em pacientes com leishmaniose, ocorre conversão *in vivo* do composto orgânico estibiado para as formas iônicas Sb^{3+} e Sb^{5+} . Ainda, foi observado que ocorre a bio-redução do Sb^{5+} para a sua forma trivalente, corroborando outros estudos que evidenciam que a formação *in vivo* do Sb^{3+} seja responsável tanto pela toxicidade da droga como pela atividade terapêutica da mesma [31].

3.5. ANFOTERICINA B

A anfotericina B (desoxicolato), figura 10, é um antibiótico poliênico com atividade antifúngica e leishmanicida. *Leishmania* e fungos contêm ergosterol como principal constituinte de suas membranas plasmáticas ao invés do colesterol das membranas de células animais. Este lipídeo é um esteróide de 28 carbonos (C-28), dupla ligação em C-22 e uma metila em C-24.

O mecanismo de ação da anfotericina B decorre de sua ligação ao ergosterol, com conseqüente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasita [32][34]. O uso clínico de anfotericina B é recomendado para os casos graves de leishmaniose. Seu uso é bastante restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que apresenta, como febres, calafrios, hipotensão ou hipertensão, diminuição da função renal e dos níveis séricos de potássio [18].

No final da década de 1990, foram desenvolvidas novas formas farmacêuticas visando diminuir a toxicidade da anfotericina B. Nestas formulações, o desoxicolato foi substituído

por outros lipídeos: anfotericina B lipossômica - o AmBisome® (Fujisawa, Deerfield, IL/EUA), colesterol sulfato de anfotericina B – Amphotec® (Sequs, Menlo Park, CA/EUA) e o complexo lipídico de anfotericina B - Abelcet® (Liposome Co., Princeton, NJ/EUA). Em geral, estas formulações são bem absorvidas pelo sistema fagocítico mononuclear, no qual, as *Leishmanias* residem, sendo pouco absorvidas pelo rim, o órgão alvo de toxicidade do fármaco [35].

Abaixo, na Figura 10, está representado a fórmula estrutural da Anfotericina B, com nome químico e comercial respectivamente.

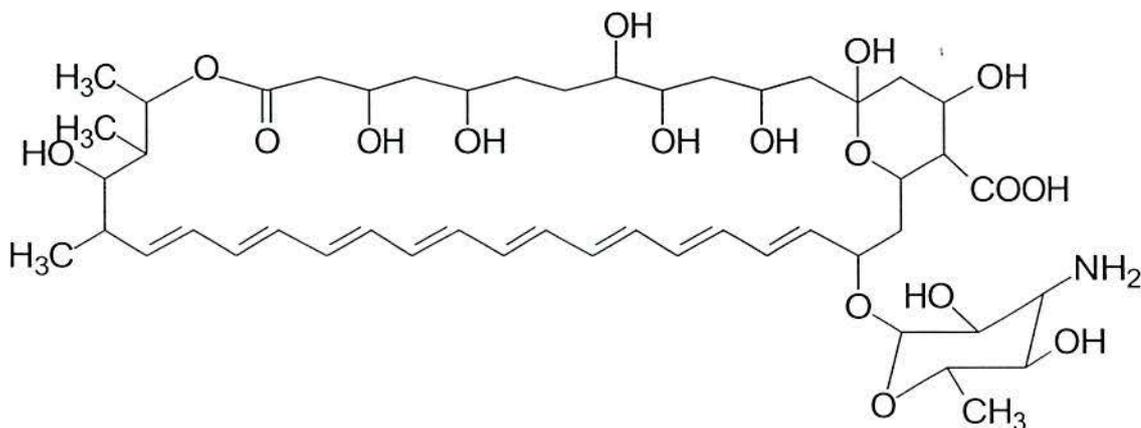


Figura 10 - Desoxicolato - Anfotericina B

3.6. PARAMOMICINA

A paromomicina (aminosidina), Figura 11, é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, licenciado na Europa para o tratamento parenteral de infecções bacterianas. Seu mecanismo de ação consiste na inibição de síntese protéica, através de ligação às proteínas ribossômicas induzindo a leitura equivocada do mRNA. Desta forma, interfere no complexo de formação de peptídeos e causando ruptura dos polissomos em monossomos não funcionais. A paromomicina é diferente da neomicina B somente na substituição de um grupamento OH por uma amina (NH₂) e possui um espectro de atividade parasitária, que não é apresentada por outro antibiótico aminoglicosídeo. A utilização de paromomicina oral tem sido recomendada para o tratamento de teníase e amebíase. A forma injetável (124 mg/kg/dia por 19 dias em média) tem sido utilizada como monoterapia para a leishmaniose visceral, apresentando resultados positivos em estudos clínicos realizados no Quênia e na Índia [18].

Em outros estudos, a paromomicina associada ao Pentostan® apresentou resultados similares àqueles obtidos quando o antimonial é usado sozinho, mas neste caso o tempo de

tratamento foi reduzido à metade [36]. Entretanto, a paromomicina pode apresentar nefro e ototoxicidade, afetando o oitavo par de nervos cranianos, o que pode levar também a problemas de controle motor e do equilíbrio. Outro problema com a paromomicina é que o fabricante original interrompeu a produção e sua disponibilidade para uso não está assegurada. Além disso, esse fármaco foi testado em número insuficiente de pacientes para que os efeitos colaterais e a resistência dos parasitas fossem convenientemente avaliados [18].

Abaixo, na Figura 11, está representado a fórmula estrutural da Paramomicina, com nome químico e comercial respectivamente.

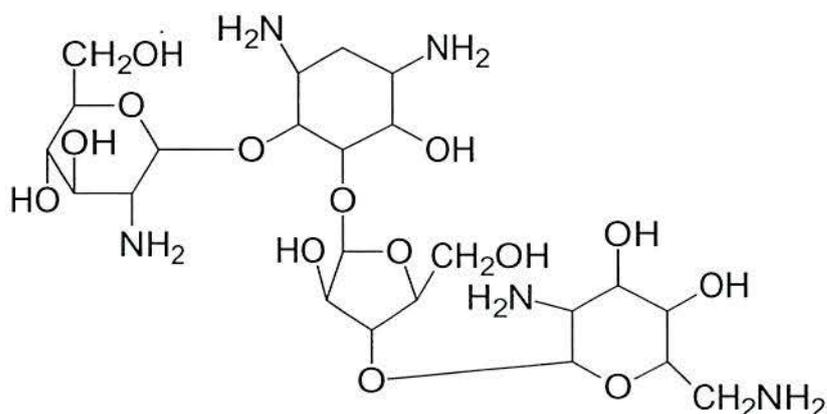


Figura 11 - Paramomicina – Humatin

3.7. MILTEFOSINE

Hexadecilfosfocolina ou miltefosina, Figura 12, é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer [37]. O fármaco vem sendo utilizado na Índia para o tratamento de pacientes com leishmaniose refratária ao tratamento convencional com antimoniais, apresentando resultados bastante promissores [38] e atualmente vem servindo com ótima alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral, uma vez que o fármaco pode ser administrado por via oral, ao contrário de outros [39]. Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostraram a eficácia deste fármaco para o tratamento de infecções por *L. donovani* [40].

O mecanismo de ação da miltefosina contra *Leishmania* ainda é bastante controverso. Foi demonstrado que a síntese de lipofosfoglicano (LPG) e glicoproteína 63 (gp63) é inibida em parasitas tratados com este fármaco. Também foi observado a inibição da enzima 1-acil-2-lisoglicero-3-fosfocolina aciltransferase em promastigotas tratadas com diferentes concentrações de miltefosina [41]. Entretanto, a relevância de tais achados no tratamento clínico ainda não foi evidenciada. É possível que este fármaco atue em *Leishmania* assim

como atua em células tumorais, induzindo à apoptose e alterando as vias de sinalização celular mediada por lipídeos [42]. Outros estudos sugerem que este fármaco possui propriedades imunomodulatórias [43][44][45][46]. Entretanto, mesmo em camundongos imunodeficientes, este fármaco apresenta atividade antitumoral [44] e leishmanicida [47], sugerindo que sua atividade não está relacionada com uma resposta imunodependente de célula T [44], [47]. Pacientes imunodeprimidos com leishmaniose respondem pobremente aos antimoniais, apresentando níveis de falha e recidivas da ordem de 52% entre 1 e 36 meses após o tratamento [48]. A miltefosina poderia ser uma alternativa para o tratamento desses pacientes, uma vez que sua ação não está relacionada ao estado imunológico do hospedeiro. Entretanto, o fármaco parece afetar o sistema gastrointestinal, causando vômitos e diarreia, além de poder aumentar os níveis sanguíneos de transaminases, bem como elevar a uremia e creatininemia [49].

Abaixo, Figura 12, está representado a fórmula estrutural da Miltefosine, com respectivo nome químico e comercial.

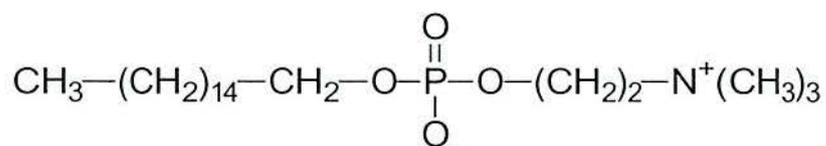


Figura 12 - Hexadecilfosfocolina - Miltefosine

3.8. PENTAMIDINA

A descoberta da atividade quimioterápica das substâncias do grupo das diamidinas, do qual faz parte a pentamidina, foi inteiramente fortuita. A pentamidina, além de ser relativamente eficaz na terapia da leishmaniose, é eficaz no tratamento de casos incipientes de tripanossomíase gambiense ou rodesiana [50]. A pentamidina é comercializada sob o nome de Lomidina® e encontra-se disponível, nos Estados Unidos, somente no Serviço de Medicamentos para Doenças Parasitárias do Serviço de Saúde Pública. No tratamento da *leishmaniose visceral* (leishmaniose por *L. donovani*, ou Calazar) a pentamidina foi usada com sucesso, em séries de 12 a 15 doses. A segunda série, administrada após intervalo de 1 a 2 semanas, pode ser necessária em áreas onde se sabe que a infecção responde de modo insatisfatório ao tratamento. A substância é particularmente útil em casos que não responderam aos antimoniais ou para pacientes com Calazar que sejam hipersensíveis ao antimônio. A alta toxicidade desta droga também é fator limitante para o uso. Hipoglicemia,

hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina foram descritas [25].

As amidinas são compostos orgânicos caracterizados pela presença dos grupamentos C=N e C-N, que proporcionam propriedades específicas das funções azometina e amina, respectivamente. Esses compostos se mostram interessantes, principalmente por apresentarem atividade biológica variada. Os derivados aromáticos destes compostos são os mais intensamente estudados. Dentre estes derivados, a pentamidina e o Berenil® (agentes terapêuticos antitripanossomas africanos) são os compostos mais representativos. Tais diamidinas aromáticas, especialmente a pentamidina, apresentam atividade antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral [17]. Também foi descrito que a pentamidina, utilizada na clínica contra casos de leishmanioses resistentes aos antimoniais pentavalentes, apresenta bons resultados em pacientes imunodeprimidos [51]. As diamidinas aromáticas são usadas para o tratamento das leishmanioses desde 1939 e são tóxicas para diversos protozoários [17]. Estes fármacos são muito usados na clínica em casos não responsivos aos antimoniais pentavalentes e também por apresentarem menos efeitos colaterais. A recomendação da OMS para o tratamento com pentamidina é 4 mg/kg, aplicados por via endovenosa três vezes por semana. Após a administração de 15 injeções (5 semanas de tratamento) foi observado que 77% dos pacientes com leishmaniose visceral evoluíram para cura e após a administração de 27 injeções (9 semanas de tratamento) o percentual de cura foi de 94% [18]. As diamidinas interferem na síntese de poliaminas, impedindo, assim, a síntese de moléculas importantes para a manutenção da vida do parasita [51]. Além disso, elas são capazes de se ligar ao DNA em regiões ricas em seqüências A – T (adenina – timina). A pentamidina usada no tratamento da leishmaniose cutânea apresentou-se menos tóxica do que os antimoniais pentavalentes, embora tenham sido observados alguns efeitos adversos expressivos, como mialgias, dor no local da administração, náuseas, dores de cabeça e hipotensão [18]. Entretanto, em alguns casos do tratamento da leishmaniose visceral, é necessária a administração de altas doses de pentamidina, sendo os efeitos tóxicos observados maiores do que os apresentados pelos antimoniais pentavalentes, havendo exacerbação dos efeitos já citados e a incidência de taquicardia e hiperglicemia [27]. Foi proposto o encapsulamento de pentamidina em lipossomas revestidos por açúcares como forma de melhorar o direcionamento do fármaco para as células-alvo, aproveitando os processos de endocitose mediada por receptores [53]. Um estudo com diamidinas e diimidazolinias comprovou que nos compostos com ligante 2 - buteno entre os grupos catiônicos, isômeros trans foram mais potentes do que isômeros cis em atividade leishmanicida [54]. Abaixo,

4. METODOLOGIA

Como metodologia desse trabalho tem um estudo literário constituído por uma proposta de projeto tecnológico, formação do “produto A” e formação do “produto B”.

4.1. PROPOSTA

Considerando as estruturas descritas acima, observou-se que nenhuma das drogas utilizadas como leishmanicidas possuem estruturas semelhantes entre si, que pudessem descrever ou evidenciar a atuação da droga no organismo humano, a proposta então será propor duas novas alternativas de estruturas análogas a pentamidina baseadas no estudo de cada uma das drogas utilizadas para o mesmo fim.

Considerando a toxicidade dos leishmanicidas antimoniais, que devido a presença do antimônio em sua estrutura, acredita-se que seja o maior causador dos efeitos colaterais do fármaco, uma nova proposta de medicamento seria um fármaco orgânico não metálico, derivado de estruturas orgânicas ativas ao protozoário mas sem a presença do metal tóxico.

As inovações propostas serão baseadas numa alteração estrutural da molécula de pentamidina (leishmanicida orgânico não metálico) com intuito de melhorar sua atividade e, bem como, na diminuição dos efeitos colaterais. Pela sua natureza de concepção teórica, não temos elementos definitivos sobre a atividade e efeitos adversos e, portanto não serão objetos de análise neste projeto. Serão apresentadas a concepção de síntese de estruturas químicas com potencial farmacológico. A preparação e os testes farmacológicos em bancada constitui parte posterior do projeto.

4.1.1. Escolha da Pentamidina – A Inspiração Científica

A Pentamidina foi a droga de escolha para ser derivatizada porque possui uma estrutura relativamente simples e favorável a introdução de outros grupos funcionais. Os antimoniais não foram escolhidos exatamente pelo fato de não se querer obter um medicamento com antimônio presente. A Anfotericina e Paramomicina (letras minúsculas-revisar todas as palavras) possuem estruturas grandes e complexas de sofrer modificações. Quanto a Miltefosine, a mesma não foi utilizada para derivatização devido o fato de não ter sua atividade leishmanicida comprovada.

A síntese da pentamidina pode ser representada pela junção do esquema da

Figura 14 com o da Figura 15.

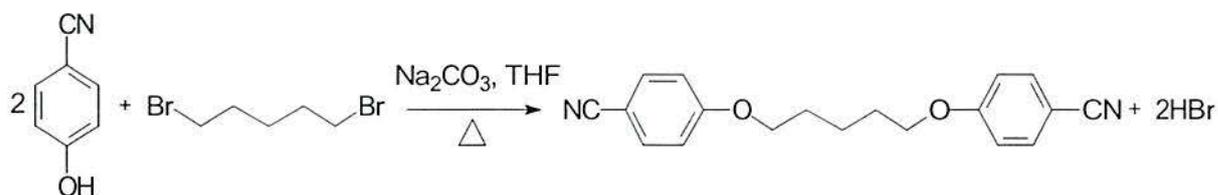


Figura 14 - Formação da cadeia principal do molécula

De acordo com a Figura 14, a reação de formação da cadeia principal da molécula de pentamidina ocorre em meio básico utilizando como solvente o THF e sob aquecimento. A reação de substituição nucleofílica (S_N2) se processa entre dois equivalentes do 4-cianofenol e o dibromopentano, resultando no primeiro intermediário de formação da pentamidina (cadeia principal da molécula) e duas moléculas de ácido bromídrico [55].

Partindo-se então para etapa final de formação da molécula de pentamidina, podemos através da Figura 15 verificar a formação dos grupamentos amidina nas extremidades da cadeia principal, onde os grupos nitrila ligados aos anéis aromáticos reagem com amônia para formação dos grupos amidina [55].

Observando a Figura 15 verificamos o equilíbrio na reação. Para que se possa deslocar o equilíbrio no sentido de formação da amidina é necessário se utilizar como haleto ligado ao íon amônio o brometo para formação da amônia utilizada na reação com a nitrila, Figura 16. A utilização do bromo ligado ao íon amônio leva a uma reação mais rápida, com deslocamento do equilíbrio para a direita. Para melhoramento do resultado é utilizado excesso do íon amônio para aumento da concentração ácida do meio racional. O solvente usado pode ser uma mistura de metanol com etanol [54].

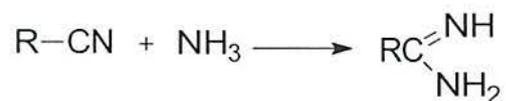


Figura 15 - Formação do grupamento diamidina

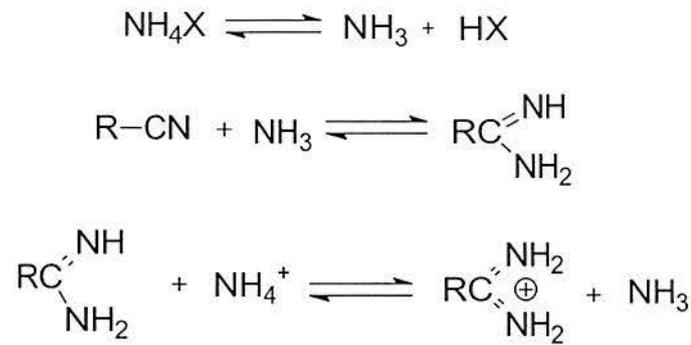


Figura 16. Esquema de formação da amidina

Após a formação do grupamento representado na Figura 15, podemos verificar a formação da molécula da Pentamidina, na Figura 17.

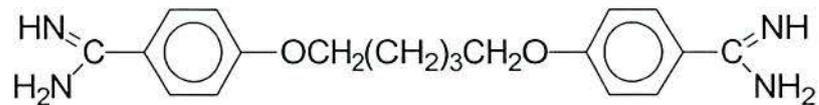


Figura 17 - Molécula de Pentamidina

A pentamidina possui em sua estrutura de duas partes bem definidas, as extremidades, parte polar hidrofílica, e a cadeia central, parte apolar e lipofílica. Abaixo, na Figura 18, está representado um esquema genérico que representa a forma da pentamidina.

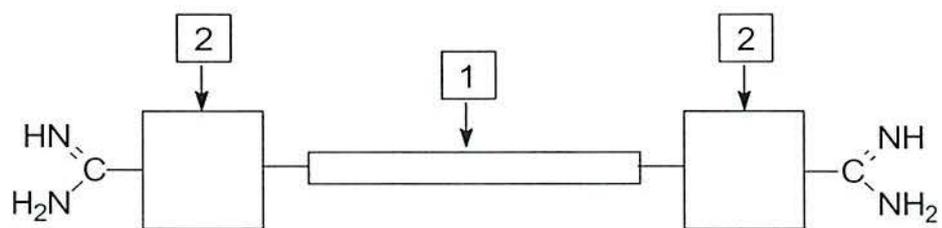


Figura 18 - Esquema genérico da estrutura da Pentamidina

O esquema acima é representado por blocos numerados que representam as seguintes estruturas:

- 1 – representa a parte lipofílica da molécula;
- 2 – representa a parte rígida da molécula, com o grupo hidrofílico terminal.

Como projeto tecnológico serão propostas as seguintes alterações:

(i) - modificação da parte lipofílica, representado pelo número 1 no esquema. O produto formado será chamado de “Produto A”.

(ii) - modificação da extremidade da cadeia, parte hidrofílica, representado pelo número 2 na Figura 18, acima. O produto formado será chamado de “Produto B”.

4.2. ALTERAÇÃO DA CADEIA CENTRAL – FORMAÇÃO DO “PRODUTO A”

A proposta de alteração da cadeia central será através da adição de cadeia fosfatada. Essa modificação é baseada na estrutura da Miltefosine, droga que apresenta a vantagem de ser ingerido oralmente o que poderia conferir a esse novo produto essa mesma propriedade. Abaixo, na Figura 19, está representado o novo fármaco proposto.

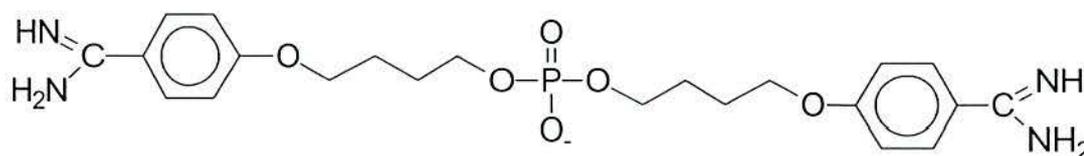


Figura 19 - Estrutura química do “Produto A”

Utilizando a idéia de retróssíntese da estrutura acima, podemos imaginar as seguintes desconexões para o composto, representada na Figura 20. Os grupamentos “X” ligados à cadeia central, inserida no composto são halogênios.

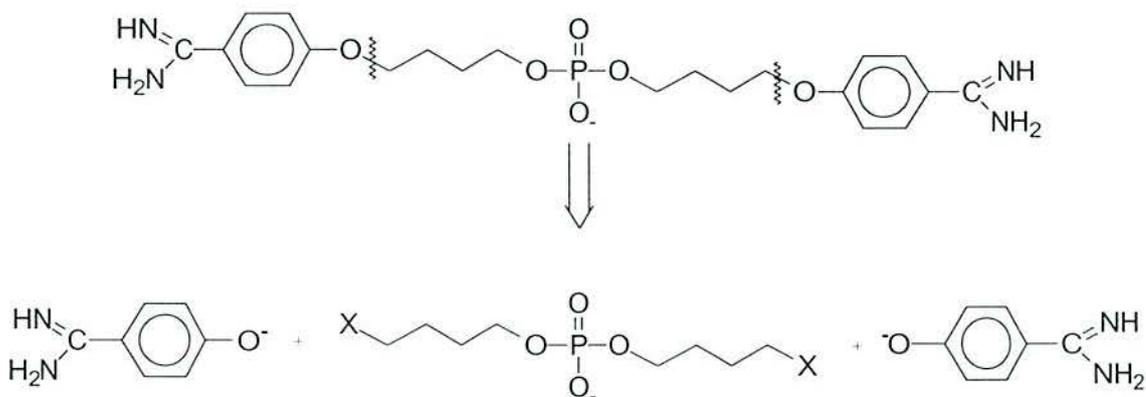


Figura 20 – Retrossíntese do “Produto A”

4.2.1. Escolha do Fosfato de Alquila como alternativa para Cadeia Central

Poderia se fazer diversas mudanças na cadeia central da pentamidina. A escolha da cadeia fosfatada como alternativa para a inserção entre os grupos polares da estrutura da pentamidina se deu através das considerações feitas pela análise da estrutura do fármaco Miltefosine.

A Miltefosine é um fosfolípido que, apesar de não se conhecer exatamente como age no organismo humano como leishmanicida, interage com a membrana celular do protozoário, eliminando este.

Esta interação se dá devido ao fato de a membrana plasmática do protozoário ser muito semelhante à membrana celular humana. A membrana plasmática de uma célula humana é formada por uma dupla camada fosfolipídica. Abaixo, na Figura 21, temos representado a composição da membrana plasmática. Esta característica da membrana confere uma melhor facilidade da interação entre a membrana do parasita e o medicamento.

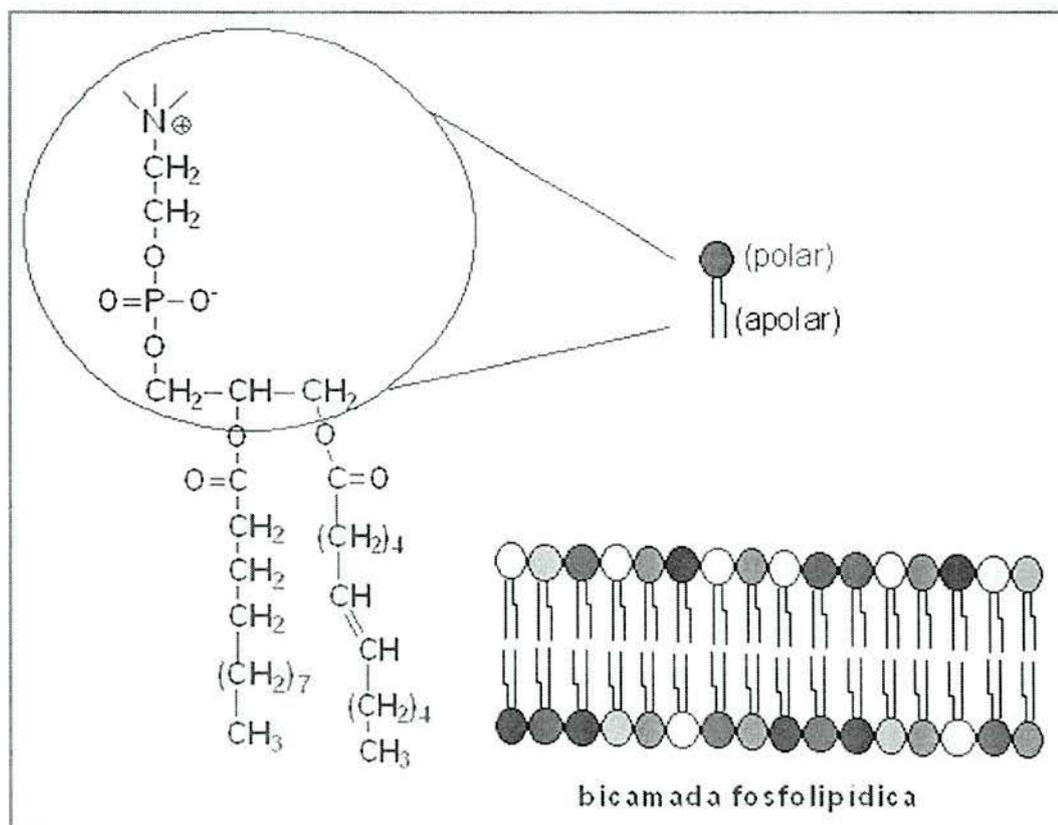


Figura 21 - Representação da camada fosfolipídica presente na membrana plasmática.

4.2.2. Síntese da Miltefosine

Para que possamos esquematizar a síntese da cadeia alquílica fosfatada que será ponto de partida do Produto A, é necessário entendimento de como ocorre a formação da Miltefosine [56]. Na Figura 22, podemos observar em um primeiro momento a reação do bromoetanol com o dimetilclorofosfito através da reação de substituição nucleofílica (S_N2) com DCM, Piridina a 0°C resultando no intermediário 1 e uma molécula de HCl. O intermediário reage com iodo em meio aquoso fazendo com que ocorra por substituição nucleofílica (S_N2) uma desmetilação do grupamento fosfito, Figura 23, resultando no intermediário 2, um bom grupo de saída, e iodeto de metila.

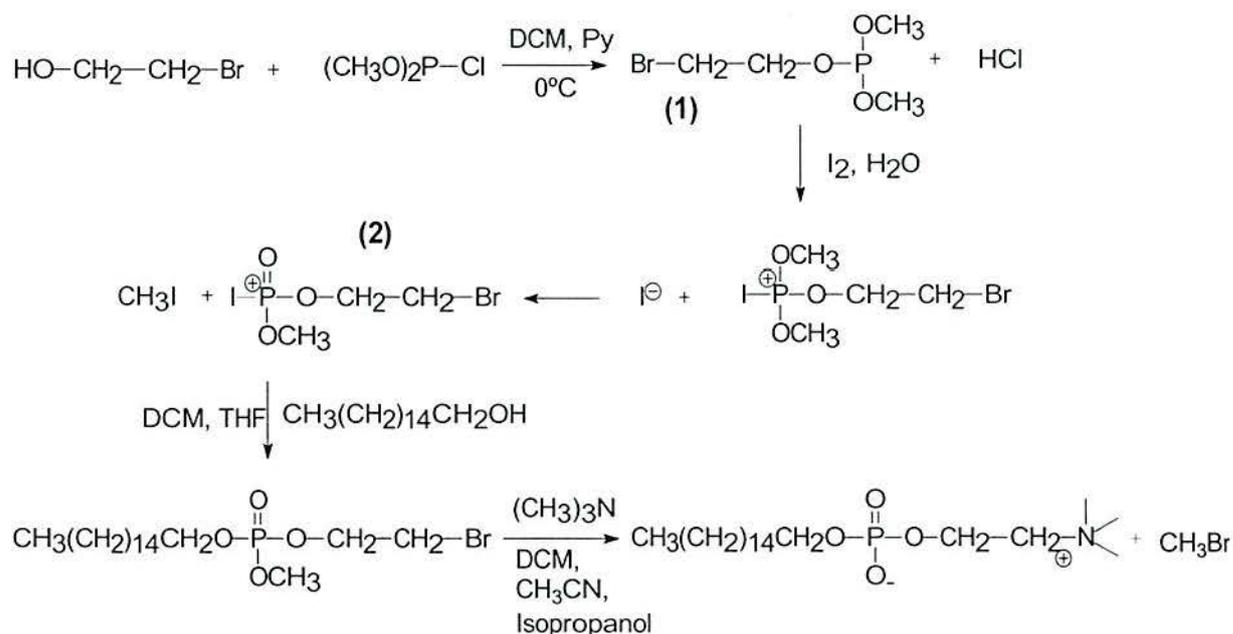


Figura 22 - Síntese da Miltefosine

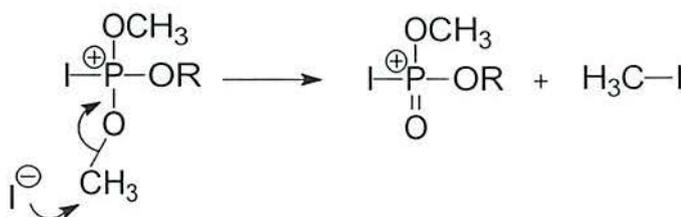


Figura 23 - Esquema de formação do grupamento fosfato

Em uma segunda etapa, verificada na Figura 24, temos a reação do intermediário 2 com bromoetanol em DMC e THF para formação do hexadecil metil 2-bromoetilfosfato. Este

último reagido com trimetilamina em meio aquoso com acetona, isopropanol e DCM leva a formação do hexadecilfosfocolina, Miltefosine.

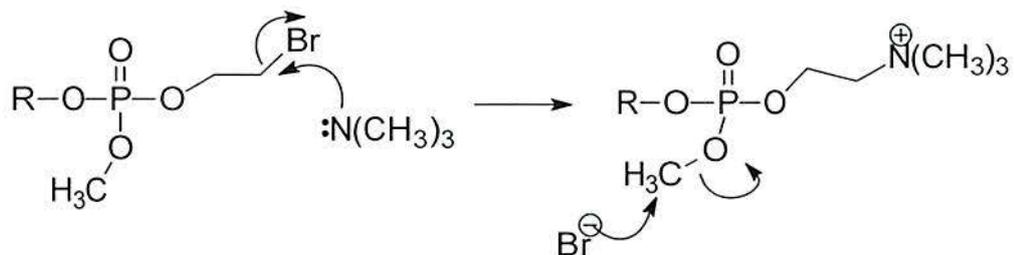


Figura 24 – Esquema de inserção da amina para formação da Miltefosine

4.2.3. Síntese do Fosfato de Alquila

Através da análise da formação da molécula de miltefosine, item 3.2.2, podemos propor o esquema de formação da cadeia central do “Produto A”.

De acordo com a Figura 25, a reação de formação da cadeia central do “Produto A” se processa através da reação de substituição nucleofílica $\text{S}_{\text{N}}2$ do bromopentanol com dimetilclorofosfito a temperatura de 0°C e DCM como solvente e piridina como base, resultando em uma molécula de HCl e o intermediário 1. O intermediário 1 é reagido com iodo em meio aquoso ocasionando a desmetilação do fosfito resultando no intermediário 2, um bom grupo de saída, e iodeto de metila. O intermediário 2 irá reagir com bromofenol através de reação de substituição nucleofílica $\text{S}_{\text{N}}2$ levando à formação da cadeia central do “Produto A”.

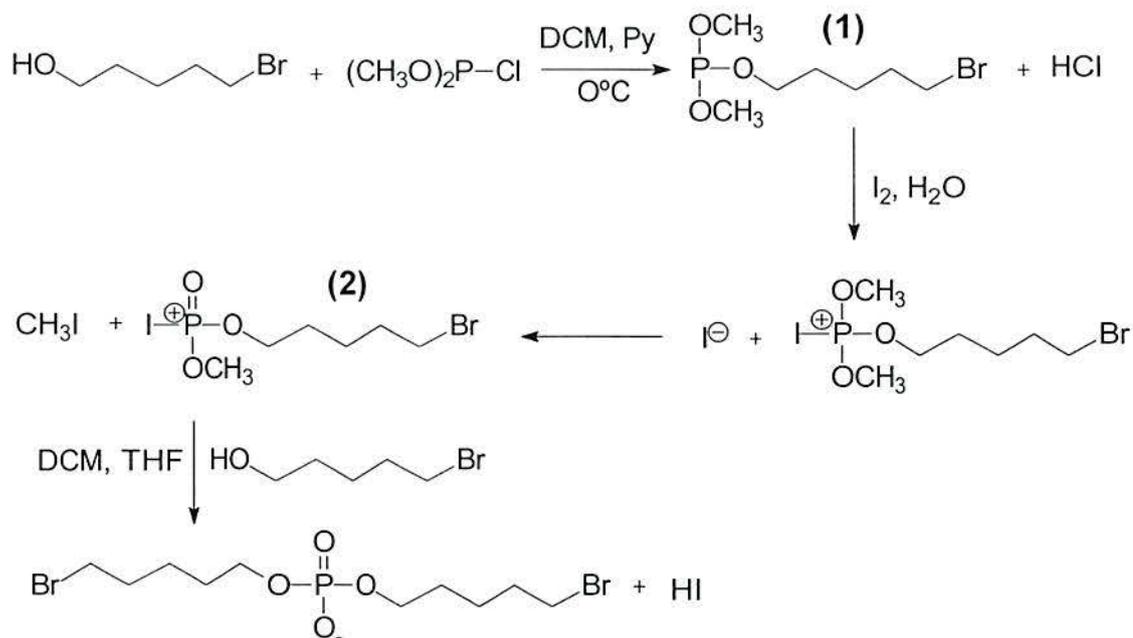


Figura 25 - Síntese da cadeia principal do “Produto A”

4.2.4. Síntese do “Produto A”

Abaixo será representado a Figura 26, esquema de formação do produto derivado da pentamidina. Este análogo possui como modificação estrutural, que o diferencia da pentamidina, uma cadeia com grupo fosfato inserido no meio desta.

De acordo com a Figura 26, a reação de formação do “Produto A” ocorre em meio básico utilizando-se como solvente o THF sob aquecimento. A reação de substituição nucleofílica S_N2 se realiza entre dois fenóis com grupo nitrila e a cadeia central do “Produto A”, resultando na formação da cadeia principal do produto.

Para formação dos grupamentos amidina foi seguido o mesmo procedimento de formação da amidina citado no item 4.1.1. Após a formação dos grupos amidinas nas extremidades da cadeia obtemos e a estrutura final do “Produto A”.

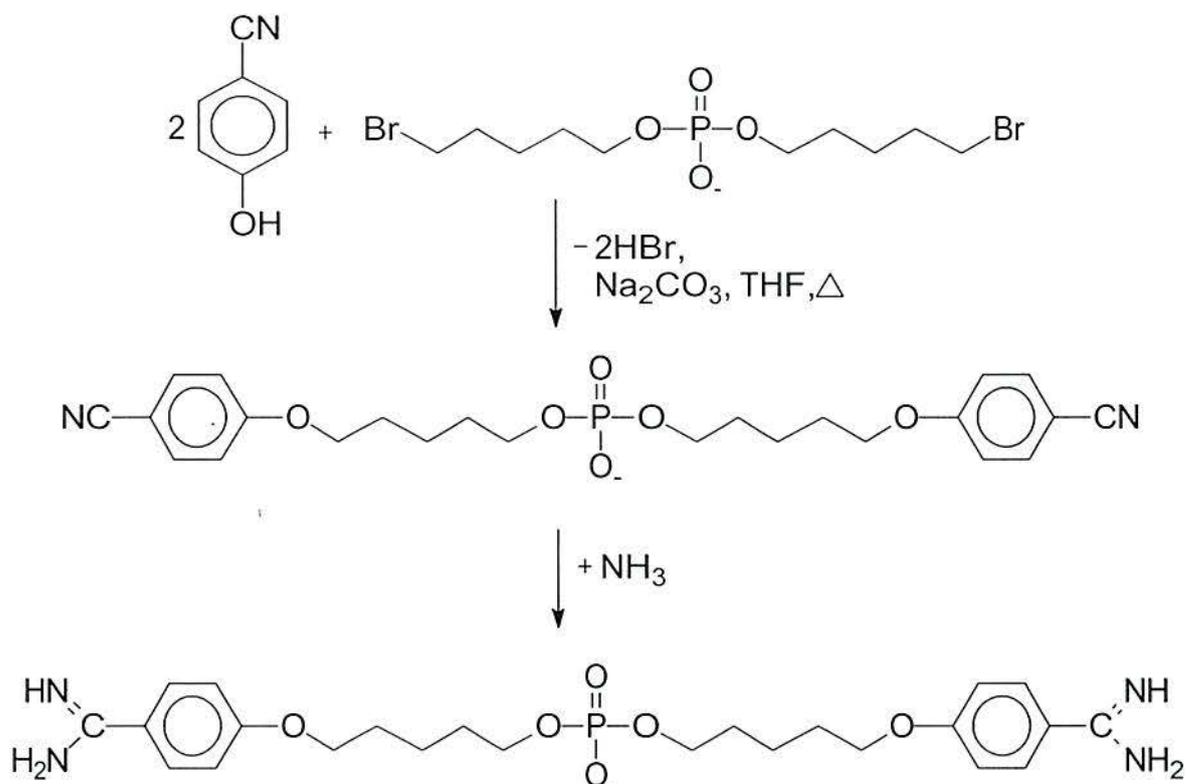


Figura 26 - Síntese do “Produto A”

A inserção do grupo fosfato teve como principal objetivo a tentativa de que o produto final possa, após futuros estudos, aumentar a interação entre a membrana plasmática do protozoário e o medicamento, tornando-o mais eficiente. Espera-se que, após comprovação de atividade leishmanicida, este produto formado possa ser ingerido oralmente, característica bastante importante para este tipo de medicamento pois o tratamento endovenoso, característico dos demais tratamentos, é bastante difícil.

4.3. ALTERAÇÃO DAS EXTREMIDADES DA MOLÉCULA – FORMAÇÃO DO “PRODUTO B”

Como proposta de alteração das extremidades da molécula de pentamidina teremos a inserção de isoxazóis nas extremidades da estrutura. Esta escolha se deu devido as propriedades farmacológicas analgésicas, bactericidas e antiinflamatórias que alguns isoxazóis possuem [57]. A estrutura do isoxazol está representado na Figura 27.

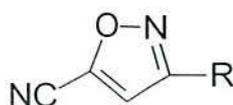


Figura 27 - Estrutura de um isoxazol

Como proposta de inserção de isoxazóis, como estrutura final temos a Figura 28.

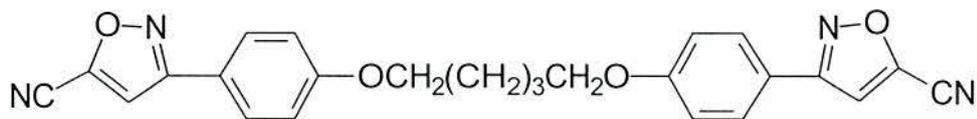


Figura 28 - Estrutura química do "Produto B"

Através de análise da estrutura, por retrossíntese, chegamos a Figura 29.

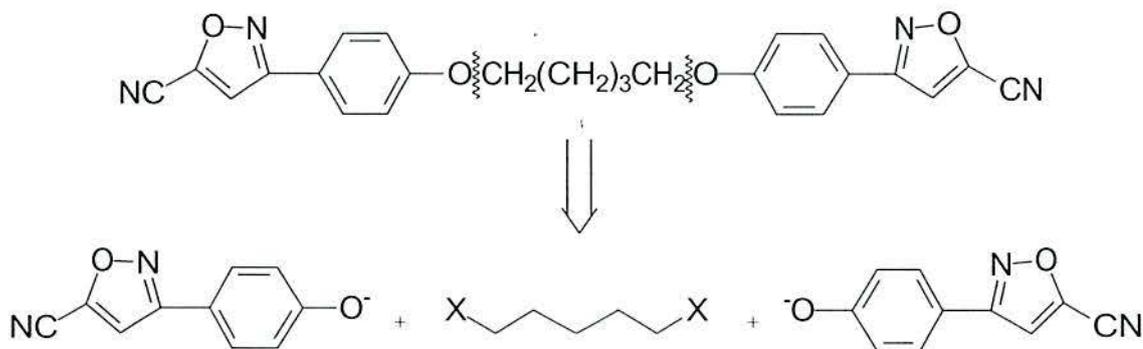


Figura 29 - Retrossíntese do "Produto B"

A síntese de isoxazolinas e oxazóis pode ser representada na Figura 30.

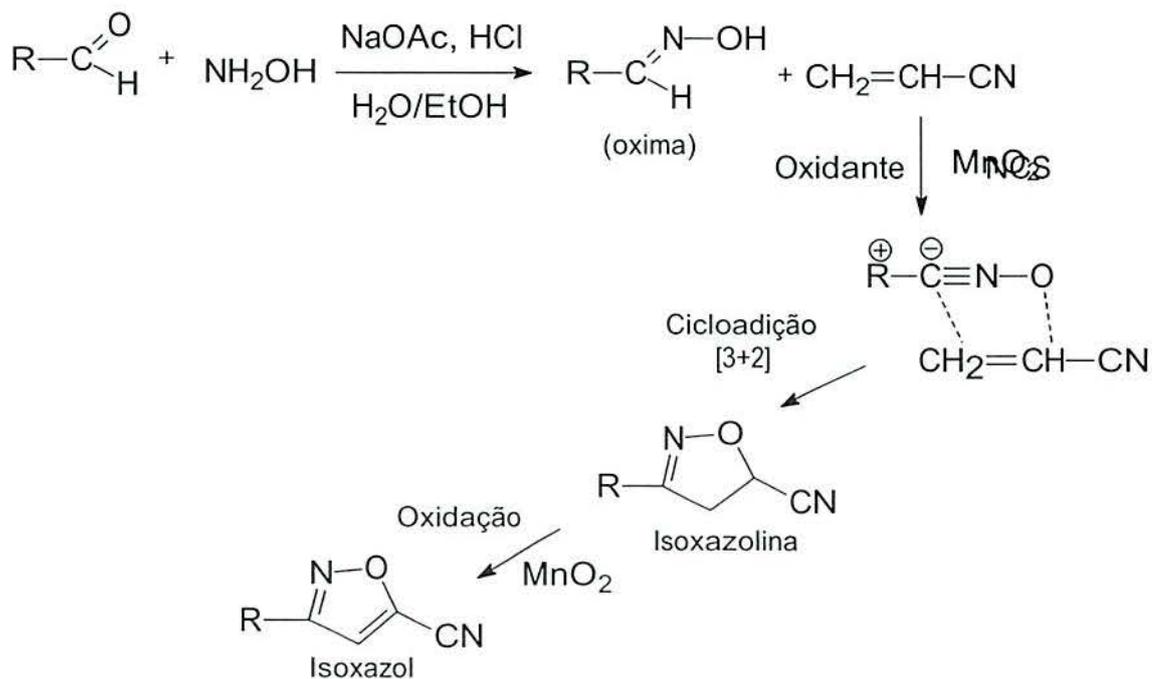


Figura 30 - Síntese de Isoxazóis e Isoxazolinas

A síntese dos isoxazóis se inicia com a formação da oxima, essa consiste na reação de aldeído alquilado, cloridrato de hidroxilamina e acetado de sódio como base através de reação de substituição nucleofílica S_N2 .

A síntese do intermediário isoxazolina foi realizada utilizando-se uma oxima alquilada e o estireno nitrila através da reação de cicloadição [3+2] 1,3-dipolar como mostrado na Figura 28.

Esta reação é realizada na presença de um oxidante, o *N*-clorosuccinimida, de base piridina e como solvente clorofórmio. A reação foi realizada a temperatura ambiente. O produto formado foi a 3,5-isoxazolina.

Na reação de cicloadição [3+2] 1,3-dipolar, a geração *in situ* do óxido de nitrila é baseada no fato que o equilíbrio entre o ácido hidroxímico e o óxido de nitrila é geralmente dirigido para a esquerda. Entretanto, o equilíbrio pode ser movido para a direita por aquecimento da solução na presença de um aceptor do óxido de nitrila. O deslocamento do equilíbrio é observado, considerando que o óxido de nitrila é consumido imediatamente.

4.3.1. Síntese do “Produto B”

Analisando a Figura 30 juntamente com a retrosíntese mostrada na Figura 29, podemos propor como síntese do “Produto B” a Figura 31.

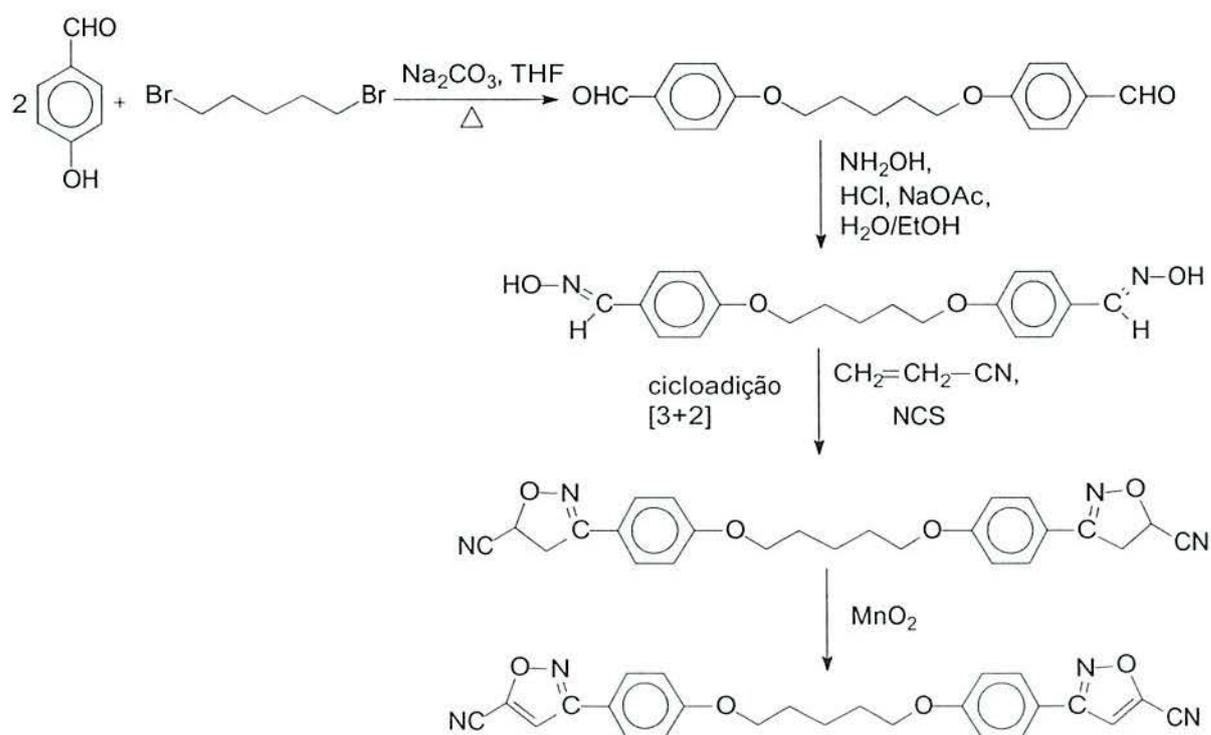


Figura 31 - Síntese do “Produto B”

De acordo com a Figura 31, podemos verificar em um primeiro momento a reação entre o dibromopentano com dois fenóis com grupo aldeído. A reação se processa nas mesmas condições citadas no item 4.1.1. Como resultado dessa primeira reação obtemos a cadeia principal do “Produto B”.

Após formação da cadeia principal temos a formação das oximas nas extremidades da cadeia com posterior cicloadição, formação da isoxazolininas e oxidação dessas para formação dos isoxazóis, item 4.3. Resultando então na estrutura final do “Produto B”.

5. CONCLUSÕES CRÍTICAS

A leishmaniose é uma doença grave e pouco divulgada. A proposta de inovações tecnológicas na área de drogas contra leishmaniose é de grande importância à saúde pública.

As duas estruturas propostas como projeto tecnológico são tentativas diferentes de obtenção de nova droga leishmanicida. O “Produto A” tentativa de droga com estrutura baseada em outro medicamento com intenção de melhor interação entre medicamento e protozoário. O “Produto B” é medicamento com inserção de parte diferente do que é utilizado como leishmanicida, tem-se a inserção de grupo com propriedades que poderiam melhorar a atividade do produto final.

Não se tentou sintetizar estes dois produtos porque eles não poderiam ser testados como medicamento. Os testes para este tipo de droga devem ser realizados *in vitro* e *in vivo*. Os testes devem ser realizados em laboratórios especializados neste tipo de estudo para não se correr risco de contaminações com o protozoário.

Considerando que todo projeto realizado foi teórico fica como proposta de continuação e evolução deste trabalho a síntese destes produtos para posteriores testes como tentativa de uso como medicamento leishmanicida.

6. REFERÊNCIAS

- [1] <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>, acessada em Setembro 2007.
- [2] Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, 74 (4) : 329 – 336. Jul./ago. 1999.
- [3] HOARE, C.A. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. v. 32, p. 67, 1938.
- [4] GOLDMAN, L. Arch. Dermatol. v. 119, p. 540, 1983.
- [5] <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>, acessada em Setembro 2007. (Organização Mundial da Saúde)
- [6] ZORZETTO, R. Pesquisa FAPESP. v. 68, p. 53, 2001.
- [7] <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/leishvis.htm>, acessada em Setembro 2007. (Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo)
- [8] <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>, acessada em Setembro 2007. (Superintendência de Controle de Epidemias)
- [9] BERMAN, J. D.; Rev. Infect. Dis. v. 10, p. 580, 1988.
- [10] <http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0517A.htm>, acessada em Setembro 2007. (Fundação Nacional de Saúde)
- [11] CHAN-BACAB, M. J; PEÑA-RODRIGUES, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. Royal Society of Chemistry (Nat. Prod. Rep), v.18, p. 674-688, 2001.
- [12] GRÖGL, M.; THOMASON, T.N.; FRANKE, E.D. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 47, p. 117-126, 1992.
- [13] ULLMAN, B.; CARRERO-VALENZUELA, E.; COONS, T. Leishmania donovani. Isolation and characterization of sodium stibogluconate (Pentostan) – Resistant cell lines. Exp. Parasitol., v. 69, p. 157-163, 1989.
- [14] LIRA, R.; SUNDAR, S.; MKHARIA, A.; KENNEY, R.; GAM, A.; SARAIVA, E.; SÁCKS; D. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian Kala-Azar is due to the emergence of Antimonies-resistant strains of Leishmania donovani. J. Infect. Dis., v. 180, 1999.
- [15] AMATO, V.S. Tratamento da Leishmaniose tegumentar americana. Tópicos em terapêutica. Rev. Bras. Med., v. 53, p. 202-212, 1998.
- [16] LAISON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Trans R. Soc. Trop. Méd. Hyg., v.77, p. 568-596, 1983.
- [17] BERMAN, J.D. Chemoterapy for leishmaniasis:biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. Rev. Infec. Dis., v.10, p. 560-586, 1988.

- [18] BERMAN, J.D. Chemoterapy of leishmaniasis: Recent advances in the treatment of visceral disease. *Curr. Opin Infec. Des.* V.11, p. 707-710, 1998.
- [19] ROBERTS, W.L.; BERMAN, J.D., RAYNEY, P.M. "In vitro" antileishmanial properties of tri and pentavalent antimoniais preparations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.39, p. 1234-1239, 1995.
- [20] GOODWIN, L.G.; PAGE, J.E. J. E. A study of the excretion of arganic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem. J.*,v. 22, p. 236-240, 1943.
- [21] SERENO, D.; HOZMULLER, P.; MANGOT, I.; CURRY, G.; QUAISSI, A.; LEMESRE, J.P. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p. 2064-2069, 2001.
- [22] TRACY, J.B.; WEBSTER JUNIOR, L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis and other protozoal infection. In: HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E., eds. *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 9.ed. McGraw-Hill Companies. p. 987-1008, 1996.
- [23] CHAKRABORTY, A.K.; MAJUMDER, H.K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v. 152, p. 605-612, 1988.
- [24] GASSER, J.R.R.A.; MAGILL, A.J.; OSTER, N.; FRANKE, E.D.; GRÖGL, M.; BERMAN, J.D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 18, p. 83-90, 1994.
- [25] BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, C.; ORDÓÑEZ, D. *Gen. Pharmacol.*, v. 30, p. 435, 1998
- [26] SERENO, D.; LEMERSE, J.L.; *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 41, p. 972, 1997.
- [27] BERMAN, J.D.; WYLER, D.J.; *Inf. Diseases*, v. 83, p. 142, 1980.
- [28] LIMONGI, J.P. *Farmacodinâmica*; Corbett, C. E., ed.; Livraria Editora Artes Médicas: São Paulo, cap. 61, 1973.
- [29] MARSDEN, P.D.; *Ver. Soc. Brás. Méd. Trop.*, v. 18, p. 187, 1985.
- [30] ROBERTS, W.L.; MCMURRAY, W.J.; RAINEY, P.M.; *Antimicrob. Agents Chemother.* V. 42, p. 1076, 1998.
- [31] MIEKELEY, N.; MORTARI, S.R.; SCHUBACH, A.O.; *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 372, p. 492, 2002.
- [32] SAHA, A.K.; MUKHERJEE, J.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* V. 19, p. 195-200, 1986.

- [33] OLLIARO, P.L.; BRYCESON, A.D.M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol. Today.*, v. 9, p. 323-328, 1993.
- [34] URBINA, J. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*, v. 114, p. S91-S99, 1997.
- [35] CUNA, R.W.; VELASQUEZ, R.; RIVA, J.; GUACHALLA, I.; RODRÍGUES, C. Enhancement of a TH1 immune response in Amphotericin B – Treated mucocutaneous leishmaniasis. *J. of Biomed. And Biotechn.*, article ID 96410, 4 pages, 2007.
- [36] THAKUR, C.P.; BHOWMICK, S.; DOLFI, L.; OLLIARO, P. Aminosidine plus sodium stibogluconate for treatment of Indian Kala-azar: A randomized dose-finding clinical trial. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 89, p. 219-223, 1995.
- [37] UNGER, C.; DAMENZ, W.; FLEER, E.^a; KIM, D.J.; BREISER, A.; HILGARD, P.; ENGEL, J.; NAGEL, G.; EIBL, H. Hexadecylphosphocoline, a new ether-lipid analog. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. *Acta Oncol.*, v. 28, p. 213-217, 1989.
- [38] SINDERMANN, H.; CROFT, S.L.; ENGEL, K.R.; BOMMER, W.; EIBL, H.J.; UNGER, C.; ENGEL, J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.*, in press, 2003.
- [39] SUNDAR, S.; ROSEMKAIMMER, F.; MAKHARIA, M.K.; GOYAL, A.K.; MANDAL, A.; VOSS, A.; HILGARD, P.; MURRAY, H.W. Trial of oral Miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet.*, v. 352, p. 1821-1823, 1998.
- [40] CROFT, S.L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anti-cancer alkyllysophospholipids against *Leishmanis donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 38, p. 1041-1047, 1996.
- [41] LUX, H.; HEISE, N.; KLENNER, T; HART, D.; OPPPERDOES, F.R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 111, p. 1-8, 2000.
- [42] ARTHUR, G.; BITTMAN, R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1390, p. 85-102, 1998.
- [43] EUA, I.; ZEISING, R.; ARNDT, D. Alkylphosphocolineinduced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U937 cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 12, p. 350-356, 1995.
- [44] SAFA, O.; PARTIN, S.; MATHEW, A.M.; BIBBY, M.C. Morphological and immunological observations on the effects of hexadecylphosphocoline (HPC) in nude mice bearing MT-1 Breast cancer xenografts. *Anticancer Res.*, v. 17, p. 37-43, 1997.

- [45] VEHMEYER, K.; SCHEURICH, P.; EIBL, H.; UNGER, C. Hexadecylphosphocoline-mediate enhancement of T cell responses to interleukin-2. *Cell Immunol.*, v. 137, p. 232-238, 1991.
- [46] ZEISIG, R.; RUDOLF, M.; EUE, I.; ARNDT, D. Influence of hexadecylphosphocoline on the release of tumor necrosis factor and nitroxid from peritoneal macrophages in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 121, p. 69-75, 1995.
- [47] MURRAY, H.W.; MONTELIBANO, C.; PETERSON, R.; SYPEK, J.P. Interleukin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, v. 182, p. 1497-1502, 2000.
- [48] DESJEUX, P. Global control and Leishmania HIV coinfection. *Clin. Dermatol.*, v. 17, p. 317-325, 1999.
- [49] FISCHER, C.; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 190, p. 85-87, 2001.
- [50] DOUA, F.; MIEZAN, T.W.; SINGARO, J.R.S.; YAPPO, F.B.; BALTZ, T. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 55, p. 586, 1996.
- [51] BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M.A.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type pentamidine treated and ppentamidine-resistant Leishmania. *Exp. Parasitol.*, v. 85, p. 274-282, 1997.
- [52] BACHARACH, U.; BREM, S.; WERMAN, S.B.; SCHNUR, L.F.; EL-ON, J.; GREENBLATT, C.I. Leishmania spp: Effect of inhibitors on growth and on polyamine and macromolecular synthesis. *Exp. Parasitol.*, v. 48, p. 464-470, 1979.
- [53] BANERJEE, G.; NANDI, G.; MAHATO, B.; PAKRSHI, A.; BASU, M.K. Drug delivery system: targeting of pentamidines to specific sites using sugar grafted liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 38, p. 145-150, 1996.
- [54] DONKOR, I.O.; ASSEFA, H.; RATTENDI, D.; LANE, S.; GOLDBERG, B.; BACCHI, C. Trypanocidal activity of dicationic compounds related to pentamidine. *Eur. J. Med. Chem.*, v.36, p. 531-538, 2001.
- [55] SCHAEFER, F.C.; KRAPCHO, A.P. Preparation os Amidine Salts by Reaction of Nitriles with Ammonium Salts in the Presence of Ammonia, 1962.
- [56] HEDRICKSON, E.K.; HENDRICKSON, H.S. Efficient syntesis of the cholinephosphate phospholipids headgroup. *Chemistry and Physics of Lipids.* v.109, p. 203-207, 2001.

[57] RITTER, O.M.S.; GIACOMELLI, F.C.; PASSO, J.A.; DA SILVEIRA, N.P.; MERLO, A.A. Synthesis of 3,5-Disubstituted Isoxazolines as a Template for Liquid-Crystalline Polymers. *Polymer Bulletin*, v.56, p. 549-561, 2006.