

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**PREPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TOXICOLÓGICA DO  
PRÓ-FÁRMACO HIDROXIMETILNITROFURAL, POTENCIALMENTE  
ANTICHAGÁSICO.**

**Mara Filomena Ferreira de Melo**

**ORIENTADOR: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Chung Man Chin**

**ARARAQUARA - SP**

**2006**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

PREPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TOXICOLÓGICA  
DO PRÓ-FÁRMACO HIDROXIMETILNITROFURAL,  
POTENCIALMENTE ANTICHAGÁSICO.

Mara Filomena Ferreira de Melo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup> Chung Man Chin

ARARAQUARA - SP

2006

**Para meus pais, Irineu e Carminha,  
meu irmão, Alfredo José  
e meu noivo Rodrigo.**

**“Todo dia e mesmo cada minuto se torna novo, porque o amor de  
Deus se renova por nós a cada manhã que desperta”**

**Luzia Santiago**

## AGRADECIMENTOS

Quando se trabalha junto, não acontece uma simples soma, ao contrário: a chama se multiplica. A realização deste estudo foi tarefa que envolveu a colaboração direta ou indireta de muitas pessoas, sem as quais o mesmo não teria sido concretizado. Manifesto minha gratidão a todos os envolvidos e, de forma particular:

à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Chung Man Chin, minha orientadora e amiga. Um ser humano de muito bom coração, que me ensinou que a fé remove montanhas e que o amor de Deus é maior que tudo e todos. Sua figura é para mim fonte de inspiração profissional e pessoal. Muito obrigado pelo aprendizado saboroso, resultado de uma orientação competente, amiga e criativa;

à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Longo, que esteve comigo, lado a lado, desde o início deste trabalho, orientando, sugerindo e ensinando os caminhos mais frutíferos;

aos membros da banca examinadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Cruz e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Longo pela aprovação e contribuição que prestaram a este humilde estudo com seus comentários, questionamentos e sugestões;

à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia da Silva, pelos ensinamentos e sugestões, oferecidos no momento do exame de qualificação deste trabalho;

aos meus familiares, pessoas presentes em todos os instantes de minha vida. Queria destacar a amizade, compreensão e apoio recebido do meu noivo Rodrigo, minha alma gêmea que sempre me dedicou amor extremo, dos meus pais Irineu e Maria do Carmo, meu

irmão Alfredo, da minha avó Aparecida, dos meus tios Célia, Adilson, Isabel e Francisco e aos meus primos Francisco, Alex, Caio, Rita, Elisângela e Tatiane.

aos meus amigos do grupo de pesquisa que me ajudaram na busca dos dados e informações. Mas, principalmente, no carinho e apoio. São eles: Ricardo, o amigo que me acolheu e acompanhou; Ednir, amigo sincero e carinhoso, aos dois agradeço pela ajuda prática, sem à qual não seria possível à realização do estudo; Antônio, um homem de caráter inigualável e um profissional exemplar; Jean um amigo sereno e sensato; Renato, calado e objetivo, mas divertidíssimo nas horas vagas e Rodolfo, “o machão” (é pra impressionar); e também às minhas amigas: Eliana, cuidando de todos como uma mãe; Thaís, que sempre me dedicou carinho e cuidados de uma irmã; Vanessa, que transmitiu serenidade e calma nos momentos de dificuldade; Lúcia exemplo de garra e persistência; Lorena, com informações valiosas e ajuda prestimosa; Andréia, amiga das viagens e saborosas conversas, enfim a todos pelas discussões que puderam contribuir com o estudo e as conversas descontraídas que contribuíram com a alma;

aos técnicos Luciene, Eduardo, Fátima e principalmente Osmar pela contribuição técnica e valiosa amizade;

à companheira de quarto e amiga de colégio Grá, pessoa bondosa e com bom humor animador nas horas difíceis;

em especial, à minha amiga-irmã Thaís Bonini, a qual a presença sempre ao meu lado foi primordial e necessária;

aos amigos, colegas, professores e funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos e do Programa de Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara que, direta ou indiretamente, contribuíram para enriquecer as reflexões desenvolvidas no decorrer do curso de Mestrado e também na elaboração desta dissertação.

A elaboração desta dissertação também contou com o importante apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), efetivada através de uma bolsa de estudos, concedida pelo Programa de Demanda Social. Registro aqui a minha gratidão a essa Coordenação, que tanto favorece e estimula a pesquisa científica no Brasil.

***“O Senhor é minha luz e minha salvação, a quem temerei? O Senhor é o protetor de minha vida, de quem terei medo? Sei que verei os benefícios do Senhor na terra dos vivos! Espera no Senhor e sê forte! Fortifique-se o teu coração e espera no Senhor!”  
(SI 26,1.13-14).***

## RESUMO

*A doença de Chagas representa um dos mais sérios problemas médico-sanitários da América Latina. Nos 21 países endêmicos, estima-se que 18 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas e cem milhões estão sob risco. No Brasil apenas o benznidazol está disponível para o tratamento apresentando alta incidência de efeitos adversos e ineficácia na fase crônica da doença. O desenvolvimento de fármacos mais eficazes e com menor toxicidade contra a doença de Chagas é necessário, e para tal é importante o conhecimento dos alvos terapêuticos para o planejamento racional por novos compostos. Estudos demonstraram que a tripanotiona redutase (TR) é a enzima chave do metabolismo anti-oxidativo do *T. cruzi*. Os nitrofuranos atuam como substratos da TR e são também efetivos inibidores enzimáticos da redução do tripanotiona dissulfeto. Entre os compostos nitrofurânicos, o nitrofurural apresentou atividade contra *T. cruzi*, mas alta toxicidade por via oral e severos efeitos adversos. A latenciação de fármacos é um dos métodos de modificação molecular que tem como objetivo melhorar as características de fármacos protótipos. Sabendo disto, Chung (1996) sintetizou uma série de pró-fármacos recíprocos seletivos de nitrofurural e primaquina, culminando na obtenção do derivado hidroximetilnitrofurural (NFOH). Este se mostrou mais ativo de todos os derivados sintetizados, tanto em formas amastigotas quanto em tripomastigotas nos ensaios *in vitro* contra *T. cruzi*. Os compostos que possuem grupos nitro na sua molécula geralmente apresentam atividade mutagênica, estudos indicaram que a latenciação do nitrofurural em NFOH foi capaz de diminuir a atividade mutagênica em aproximadamente 4 vezes. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi iniciar os estudos de toxicidade do derivado. Os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda, com camundongos e ratos, sugerem baixa toxicidade do derivado, obtendo-se uma dose letal mediana maior em relação ao fármaco de partida. Os testes de toxicidade a médio prazo em camundongos também foram favoráveis, não apresentando alterações significativas nos parâmetros avaliados.*

## ABSTRACT

*The Chagas' disease represents one of the most serious sanitary medical problems of Latin America. In the 21 endemic countries, it is estimated that 18 to 20 million people are infected and 100 million are under risk. Only one drug is available in Brazilian market: benznidazole, which shows high side effects and is ineffective in the chronic phase of the disease. The development of more efficient drugs with lower toxicity against the Chagas' disease is necessary and for it, it is important the knowledge of therapeutic targets for the design of new compounds. Studies showed that trypanothione reductase (TR) is a key enzyme of the antioxidant metabolism of T. cruzi. Nitrofurans act as substrates of TR and are also effective enzymatic inhibitors of the reduction of trypanothione disulfide. Among the nitrofurans compounds, nitrofurazone presented activity against T. cruzi, but showed high toxicity by oral route and severe side effects. Latentiation is one process of molecular modification, which has the purpose to improve pharmaceutical and physical-chemical properties and decrease drug toxicity. In this way, Chung (1996) has synthesized the prodrug hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), showing high activity in amastigotes forms in vitro assay against T. cruzi. Nitrocompounds generally presents mutagenic activitys. Studies suggested that the latentiation of nitrofurazone giving NFOH was able to reduce toxicity activity in four times. According to this, the purpose of this work was to accomplish toxicity studies of the derivative compound. The results obtained in the tests acute toxicity in mice and rate suggested a lower toxicity of NFOH, obtaining a median lethal dose in relation to NF. The tests of short-term toxicity in mice were also favorable, not presenting significant changing in the parameter evaluated.*



## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| I. INTRODUÇÃO   | 1  |
| II. OBJETIVO  | 2  |
| III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA  | 3  |
| 1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS                                   | 3  |
| 1.1 Ciclo e formas evolutivas do <i>Trypanossoma cruzi</i>                      | 5  |
| 1.2 Transmissão e controle da doença de Chagas                                  | 7  |
| 1.3 Manifestações Clínicas e Patologia da doença de Chagas                      | 9  |
| 2. TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS   | 11 |
| 3. COMPOSTOS NITROFURÂNICOS   | 14 |
| 4. DESENVOLVIMENTO E INTRODUÇÃO NOVOS FÁRMACOS                                  | 21 |
| IV. MATERIAIS E MÉTODOS   | 29 |
| 1. OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO NFOH   | 29 |
| 1.1 Reagentes e Solventes   | 29 |
| 1.2 Equipamentos  | 29 |
| 1.3 Método de obtenção do pró-fármaco   | 29 |
| 1.4 Métodos Analíticos de identificação dos compostos                           | 30 |
| 1.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)                                     | 30 |
| 1.4.2 Determinação da Faixa de Fusão  | 30 |
| 1.4.3 Espectrometria no Infravermelho (IV)                                      | 31 |
| 1.4.4 Espectrometria de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C                | 31 |
| 1.5 Determinação da solubilidade de NF e NFOH                                   | 31 |
| 2. TESTES TOXICOLÓGICOS   | 32 |
| 2.1. Execução do ensaio   | 32 |
| 2.1.1 Animais   | 32 |
| 2.1.2 Preparo das Soluções  | 33 |
| 2.2 - Determinação da toxicidade aguda em camundongos<br>e ratos (Dose simples) | 34 |
| 2.2.1 – Toxicidade aguda em camundongos   | 34 |
| 2.2.2 – Toxicidade aguda em ratos   | 36 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.3 - Determinação da toxicidade aguda/doses<br>repetidas em camundongos (28 dias) | 38        |
| 2.4 - Determinação da toxicidade subcrônica em<br>camundongos, via oral (60 dias)  | 39        |
| 2.5 - Análises bioquímicas   | 39        |
| 2.6 - Análises hematológicas   | 40        |
| 2.7 - Análise estatística  | 40        |
| <b>V - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>41</b> |
| 1. OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO NFOH  | 41        |
| 2. TESTES TOXICOLÓGICOS  | 51        |
| 2.1 - Determinação da toxicidade aguda em camundongos<br>e ratos (Dose simples)    | 51        |
| 2.1.1 - Toxicidade aguda em camundongos  | 52        |
| 2.1.2 - Toxicidade aguda em ratos  | 57        |
| 2.2 - Determinação da toxicidade aguda/doses<br>repetidas em camundongos (28 dias) | 63        |
| 2.3 - Determinação da toxicidade subcrônica<br>em camundongos (60 dias)            | 74        |
| <b>VI - CONCLUSÕES</b>   | <b>80</b> |
| <b>VII - PERSPECTIVAS</b>  | <b>81</b> |
| <b>VIII - REFERÊNCIAS</b>  | <b>82</b> |

## I. INTRODUÇÃO

A revolução da saúde dos últimos 30 anos produziu substanciais ganhos em termos de expectativa de vida e avanços sem precedentes na medicina, mas deixou, de diferentes modos, a maior parte da população mundial à margem. Todo ano, milhões de pessoas continuam a morrer de doenças que podem ser prevenidas e tratadas (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2001).

Quando não há opções de tratamento, ou quando as opções existentes são inadequadas e não há interesse da indústria no desenvolvimento de novos fármacos, uma doença pode ser considerada "negligenciada" ou até "extremamente negligenciada" em alguns casos. As doenças tropicais constituem um bom exemplo de doenças negligenciadas. Do total de 1.393 novos fármacos aprovadas entre 1975 e 1999, apenas 1% (13 fármacos) eram especificamente indicados para doenças tropicais (TROUILLER *et al.*, 2001).

A doença de Chagas é considerada uma Doença Extremamente Negligenciada considerando que afeta exclusivamente as populações dos países em desenvolvimento. Como a maioria desses pacientes é pobre demais para pagar qualquer tratamento, eles não representam praticamente nenhum mercado e a maioria fica excluída do escopo dos esforços de Pesquisa e Desenvolvimento da Indústria de Medicamentos e, portanto, fora do mercado farmacêutico (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2001).

A introdução de um novo fármaco não depende somente da comprovação de atividade biológica do mesmo, mas também da avaliação da sua segurança. Os testes pré-clínicos e clínicos avaliam os riscos envolvidos no uso de um novo fármaco. Eles também fornecem informações vitais com relação à Absorção, a Distribuição, o Metabolismo e a Eliminação do fármaco (ADME). Os testes pré-clínicos compreendem essencialmente a toxicidade e ou outros testes biológicos realizados em bactérias, em amostras de tecidos e em animais, para determinar se será seguro testar o fármaco em humanos (THOMAS, 2003).

Fica claro que a indústria multinacional não tem interesse em desenvolver medicamentos necessários para tratamento das doenças que afligem os pobres

do mundo, entre elas a Doença de Chagas. A responsabilidade de suprir essa deficiência do setor privado fica a cargo dos governos, custeando o desenvolvimento de novos fármacos desde a escolha entre os possíveis compostos até os testes pré-clínicos e clínicos, através da pesquisa nas Universidades.

## **II. OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como objetivo realizar os ensaios de toxicidade pré-clínicos do pró-fármaco NFOH, com os objetivos específicos de preparar, caracterizar e determinar a toxicidade do derivado, comparando com o fármaco matriz, através:

- ❖ Dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) - ensaio de toxicidade aguda (dose única) em ratos e camundongos.
- ❖ Ensaio de toxicidade aguda (doses repetidas por 28 dias) em camundongos.
- ❖ Ensaio de toxicidade subcrônica (doses repetidas por 60 dias) em camundongos.
- ❖ Análise bioquímica – alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e albumina.
- ❖ Análise hematológica – estudo das séries vermelha (eritograma) e séries branca (leucograma).

### III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS.

A doença de Chagas é uma das patologias de mais larga distribuição no continente americano. É conhecida a existência de vetores da doença desde o sul dos Estados Unidos à Argentina. São mais de cem espécies responsáveis pela transmissão natural da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que sejam de 18 a 20 milhões os indivíduos infectados e de aproximadamente cem milhões a população em risco de contaminação na América Latina (**Figura 1**) (SCHMUNIS, 1999; WHO, 2006).



**Figura 1.** Distribuição geográfica da doença de Chagas.

Fonte: <http://www.fit-for-travel.de/en/Krankheiten/chagas.htm#top>  
acesso - 2006

A doença é um exemplo típico de uma injúria resultante das alterações produzidas pelo ser humano ao meio ambiente, das distorções econômicas e das injunções sociais. O protozoário responsável pela parasitose, *Trypanosoma cruzi*, vivia restrito à situação silvestre, circulando entre mamíferos do ambiente natural, através do inseto vetor ou, também, muito comumente, por via oral (ingestão de vetores e mamíferos infectados). O homem se fez incluir no ciclo epidemiológico da doença, oferecendo ao vetor hemíptero vivendas rurais de péssima qualidade (DIAS e COURA, 1997).

A etapa mais importante de transmissão do *T. cruzi* é efetuada por insetos da família *Reduviidae*, incluindo as espécies *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*. No Brasil, o transmissor mais importante é o *T. infestans* (**Figura 2**), conhecido vulgarmente como barbeiro. (DIAS, 1990; DIAS e JANETE, 1992; FORATINI, 1980).



**Figura 2** - *Triatoma infestans*: inseto transmissor da doença de Chagas.

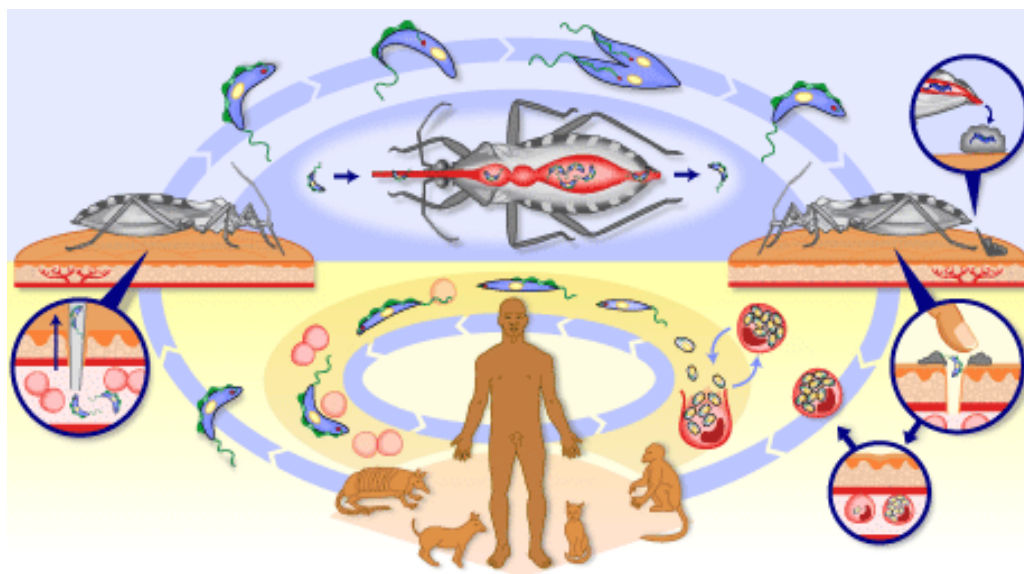
Fonte: [www.uta.edu/chagas/images/vinchULH.jpg](http://www.uta.edu/chagas/images/vinchULH.jpg)

Os triatomíneos, hematófagos estritos, encontraram nas habitações uma condição ideal de abrigo e oferta alimentar abundante, tornando a transmissão vetorial no mecanismo primário de difusão da doença. Estabelecida à transmissão vetorial da doença, outros mecanismos foram a ele conseqüentes e são, nesse sentido, secundários ou alternativos, principalmente a transmissão transfusional e a transmissão transplacentária (congênita) (VINHAES e DIAS, 2000).

A partir dos anos 70, com o aumento migratório das populações rurais para as cidades, o parasita acompanhou o homem, modificando o perfil epidemiológico da tripanossomíase americana, ocorrendo urbanização da doença (CAMARGO, 1992).

### 1.1. Ciclo e formas evolutivas do *Trypanossoma cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* compreende três estágios ou formas principais, dotadas de características morfológicas e biológicas distintas, como mostrado na **figura 3**. São elas as seguintes formas evolutivas: *epimastigota* (encontrada no tubo digestivo do vetor), *tripomastigota* (encontrada no vetor e no sangue e espaço intercelular do hospedeiro vertebrado) e *amastigota* (encontrada no interior de células do hospedeiro vertebrado) definidas com base na forma geral da célula (esférica, piriforme, alongada), na posição relativa entre o núcleo e o cinetoplasto (anterior, lateral e posterior) e na maneira da saída do flagelo da bolsa flagelar (central ou lateral) (SOUZA, 1999).



**Figura 3** – Ciclo evolutivo do *Trypanossoma cruzi*.

Fonte: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>

O ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado inicia-se quando o sangue de animais infectados é ingerido durante o respasto sanguíneo. Ao chegar ao estômago, a forma *tripomastigota* transforma-se gradualmente em formas arredondadas, algumas com um longo flagelo colado ao corpo e outras com um curto flagelo, chamadas de *esferomastigotas* e *epimastigotas*

respectivamente. Em seguida, os parasitas migram para o intestino, onde se multiplicam como formas *epimastigotas*, o que pode ser observado cerca de 25 horas após o repasto sanguíneo. Posteriormente migram para a parte mais posterior, atingindo o reto, e transformam-se em *tripomastigotas* metacíclicos, que são eliminados junto com as fezes e urina do triatomíneo (SOUZA, 1999).

A infecção pelo *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando os parasitas eliminados pelo inseto na forma *tripomastigota* metacíclico, são inoculados na pele ou mucosas do vertebrado. A maneira mais comum é a vetorial, através da picada do barbeiro, que, durante o processo de ingestão do sangue, deposita suas fezes próximas ao local da picada (SOUZA, 1999).

O parasita tem acesso facilitado ao interior do organismo pelo toque das mãos, já que a picada causa irritação local. Se a picada for próxima dos olhos ou da boca o parasita pode penetrar diretamente pelas mucosas. Uma vez dentro do organismo, os *tripomastigotas* entram em variedade de células, dentro das quais se transforma em *amastigotas*. Nesse estágio, os parasitas reproduzem-se por fissão binária. (BRENER e CANÇADO, 1979; DIAS, 1990; SOUZA, 1999).

O hospedeiro apresenta hipersensibilidade no local de entrada como resultado de intensa destruição celular local. Nesse ponto, alguns *amastigotas*, com a morte celular transformam-se em *tripomastigotas*, que são liberados nos vasos periféricos e estarão aptos para infectar novas células em outros pontos do organismo, como músculo e tecido nervoso, de forma que a transformação de *amastigotas* para *tripomastigotas* possa ocorrer em outros pontos do organismo e o ciclo de infecção continua (BRENER e CANÇADO, 1979; DIAS, 1990; SOUZA, 1999).

Com a picada do hospedeiro vertebrado por um novo barbeiro, as formas *tripomastigotas* sanguíneas, ingeridas com o sangue do hospedeiro vertebrado, diferenciam-se em formas fusiformes denominadas *epimastigotas*. Essas formas



desenvolvem-se basicamente nos 2/3 distais do tubo digestivo do inseto. Na porção terminal, diferenciam-se novamente em *tripomastigotas*. Estes, também denominados metacíclicos, são as formas mais infectantes do *T. cruzi*, prontas a contaminar novo hospedeiro vertebrado por meio da excretas do barbeiro, bem como a se estabelecer em reservatórios naturais (BRENER e CANÇADO, 1979; DIAS, 1990).

## 1.2. Transmissão e controle da doença de Chagas

De modo geral, a maioria dos casos agudos registrados no Brasil dependeu de transmissão pelo triatomíneo vetor, basicamente correspondendo a quadros clínicos sintomáticos de indivíduos de baixa idade. Como elemento comum, o âmbito da ocorrência é o rural, envolvendo populações pobres e casas de má qualidade (DIAS e COURA, 1997).

Via de regra, nos casos de transmissão vetorial, o período de maior incidência de doença de Chagas vai de setembro a março para o Brasil e a Argentina, época mais quente e de maior umidade, fatores estes que favorecem maior atividade biológica dos triatomíneos domiciliados. (LARANJA *et al.*, 1956; DIAS, 1990; STORINO *et al.*, 1994; DIAS & COURA, 1997).

A transmissão transfusional da doença foi drasticamente reduzida no Brasil desde o final dos anos 80, do século passado, mercê de rigorosa e sustentada política nacional de sangue e hemo-derivados, que obriga a seleção pré-transfusional de doadores em todo o país. Por sua vez, a transmissão congênita tem sido de reduzida incidência no Brasil (estimada em menos de 1,0% de risco de ocorrência entre gestantes chagásicas), redução esta cada vez mais acentuada a partir do controle vetorial que tem feito diminuir as taxas de prevalência da infecção entre as novas gerações de mulheres férteis (DIAS e COURA, 1997).

Outras formas de transmissão da doença de Chagas humana são a via oral, por acidente de laboratório e por transplantes de órgãos a partir de doadores chagásicos (STORINO *et. al.*, 1994; DIAS e COURA, 1997).

A contaminação de alimentos por vetores silvestres e reservatórios vertebrados de *trypanossoma cruzi* é um importante fator para a transmissão digestiva da doença de chagas. A transmissão oral no Brasil está especialmente associada com contaminação através de suco de frutas e verduras (CAMANDAROBA *et. al.*, 2002).

Em 1968, 17 membros de uma comunidade agrícola de Teotônia (RS), contaminaram-se através de verduras consumidas no refeitório da comunidade, essas adoeceram no mesmo dia com o quadro clínico de miocardite aguda (6 vieram a falecer – com uma virulência inexplicável). Provavelmente, marsupiais (reservatórios do protozoário) contaminaram as hortas com secreções provenientes de suas "glândulas anais" (RACHEL, 2005).

Em 1986, em Catolé do Rocha (PB) pessoas adoeceram 7 a 22 dias após terem participado das festividades em uma fazenda, tendo todos bebido o caldo de cana moído no local; um deles faleceu de insuficiência cardíaca congestiva. Neste caso, ficou comprovado que a máquina de moer cana estava infestada de barbeiros (RACHEL, 2005).

No surto noticiado em 30 de março do ano de 2005 pelo Serviço de Epidemiologia da Secretaria Estadual de Saúde, confirmado pelo Instituto Evandro Chagas, de Belém (PA), 26 moradores da região de Igarapé da Fortaleza adoeceram da moléstia de Chagas aguda, após a ingestão de suco de açaí contaminado. Outro relato recente de transmissão oral de *T. cruzi* ocorreu em março de 2005, em Santa Catarina, através de caldo de cana contaminado com *T. cruzi*, ocasionando a morte de 6 pessoas e internação de dezenas, com

o diagnóstico confirmado de doença de Chagas aguda (MARQUES, 2005; RACHEL, 2005)

Embora a transmissão vetorial da doença de Chagas pelo vetor domiciliar (*Triatoma infestans*) esteja controlada com sucesso no Brasil, outras formas de contaminação como a transmissão por via oral pode representar um perigo para o controle da doença no País.

### 1.3. Manifestações clínicas e patologia da doença de Chagas

Três fases distintas podem ser observadas ao longo da doença de Chagas: a fase aguda, indeterminada e crônica.

Via de regra, a doença de Chagas se apresenta oligossintomática, sabendo-se que, em área endêmica, a imensa maioria dos casos agudos passam despercebidos. A clínica do paciente agudo tem caráter pleomórfico, sendo mais aparentes, severos e floridos os casos de menor idade, especialmente abaixo dos dois anos. Praticamente em todos os casos descritos na literatura, aparentes ou inaparentes foram detectados quadros febris prolongados (até três ou quatro semanas) (RASSI *et al.*, 2000; AMATO *et al.*, 1997).

Nos casos de transmissão vetorial podem aparecer os chamativos sinais de porta de entrada, ou chagomas de inoculação, sendo o mais indicativo deles o “complexo oftalmo\ganglionar”, conhecido como “sinal de Romaña” (**Figura 4**). Embora altamente chamativo e presente na maioria dos casos descritos, o “sinal de Romaña” não aparece em mais do que 10% dos casos agudos ocorridos (LARANJA *et al.*, 1956; AMATO *et al.*, 1997).

Outros “chagomas de inoculação” podem aparecer nos membros, tronco e face, geralmente correspondendo a uma lesão furunculóide levemente elevada, não supurativa, de diâmetro variado (alguns centímetros), hiperêmica e/ou hipercrômica, que se mostra descamativa após duas ou três semanas. (LARANJA *et al.*, 1956; AMATO *et al.*, 1997)



**Figura 4** – Paciente com sinal de Romaña (chagoma de inoculação)

Fonte: [www.cib.uaem.mx/agebiol/pr03.htm](http://www.cib.uaem.mx/agebiol/pr03.htm)

Após a fase aguda da doença, que dura entre 1 e 12 meses, o paciente pode evoluir para uma fase indeterminada ou para a fase crônica. O prognóstico para pacientes na fase indeterminada é mais favorável do que para pacientes que entram diretamente na fase crônica, uma vez que estes não apresentam nenhum dos sintomas característicos da doença, podendo inclusive nunca vir a manifestá-los (WENDEL *et. al.*, 1992).

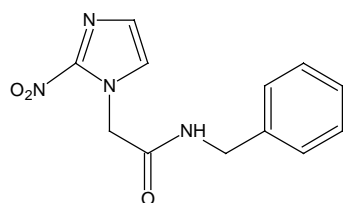
Aproximadamente um terço dos casos agudos evolui para a fase crônica, de baixa parasitemia, afebril, duradoura pelo resto da vida do paciente, representada por diversas formas clínicas, que afetam um ou mais órgãos de maneira irreversível, sendo as alterações cardíacas as principais observadas. A cardiopatia crônica e o freqüente aparecimento dos “megas” principalmente megaesôfago e megacólon, representam formas clínicas muito importantes e de considerável gravidade (SZAJNAM, 2000).

Na forma cardíaca os sintomas mais característicos são a arritmia, a insuficiência cardíaca e o trombo-embolismo. Nas manifestações digestivas, ocorre comprometimento das funções do órgão afetado. Na forma digestiva do megaesôfago, observam-se alterações na motilidade e diâmetro do esôfago. Outros sintomas também de megaesôfago são: dores epigástricas, regurgitação e hipertrofia das glândulas salivares. No megacólon a principal característica é

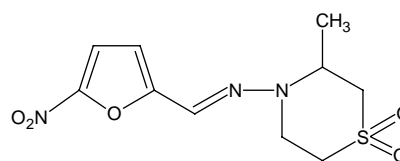
obstipação do órgão, que pode durar por semanas. Entretanto, o movimento do colón pode ser normal em alguns casos da doença (WENDEL *et al.*, 1992).

## 2. TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

O tratamento da doença de Chagas continua sendo um desafio. Atualmente, apenas dois fármacos nitroheterocíclicos são usados, o benznidazol e nifurtimox (**Figura 5**), sendo que no Brasil só está disponível o benznidazol (CROFT, 1999).



benznidazol



nifurtimox

### Figura 5 - Tripanomicidas em uso.

São poucos os estudos controlados sobre a terapêutica específica da doença de Chagas crônica, particularmente em áreas de campo, onde o acompanhamento dos pacientes torna-se mais difícil, por falta de condições laboratoriais e de profissionais capacitados para fazê-lo adequadamente. Alguns estudos sobre a tolerância e eficácia do nifurtimox e do benznidazol em pacientes nas fases aguda e crônica da doença de Chagas no Brasil e em outros países do nosso continente foram feitos, mostrando importantes efeitos colaterais com os dois fármacos e indícios de cura parasitológica em torno de 60% dos casos agudos, porém pouco expressivos nos casos crônicos (COURA *et al.*, 1997).

Estudos longitudinais em áreas endêmicas têm demonstrado que anualmente 2% dos pacientes na fase indeterminada evoluem para alguma forma clínica e 0,3% para megaesôfago, sugerindo dúvidas se o tratamento da fase indeterminada é capaz de interferir na evolução da doença (CASTRO *et. al.*, 1994)

Silveira e col. (2000) verificou em um estudo que 33,3 % dos pacientes avaliados que foram tratados com nifurtimox e benznidazol, sendo esses crianças, evoluíram para alguma forma clínica da doença, verificando que o tratamento não impediu a progressão da doença de Chagas.

Um estudo mais recente de Cançado (2002), avaliou 21 pacientes agudos e 113 crônicos, tratados apenas com benznidazol e acompanhados por longo tempo, verificando a cura em 76% dos pacientes agudos e de apenas 8% dos crônicos.

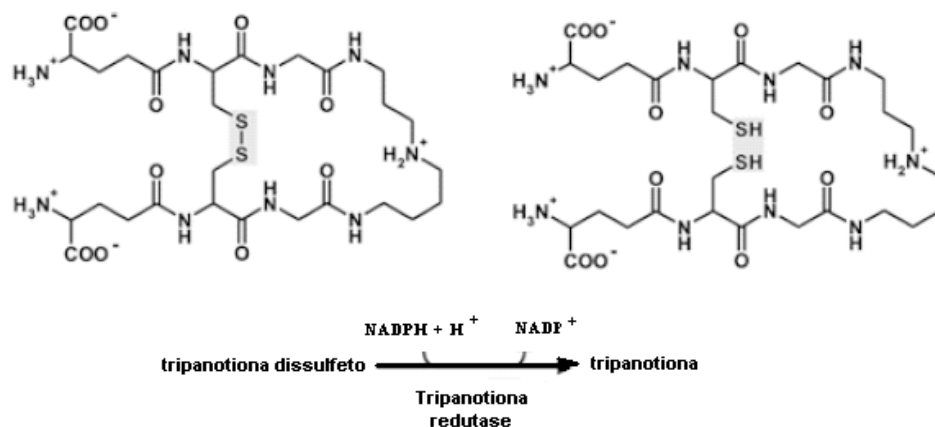
Um estudo longitudinal publicado por Streiger e col. (2004) avaliou clinicoepidemiologicamente 95 crianças chagásicas crônicas em idades entre 1 e 14 anos moradoras de Santa Fé, Argentina. Os resultados sorológicos indicam que das 49 crianças tratadas com nifurtimox ou benznidazol 29 (59,2%) mostraram a negatificação da sorologia, 14 (28,6%) permaneceram positivas (com 2 ou mais reações com titulação de 1/32 ou superior), e 6 (12,2%) apresentaram títulos sorológicos discordantes.

Para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos, eficazes e com menor toxicidade é cada vez mais importante a seleção do alvo terapêutico, o que permite uma busca racional por agentes que provoquem a resposta desejada específica para o controle da doença. O maior foco para descoberta de novos fármacos antichagásicos durante as duas últimas décadas tem sido a identificação e caracterização bioquímica e molecular dos alvos (CROFT, 1999).

Vários processos bioquímicos têm sido apontados como alvos terapêuticos potenciais, entre eles: a enzima *tripanotiona redutase* (TR). A TR é uma flavoenzima responsável pela proteção contra radicais livres de tripanossomas, a enzima ocorre exclusivamente em tripanomatídeos com falta de glutatona redutase (GR, enzima anti-oxidante equivalente em humanos) (AGUIRRE *et al.*, 2004).

Muitos autores indicaram a TR como um dos mais promissores alvos para o desenvolvimento de novos fármacos tripanomicidas. Os nitrofuranos atuam como substratos da TR e são também efetivos inibidores enzimáticos da redução do tripanotiona dissulfeto (substrato fisiológico da enzima) (AGUIRRE *et al.*, 2004).

O tripanotiona ditiol [bis(glutationa)spermidina – T(SH)<sub>2</sub>] é doador de equivalentes redutores para a síntese de precursores de DNA, a homeostasia do ascorbato, a destoxificação de peróxidos de hidrogênio, e o sequestro de conjugados de tiol. A redução do substrato tripanotiona dissulfeto, representada na **figura 6**, é crucial para a manutenção do ambiente intracelular do *T. Cruzi* (KRAUTH-SIEGEL e INHOFT, 2003).

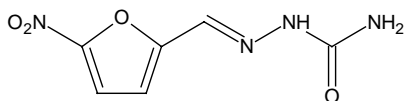


**Figura 6** – Redução de tripanotiona dissulfeto para ditiol tripanotiona pela enzima tripanotiona redutase (KRAUTH-SIEGEL e INHOFT, 2003)

### 3. COMPOSTOS NITROFURÂNICOS

Entre os primeiros compostos testados para o tratamento da Doença de Chagas, a partir da sua descoberta em 1909, podemos citar o arsênico, fucsina, antimônio tartarato de potássio e o cloreto de mercúrio, empregados experimentalmente sem resultados efetivos. Até a publicação do “Manual de Doenças Tropicais e Infecciosas” por Carlos Chagas e Evandro Chagas (1935) não havia nenhum tratamento específico para tripanossomíase americana (COURA e CASTRO, 2002).

Há relatos do uso dos nitrofuranos na terapia anteriormente à Packchanian, mas em 1952 foi ele quem abriu uma nova e promissora linha de pesquisa com os nitrofuranos como fármacos potenciais para Doença de Chagas, que levou ao nitrofural (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) em especial (**figura 7**) (COURA e CASTRO, 2002).



**Figura 7** – Estrutura do nitrofural (nitrofurazona).

Brener (1961) realizou testes *in vivo*, ratos infectados com *T. cruzi* foram tratados com nitrofural por via oral durante 53 dias na dose de 100 mg/kg, observando a cura de 95.4% dos animais.

Ferreira (1961, 1962) e Ferreira e col. (1963) trataram os primeiros dez casos de Chagas agudos com nitrofural, obtendo resultados clínicos bons, com poucos efeitos colaterais, mas os xenodiagnósticos ficaram positivos em 50% dos casos ao término do tratamento. Coura e col. (1961, 1962) trataram 14 casos crônicos com o composto por um longo prazo, observando nos primeiros quatro pacientes que receberam doses progressivas de 10 a 30 g/kg

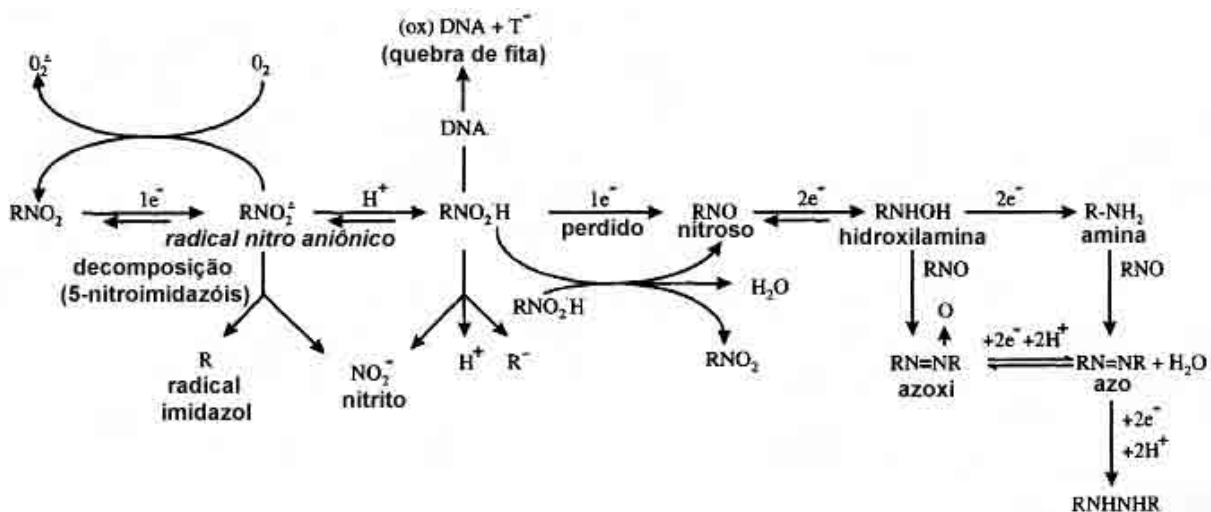


diariamente efeitos colaterais importantes que conduziram a suspensão do tratamento devido a polineuropatia severa que iniciou-se à terceira semana de administração do nitrofuril. Com redução da dose para 10 mg/kg diariamente e associação com complexo B, via parenteral, cinco pacientes toleraram o tratamento durante 60 dias, apesar dos efeitos colaterais (anorexia, perda de peso, parestesia, e polineuropatia).

No mesmo estudo outro paciente foi tratado com 20 mg/kg dia e apresentou manifestações de parestesia ao 53º dia de tratamento, evoluindo a polineuropatia severa. Dos pacientes submetidos ao tratamento à longo prazo, 33,3 % foram considerados curados, baseado em xenodiagnóstico e sorologia (fixação de complemento) negativo.

Cançado e col. (1964) também submeteram ao tratamento cinco pacientes crônicos com 10mg/kg dia durante 10 a 34 dias, quando o tratamento teve que ser suspenso devido a polineurotite que acometeu todos os pacientes tratados.

Os nitrofuranos apresentam na sua molécula um grupo nitro, alguns trabalhos afirmam que a redução desse grupo é pré-requisito para a atividade biológica destes compostos (EDWARDS, 1993; KEDDERIS e MIWA, 1988). A completa redução envolve a adição de 6 elétrons para formar a amina via o intermediário nitroso ( $2e^-$ ) e hidroxilamínico ( $4e^-$ ), entretanto alguns fármacos não procedem além da formação da hidroxilamina (TOCHER, 1997), conforme observado na **figura 8**.



**Figura 8** – Ativação por redução de compostos Nitroaromáticos (TOCHER, 1997).

O alvo destes compostos é o DNA, a redução dos mesmos causa quebra e desestabilização da helix (EDWARDS, 1993). O grau do dano é relacionado com a composição da fita, e é aumentado com a presença de Adenina + Timina no DNA (TOCHER, 1997).

A identificação do agente causador do dano não está bem elucidada, já que os produtos finais da redução desses compostos são inativos, mas a redução dos mesmos na presença do DNA resulta em dano, sugerindo que esse é causado pelos pequenos intermediários formados pela adição de ao menos 4 elétrons (TOCHER, 1997).

Vários nitrocompostos incluindo a nitrofurazona, e outros como a furazolidolina, nitrofurantoína e o metronidazol tem sido utilizados com fármacos antimicrobianos de uso veterinário (HIRAKU *et al.*, 2004).

O fato de estes compostos terem sido utilizados largamente em animais para consumo humano, nos últimos anos, levou diferentes comitês internacionalmente reconhecidos, como o IARC (International Agency for Research on Cancer), a JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food

Additives) e o SCAN (Scientific Committee on Animal Nutrition) a realizar avaliações à cerca dos riscos oferecidos pelos compostos nitrofurânicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

O nitrofural foi avaliado pelo JEFCA (Joint Expert Committee on Food Additives) e existem poucos dados em relação à sua farmacocinética, mas sabe-se que é bem absorvido em ratos e bovinos.

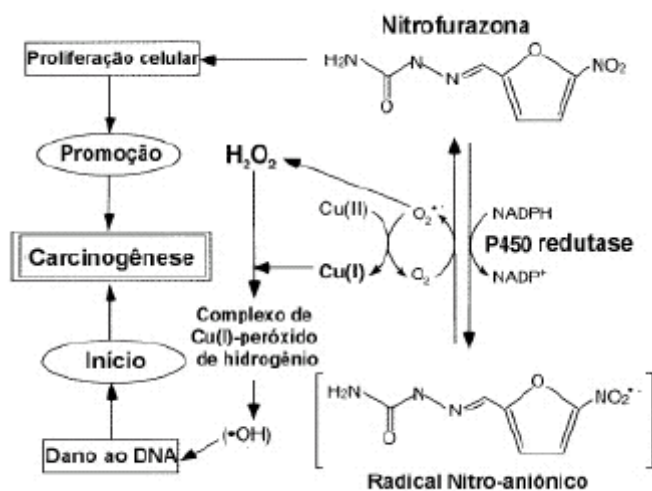
O nitrofural revelou induzir tumores (fibroadenomas mamários, tumores ovarianos) em ensaios de carcinogenicidade realizados em ratos e camundongos. A maioria dos ensaios de mutagenicidade realizados *in vitro* deram resultados positivos, mas os ensaios de mutagenicidade realizados *in vivo* são, na sua maioria, negativos (WHO, 1993).

Ensaio realizados sugerem que o nitrofural não é teratogênico, mas provoca efeitos embriofetotóxicos em doses maternotóxicas em coelhos e camundongos. Deste modo a Comissão considerou, com base nos resultados dos ensaios em animais e nos estudos de genotoxicidade que se trata de um cancerígeno secundário, ou seja, não genotóxico, exercendo os seus efeitos em órgãos de resposta endócrina, através de um mecanismo não esclarecido (WHO, 1993).

Uma variedade de nitrocompostos são enzimaticamente reduzidos nos sistemas biológicos. Como já foi citado o nitrofural, como outros nitro compostos, causam dano ao DNA através da sua redução. Entretanto a geração de metabólitos deste nitrofurano pode estar relacionada ao processo de carcinogênese, através do dano ao DNA (HIRAKU, 2004).

Adicionalmente, a atividade estrogênica do nitrofural pode contribuir para a carcinogênese, sabendo que o estrogênio causa câncer em órgãos reprodutivos de fêmeas, tais como mamas e útero (HIRAKU, 2004).

É relatado que os metabólitos do estrogênio induzem ao dano oxidativo do DNA, considerando que o estrogênio causa proliferação celular por si próprio. O nitrofural possui dois mecanismos distintos que contribuem para carcinogênese: o dano ao DNA causado pelos metabólitos gerados e aumento da proliferação celular (HIRAKU, 2004), esses mecanismos estão ilustrados na **figura 9**.



**Figura 9** - Mecanismo proposto de dano ao DNA e indução de carcinogênese pelo nitrofural (HIRAKU, 2004).

Alguns estudos em relação aos efeitos do nitrofural em enzimas e outros parâmetros bioquímicos foram realizados. Um estudo em galinhas demonstrou que o fármaco em doses de 10 e 20 mg/Kg/dia (via oral) administradas por 7 dias induz a deficiência de tiamina (ALI, 1983). Como outros nitrofuranos, o nitrofural pode afetar o sistema endócrino. Estudos com perus demonstram que o nitrofural diminui os níveis do hormônio luteinizante e prolactina no plasma (ALI *et al.*, 1988).

Alguns estudos de toxicidade aguda com o nitrofural foram realizados e os valores da DL<sub>50</sub> são apresentados na **tabela 1**. Os sinais de toxicidade observados incluem a piloereção, hipersensibilidade, tremores, redução da

atividade, fraqueza, convulsão e colapso respiratório (KRANTS e EVANS 1945; ANDERSON, 1983).

**Tabela 1** – Toxicidade aguda do nitrofural.

| Espécie/Linhagem    | Sexo | Via  | DL50(mg/Kg) | Referência                 |
|---------------------|------|------|-------------|----------------------------|
| Rato *              | M    | Oral | 590         | Krantz e Evans, 1945       |
| Rato (Donryu)       | M&F  | Oral | 590         | Miyali, 1971               |
| Rato (Wistar)       | M    | Oral | 800         | Anderson, 1983             |
| Camundongo *        | *    | Oral | 380         | Krantz e Evans, 1945       |
| Camundongo(ICR JcL) | M&F  | Oral | 590         | Miyali, 1971               |
| Camundongo *        | *    | i.p. | 300         | Smith <i>et al.</i> , 1963 |

\* não relatado.

Num estudo de toxicidade à curto prazo com camundongos B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 5 machos e 5 fêmeas foram tratados com dietas contendo 94.5, 188, 375, 750 e 1500 mg/kg/dia durante 14 dias. Houve 100% de mortalidade nos camundongos que receberam os três níveis mais altos de dose, a maioria dos animais perderam peso e em todas os grupos tratados os animais apresentaram piloereção e ataques convulsivos (NTP, 1988).

Outro estudo com 10 camundongos B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> machos e 10 fêmeas tratados com dietas contendo 10, 23, 47, 93 e 188 mg/kg/dia durante 13 semanas foi realizado, observando-se alta mortalidade na dose de 188mg/Kg (6/10 machos

e 9/10 fêmeas). Nas doses de 93 e 188mg/Kg foi observado um aumento relativo no fígado dos animais, hiperexcitabilidade e ataques convulsivos e os machos destes grupos tiveram uma incidência muito alta (80-90%) de hipoplasia testicular (NTP, 1988).

Um estudo realizado em grupos de 10 ratos F344/N machos e fêmeas, tratados com dietas 63, 125, 250, 500 e 1000 mg/kg/dia por 14 dias, demonstrou 100% de mortalidade nos grupos que receberam 500 e 1000 mg/kg. Sinais de toxicidade incluíram letargia e piloereção. Ataques apoplético aconteceram em animais que receberam doses a partir de 250mg/kg. Outros estudos realizados em ratos demonstraram perda de peso, aumento relativo do peso do fígado e moderada degeneração do tubo seminífero (NTP, 1988).

#### 4. DESENVOLVIMENTO E INTRODUÇÃO NOVOS FÁRMACOS

Ainda hoje, fármacos (alguns muito potentes) com propriedades físico-químicas, organolépticas, farmacocinéticas, farmacológicas e toxicológicas indesejáveis, que se caracterizam como barreiras para sua aplicação clínica estão fora do mercado farmacêutico (HAN e AMIDON, 2000).

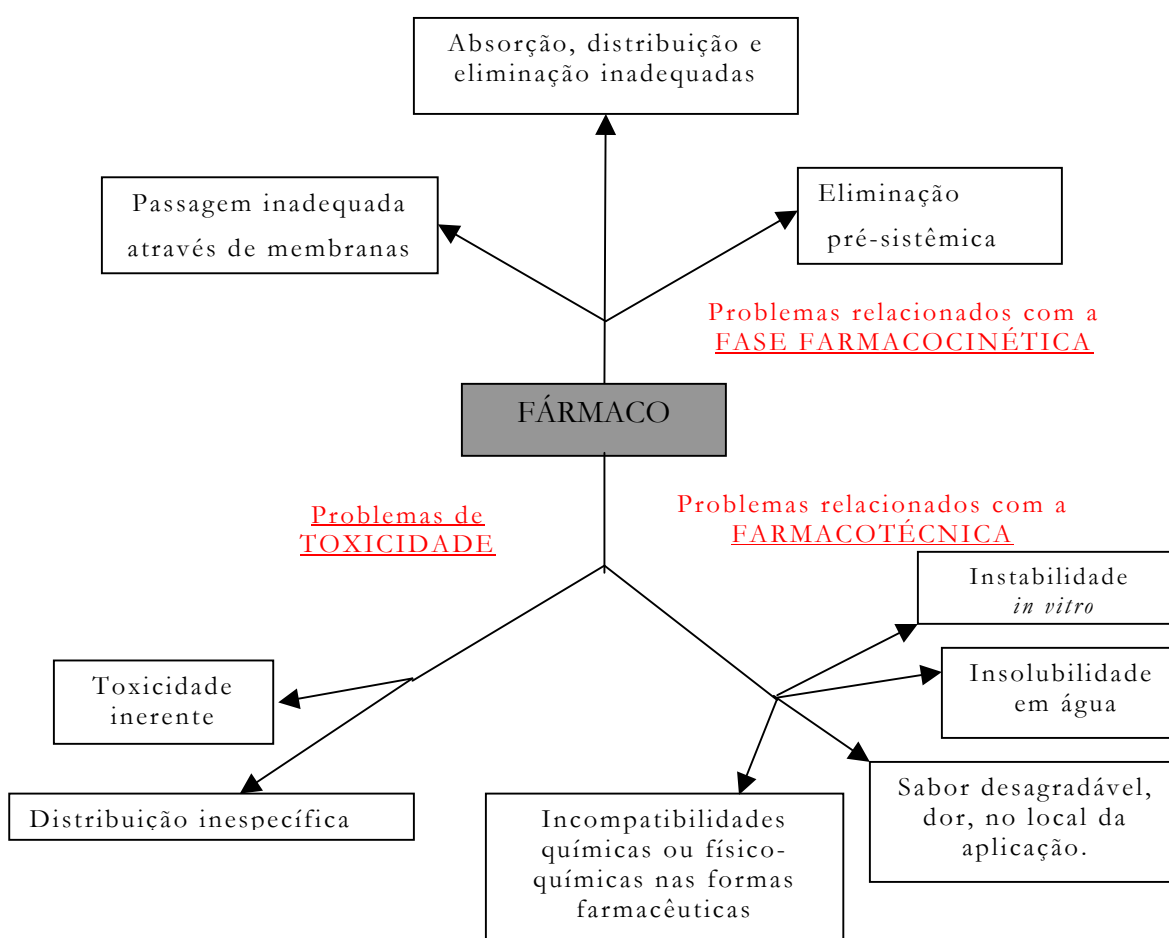
No que se refere à introdução de novos fármacos, os processos de modificação molecular (BUNDGAARD, 1985; KOROLKOVAS, 1988; WOLF, 1995; FRIIS e BUNDGAARD, 1996) são os mais promissores e vem obtendo bons resultados na descoberta de novos fármacos. Estes métodos consistem em se partir de uma substância química com atividade biológica reconhecida, denominada de protótipo, e sintetizar e testar seus congêneres, homólogos e análogos estruturais. Desta forma, por meio de modificações moleculares, buscam-se princípios ativos mais potentes, com menos efeitos colaterais, com maior especificidade ou com melhores propriedades farmacocinéticas e organolépticas (WERMUTH, 1996; KOROLKOVAS, 2002).

Entre os processos de modificação molecular merece destaque a latenciação. A latenciação de fármacos foi proposta, em 1959, por Harper, e consiste, basicamente, na transformação do fármaco em forma de transporte inativo, que, *in vivo*, mediante reação química ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação ou próximo. Uma das formas latentes obtidas mediante este processo denomina-se pró-fármaco (BUNDGAARD, 1991; CHUNG *et al.*, 2005).

O objetivo no desenvolvimento de pró-fármacos consiste, de uma maneira geral, em melhorar diversas propriedades indesejáveis do fármaco protótipo sem alterar, no entanto, a atividade biológica do mesmo. A latenciação é um método capaz de introduzir na terapêutica compostos que apresentam inúmeros problemas tanto farmacotécnicos quanto farmacocinéticos. Várias substâncias ativas “blockbusters”, isto é, campeões

em vendas no mercado mundial, são pró-fármacos, demonstrando a importância desta estratégia no planejamento de fármacos (CHUNG *et al.*, 2005).

Diversas barreiras podem prejudicar a atividade de um fármaco e conseqüentemente, os pró-fármacos podem ser desenvolvidos para superar problemas relacionados com as fases farmacêuticas, farmacocinética e até mesmo farmacodinâmica do fármaco protótipo (**figura 10**) (TESTA, 1995). No caso da fase farmacodinâmica o problema mais freqüente é a toxicidade.



**Figura 10** – Alguns dos problemas que limitam a utilização de um fármaco. Fonte: MENÉNDEZ e AVENDAÑO, 1993.

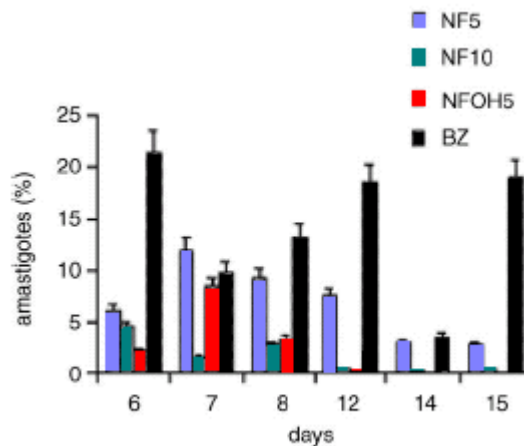


Nesta linha, o Lapdesf (Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos-UNESP) vem realizando pesquisas conjuntamente com Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos em Endemias Tropicais, da FCF-USP-SP, no sentido de desenvolver fármacos potencialmente ativos em doenças tropicais, utilizando principalmente a estratégia de modificação molecular, LATENCIAÇÃO.

Chung (1996) sintetizou uma série de pró-fármacos recíprocos seletivos de nitrofural e primaquina, tendo como grupos espaçantes aminoácidos e dipeptídios. Todos os derivados sintetizados mostraram-se ativos em culturas de células infectadas com *T. cruzi*.

Como intermediário da síntese de base de Mannich entre o nitrofural e o dipeptídeo de primaquina obteve-se o derivado hidroximetilado do nitrofural, o qual foi testado e se mostrou o mais ativo de todos os derivados sintetizados tanto em forma *amastigotas* quanto em *tripomastigotas* no ensaio *in vitro* com células infectadas com *T. cruzi*.

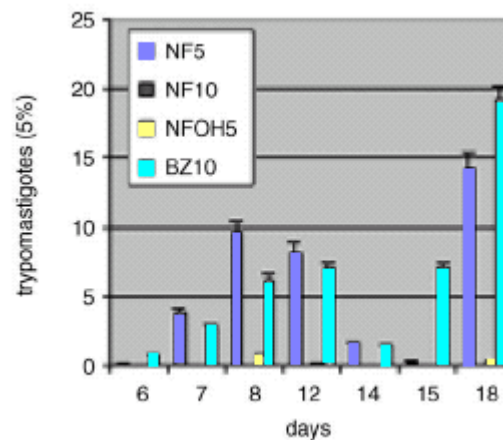
Chung e col. (2003) demonstraram que a atividade do NFOH é maior tanto nas formas *tripomastigota* e *amastigota*, comparando com o benznidazol. A **figura 11** demonstra a atividade em formas *amastigotas*, o benznidazol apresentou atividade ligeiramente menor (81,1%) que o observado com o nitrofural e o seu derivado: 97.2, 99.6, e 100% para 5, 10  $\mu\text{M}$  NF e 5  $\mu\text{M}$  NFOH, respectivamente. O ensaio com as formas *tripomastigotas* está ilustrado na **figura 12**, no qual o derivado NFOH na concentração de 5  $\mu\text{M}$  apresentou atividade similar ao NF no dobro da concentração (10  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 11** - Efeito de 5  $\mu$ M NF, 10  $\mu$ M NF, 5  $\mu$ M NFOH e 10  $\mu$ M Bz (benznidazol) em porcentagem de *amastigotas* em 6, 7, 8, 12, 14 e 15 dias depois da infecção das células com formas *amastigotas* de *T. cruzi*.

Controle: 100% *tripomastigotas*

Fonte: CHUNG *et al.*, 2003



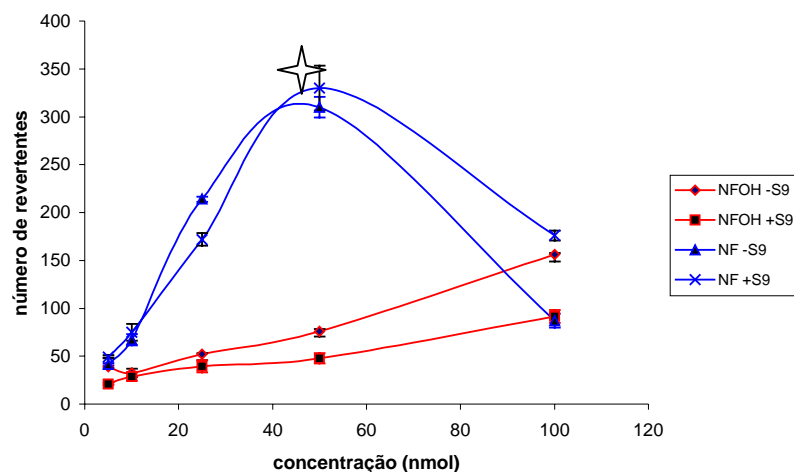
**Figura 12** - Efeito de 5  $\mu$ M NF, 10  $\mu$ M NF, 5  $\mu$ M NFOH e 10  $\mu$ M Bz (benznidazol) em porcentagem de *tripomastigotas* em 6, 7, 8, 12, 14 e 15 dias depois da infecção das células com formas *tripomastigotas* de *T. cruzi*.

Controle: 100% *tripomastigotas*.

Fonte: CHUNG *et al.*, 2003

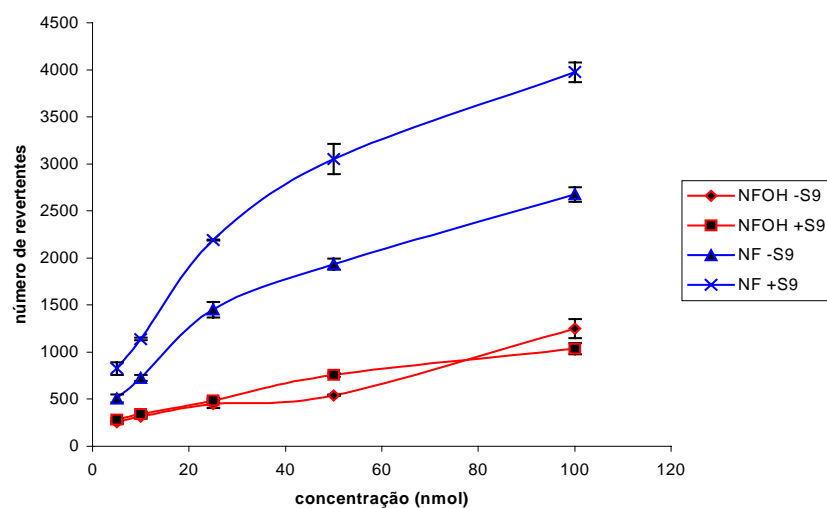
Sabendo-se que os compostos nitrofurânicos são potenciais agentes mutagênicos devido ao grupo nitro presente na molécula, como o nifurtimox, derivado nitrofurânico com atividade antichagásica, GUIDO e colaboradores (2000) avaliou a mutagenicidade do NFOH, comparando-o com a molécula matriz, nitrofural, empregando ensaios de indução de mutações gênicas reversas (Teste de Ames) nas linhagens TA102 e TA98 de *Salmonella typhimurium* na ausência e presença da fração S9 de fígado de rato.

As **figuras 13** e **14** apresentam os resultados deste estudo, os quais mostram que para as mesmas concentrações utilizadas, o número de revertentes do pró-fármaco esteve sempre abaixo, quando comparado ao número de revertentes obtidos nos ensaios com o composto matriz NF, em ambas as linhagens utilizadas. Os resultados indicaram que a latenciação do nitrofural em NFOH foi capaz de diminuir a atividade mutagênica em aproximadamente 4 vezes, nos ensaios com e sem ativação metabólica, em ambas as linhagens testadas.



*morte celular.*

**Figura 13** – Atividade mutagênica (*S. Typhimurium* cepa TA98) do hidroximetilnitrofural em comparação ao nitrofural em ensaios com e sem ativação metabólica (S9) (GUIDO *et al.*, 2000).



**Figura 14** – Atividade mutagênica (*S. Typhimurium* TA102) do hidroximetilnitrofural em comparação ao nitrofural em ensaios com e sem ativação metabólica (S9) (GUIDO *et al.*, 2000).

Sabendo-se da atividade do nitrofural frente ao *T. cruzi* descrita há tempos, e dos resultados favoráveis de atividade biológica e de baixa atividade mutagênica do derivado NFOH, fica clara a necessidade da continuidade dos estudos com o derivado, entre eles, principalmente, os testes de toxicidade.

A grande quantidade de novos produtos gerados pelos centros de pesquisa de Universidades e empresas enfrenta um sério obstáculo para o uso em humanos: a necessidade de testes rigorosos de efeitos tóxicos *in vivo*. A pesquisa por um novo fármaco ativo na doença de Chagas é intensa, novos alvos terapêuticos são descobertos e novas moléculas específicas são sintetizadas a todo o momento, mas o estudo é interrompido nesta fase por falta de recursos das Universidades e das empresas privadas.

Normalmente, os ensaios de toxicidade requeridos para novos produtos referem-se àqueles de médio e longo prazos, sendo eles, toxicidade aguda (dose simples e repetidas), toxicidade subcrônica e crônica, efeitos sobre a reprodução, toxicidade genética e toxicocinética (BRITO, 2004).

A toxicidade aguda é o efeito adverso que se produz dentro de um curto período de tempo e que resulta da administração de uma dose única ou de varias doses de uma substância em um período de 24 horas. Esse estudo, em dose simples é uma avaliação e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância. Serve de base ainda para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas sobre toxicidade subcrônica, crônica e com doses repetidas, além de permitir o cálculo da dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) (BRITO, 1994).

O teste da dose letal média foi desenvolvido em 1927 (ZBIDEN e FLUY-HOVERSI, 1981) para a padronização biológica de substâncias tóxicas. Desde então foi incorporado ao protocolo de rotina toxicológica de outros compostos químicos clássicos, sendo atualmente usado nos modelos governamentais, os quais regulam os testes toxicológicos de substâncias químicas.

O teste de toxicidade aguda com doses repetidas é uma avaliação preliminar das propriedades tóxicas de uma substância, fornecendo informações acerca dos riscos para a saúde, resultantes de uma exposição de doses repetidas, pela via selecionada, mas de curta duração (14 a 28 dias). Esse estudo serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas de toxicidade subcrônica e outros estudos (BRITO, 1994).

Depois de realizado o teste de doses repetidas, com os dados obtidos parte-se para um teste mais longo, de 30 a 60 dias, o teste de toxicidade subcrônica. Esse teste fornece informações adicionais sobre órgão-alvo e sobre efeitos cumulativos, também servindo de base para testes mais longos e outros testes (BRITO, 1994).

## **IV. MATERIAS E MÉTODOS**

### **1. OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO NFOH**

#### **1.1. Reagentes e Solventes**

- ✓ nitrofural (Henrifarma)
- ✓ formaldeído P.A (Synth)
- ✓ carbonato de potássio P.A (Mallinckrodt)
- ✓ metanol P.A (Synth)
- ✓ dimetilsufóxido P.A.(Vetec)
- ✓ água destilada

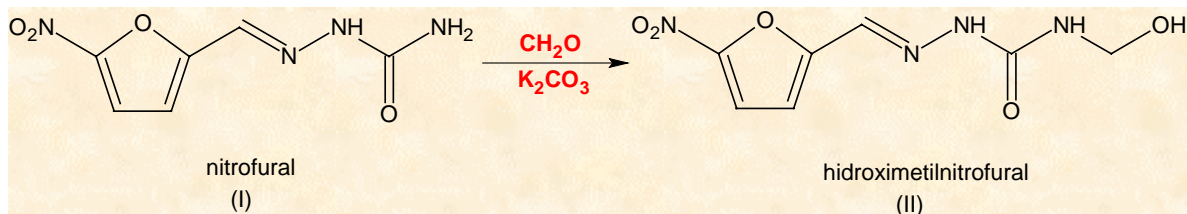
#### **1.2. Equipamentos**

- ✓ aparelho de ponto de fusão Stuart Scientific-SMP3.
- ✓ destilador de água por membrana de osmose, modelo Q-342 da Quimis.
- ✓ espectrofotômetro de IV Shimadzu FTIR-8300.
- ✓ espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (400MHz).
- ✓ Sonicador Ultrasonic Cleaner UNIQUE

#### **1.3. Método de obtenção do pró-fármaco**

Para a preparação do pró-fármaco proposto NFOH, reagiu-se o NF com o formaldeído em meio básico (CHUNG, 1996), como apresentado no esquema abaixo:

### Preparação de hidroximetilnitrofural (II)



Reagiu-se 1,08 g de NF (I) com 18 mL de CH<sub>2</sub>O em presença de 0,7 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 10 ml de H<sub>2</sub>O mantendo o sistema à temperatura ambiente, sob agitação durante 48 horas. Após completar a reação, a suspensão foi filtrada. O precipitado foi lavado várias vezes com água gelada.

#### 1.4. Métodos Analíticos de identificação dos compostos

##### 1.4.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram utilizadas placas de sílica gel G-60, com 0,25 mm de espessura, e placas Alugram Nano-Sil G/UV 254 da Merck para o acompanhamento das reações, com os seguintes sistemas de eluentes (v/v/v): CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH (95:5:3); (85:10:5); (70:20:10). As placas cromatográficas foram reveladas e observadas com iodo e/ou radiação UV.

##### 1.4.2. Determinação da Faixa de Fusão

A faixa de fusão experimental do produto obtido foi determinada em aparelho para determinação de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific, sem correção.



### 1.4.3. Espectrometria no Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro infravermelho FTIR-8300 da SHIMADZU Corporation, o qual utiliza o método de transformada de Fourier com a amostra dispersa em KBr e as medidas foram feitas em  $\text{cm}^{-1}$ .

### 1.4.4. Espectrometria de RMN $^1\text{H}$ e RMN $^{13}\text{C}$

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da nitrofural e do pró-fármaco hidroximetilnitrofural foram obtidos no espectrômetro Bruker, modelo DRX-400, 9.4 T (400 MHz), utilizando como solvente DMSO- $d_6$ , do laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

**1.5. Determinação da solubilidade de NF e NFOH** (de acordo com a 4<sup>a</sup> Farmacopéia Brasileira, 1988)

Para determinação da solubilidade pesou-se 1 parte das amostras equivalente a 50 mg e testou-se a solubilidade no número de partes dos diferentes solventes (1 parte de solvente equivalente a 50  $\mu\text{L}$ ). As solubilidades aproximadas foram designadas por termos descritivos, apresentados a seguir:

| <b><i>TERMO DESCRITIVO</i></b>      | <b><i>SOLVENTE</i></b> |
|-------------------------------------|------------------------|
| Muito solúvel                       | Menos de 1 parte       |
| Facilmente solúvel                  | De 1 a 10 partes       |
| Solúvel                             | De 10 a 30 partes      |
| Ligeiramente solúvel                | De 30 a 100 partes     |
| Pouco solúvel                       | De 100 a 1000 partes   |
| Muito pouco solúvel                 | De 1000 a 10000 partes |
| Praticamente insolúvel ou insolúvel | Mais de 10000 partes   |

## **2. TESTES TOXICOLÓGICOS**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, considera o protocolo para uso de animais neste projeto, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e de acordo com a Lei nº 11.977, de 25 de Agosto de 2005 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo concedendo PARECER FAVORÁVEL à sua execução, de acordo com Protocolo CEP/FCF/CAR nº 31/2004 em anexo.

### **Testes realizados**

- Toxicidade aguda (dose simples) em camundongos e ratos;
- Toxicidade aguda (doses repetidas), em camundongos;
- Toxicidade subcrônica, em camundongos;
- Análises Bioquímica e Hematológica do sangue.

### **2.1. Execução dos ensaios**

#### **2.1.1. Animais**

Foram utilizados camundongos machos Swiss, com peso médio em torno de 25 g e ratos machos Wistar com peso médio de 250 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista-Unesp. Os animais foram transferidos para o Biotério Experimental do Departamento de Fármacos e Medicamentos/Laboratório de Controle de Qualidade do Campus da Unesp de Araraquara onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ), umidade ( $55 \pm 5\%$ ) e luz (ciclo claro/escuro 12h) e com alimento e água à vontade.

Os animais foram aclimatados às condições de laboratório cinco dias antes dos experimentos e divididos aleatoriamente nos vários grupos de tratamento.

### 2.1.2. Preparo das soluções – Solventes utilizados

As soluções foram preparadas no momento dos ensaios, os solventes utilizados para cada teste estão apresentados abaixo:

| <i>Testes</i>            | <i>Animal</i> | <i>Via</i> | <i>Solvente</i>       |
|--------------------------|---------------|------------|-----------------------|
| Toxicidade aguda         | Camundongo    | v.o.       | DMSO                  |
|                          | Camundongo    | i.p.       | DMSO/H <sub>2</sub> O |
|                          | Rato          | v.o.       | DMSO                  |
|                          | Rato          | v.o.       | Goma arábica          |
| Toxicidade à médio prazo | Camundongo    | v.o.       | DMSO/H <sub>2</sub> O |

## **2.2. Determinação da toxicidade aguda em camundongos e ratos (Dose simples – 14 dias)**

### **2.2.1. Toxicidade aguda em camundongos**

Foram realizados testes utilizando a via oral (v.o.) e a intraperitoneal (i.p.) com os dois compostos (NF e NFOH), exceto com NF por via oral. O teste não pode ser realizado por problemas de solubilidade com o fármaco matriz. Pela via intraperitoneal as doses testadas foram menores e foi possível a realização do teste com o fármaco NF. Nos testes por via oral as soluções foram administradas com auxílio de uma sonda metálica e por via intraperitoneal através de uma agulha 25x7.

A concentração de DMSO foi obtida através de experimentos prévios resultando em 0% de mortalidade para o solvente. Para o ensaio em camundongos v.o. foi administrado o volume de 0,1 mL de NFOH solubilizados em DMSO/10g peso. Para os ensaios em camundongos i.p. foi administrado o volume de 0,1 mL de NF ou NFOH solubilizados em DMSO:H<sub>2</sub>O (50:50), v/v)10g de peso.

No dia do ensaio farmacológico por via oral retirou-se a ração pela manhã, de forma que no momento da administração da amostra os animais estavam com seis horas de jejum. Após a administração os animais foram privados de alimentos e água por um período de três horas. Os animais foram observados durante 14 dias, registrando-se as observações obtidas neste período.

Os grupos experimentais (10 animais por grupo) para determinação da DL<sub>50</sub> em camundongos e seus respectivos tratamentos estão representados a seguir:

*Ensaio 1* – Determinação da toxicidade aguda por via oral do NFOH.

- \_ *Grupo I*: DMSO 0,1mL/10g;
- \_ *Grupo II*: NFOH 1000 mg/Kg;
- \_ *Grupo III*: NFOH 1500 mg/Kg;
- \_ *Grupo IV*: NFOH 2000 mg/Kg;
- \_ *Grupo V*: NFOH 2500 mg/Kg;
- \_ *Grupo VI*: NFOH 3000 mg/Kg;

*Ensaio 2* - Determinação da toxicidade aguda por via intraperitoneal do NF.

- \_ *Grupo I*: DMSO/H<sub>2</sub>O 0,1 mL/10g;
- \_ *Grupo II*: NF 98 mg/Kg;
- \_ *Grupo III*: NF 200 mg/Kg;
- \_ *Grupo IV*: NF 250 mg/Kg;
- \_ *Grupo V*: NF 300 mg/Kg;
- \_ *Grupo VI*: NF 400 mg/Kg;

*Ensaio 3* - Determinação da toxicidade aguda por via intraperitoneal do NFOH.

- \_ *Grupo I*: DMSO/H<sub>2</sub>O 0,1mL/10g;
- \_ *Grupo II*: NFOH 150 mg/Kg;
- \_ *Grupo III*: NFOH 250 mg/Kg;
- \_ *Grupo IV*: NFOH 300 mg/Kg;
- \_ *Grupo V*: NFOH 400 mg/Kg;
- \_ *Grupo VI*: NFOH 600 mg/Kg;

### 2.2.2. Toxicidade aguda em ratos

Foram realizados testes utilizando a via oral (v.o.), nos quais as soluções foram administradas com auxílio de uma sonda metálica.

Como já citado os testes foram realizados com dois solventes. No ensaio com DMSO foi administrado o volume de 1 mL de NF e NFOH solubilizado no solvente/10g peso solução. No ensaio com goma foi administrado o volume de 1 mL de NF e NFOH suspenso em H<sub>2</sub>O/Goma Arábica (100:6,66)v/p)/10 g de peso.

Na noite anterior ao dia do ensaio farmacológico retirou-se a ração pela manhã, de forma que no momento da administração da amostra os animais estavam com doze horas de jejum. Após a administração os animais foram privados de alimentos e água por um período de três horas. Os animais foram observados durante 14 dias, registrando-se as observações obtidas neste período.

Os grupos experimentais (10 animais por grupo) para a determinação da  $DI_{50}$  em ratos e seus respectivos tratamentos estão representados a seguir:

*Ensaio 1* - Determinação da toxicidade aguda por via oral do NF em DMSO.

- \_ Grupo I: DMSO 1mL/100g;
- \_ Grupo II: NF 500 mg/Kg;
- \_ Grupo III: NF 1000 mg/Kg;
- \_ Grupo IV: NF 1500 mg/Kg;
- \_ Grupo V: NF 2000 mg/Kg;

*Ensaio 2* – Determinação da toxicidade aguda por via oral do NFOH em DMSO.

- \_ *Grupo I*: DMSO 1mL/100g;
- \_ *Grupo II*: NFOH 250 mg/Kg;
- \_ *Grupo III*: NFOH 500 mg/Kg;
- \_ *Grupo IV*: NFOH 1000 mg/Kg;
- \_ *Grupo V*: NFOH 1500 mg/Kg;
- \_ *Grupo VI*: NFOH 2000 mg/Kg;

*Ensaio 3* - Determinação da toxicidade aguda por via oral do NF em solução de goma arábica.

- \_ *Grupo I*: solução goma arábica 1 mL/100g
- \_ *Grupo II*: NF 250 mg/Kg;
- \_ *Grupo III*: NF 400 mg/Kg;
- \_ *Grupo IV*: NF 500 mg/Kg;
- \_ *Grupo V*: NF 1000 mg/Kg;
- \_ *Grupo VI*: NF 1500 mg/Kg;

*Ensaio 4* - Determinação da toxicidade aguda do NFOH por via oral em solução de goma arábica.

- \_ *Grupo I*: solução goma arábica 1 mL/100g
- \_ *Grupo II*: NFOH 500 mg/Kg;
- \_ *Grupo III*: NFOH 1000 mg/Kg;
- \_ *Grupo IV*: NFOH 1500 mg/Kg;
- \_ *Grupo V*: NFOH 2000 mg/Kg;

### **2.3. Determinação da toxicidade aguda/doses repetidas em camundongos (28 dias).**

Para os testes à médio prazo a metodologia utilizada foi BRITO, A. S., 1994. De acordo com a metodologia o teste permite a administração cinco dias/semana.

#### **Protocolo.**

Os animais foram expostos às doses cinco dias por semana durante 28 dias e os sinais de toxicidade e óbitos foram registrados diariamente.

O experimento foi realizado com 5 grupos de 20 animais/grupo.

- \_ Grupo I: H<sub>2</sub>O 0,1 mL/10g;
- \_ Grupo II: DMSO/H<sub>2</sub>O 0,1 mL/10g;
- \_ Grupo III: NFOH 100 mg/Kg;
- \_ Grupo IV: NFOH 200 mg/Kg;
- \_ Grupo V: NF 50 mg/Kg



## **2.4 Determinação da toxicidade subcrônica em camundongos, via oral (60 dias).**

### **Protocolo.**

Os animais foram expostos às doses da amostra cinco dias por semana durante 60 dias e os sinais de toxicidade e óbitos foram registrados diariamente. Neste experimento não foi possível fazer um grupo com NF para comparar com os resultados do derivado por falta de animais.

O experimento foi realizado com 4 grupos de 20 animais/grupo.

- \_ Grupo I: H<sub>2</sub>O 0,1 mL/10g;
- \_ Grupo II: DMSO/H<sub>2</sub>O 0,1mL/10g;
- \_ Grupo III NFOH 100 mg/Kg;
- \_ Grupo IV: NFOH 200 mg/Kg;

## **2.5. Análises bioquímicas.**

Uma vez terminado o tempo experimental proposto (28 e 60 dias), os animais foram submetidos à eutanásia através da guilhotina, com coleta do sangue por escoamento do tronco dos animais. O sangue foi coletado em tubos de ensaio de fundo cônico. O soro foi separado por meio de centrifugação do material à 2000 rpm por 10 minutos em centrífuga Excelsa II modelo 206 BL e enviado ao Núcleo de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp - Araraquara, para determinação da albumina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase. As provas bioquímicas foram realizadas em aparelho automatizado Technicon RAXT, através de Kits de ensaio (ALT e AST liq. est. Bayer 4x55 e albumina Bayer), conforme metodologia fornecida pelo fabricante, com a colaboração da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Vendramini.

## **2.6. Análises hematológicas**

A coleta de sangue para análise hematológica foi realizada em outros animais, já que a quantidade de amostra coletada não possibilitou a análise dos dois parâmetros (bioquímico e hematológico). Do mesmo modo ao término do tempo experimental os animais foram submetidos à eutanásia através da guilhotina, com coleta do sangue por escoamento do tronco dos animais. O sangue foi coletado em tubos de ensaio heparinizados e as análises constaram do estudo das séries vermelha (eritograma) e branca (leucograma). A contagem global de células foi efetuada pelo aparelho Coulter – modelo T 890. A contagem específica de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo em lâminas coradas por Leishman, avaliando-se um total de 100 células. As análises foram realizadas pelo laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp - Araraquara, com a colaboração do Profº Drº Luis Marcos Fonseca.

## **2.7. Análise Estatística**

Os dados foram tabulados no programa Excel e a análise estatística foi feita no próprio programa. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e quando necessário o teste de Tukey. O nível de significância foi definido como  $p < 0,05$ .

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

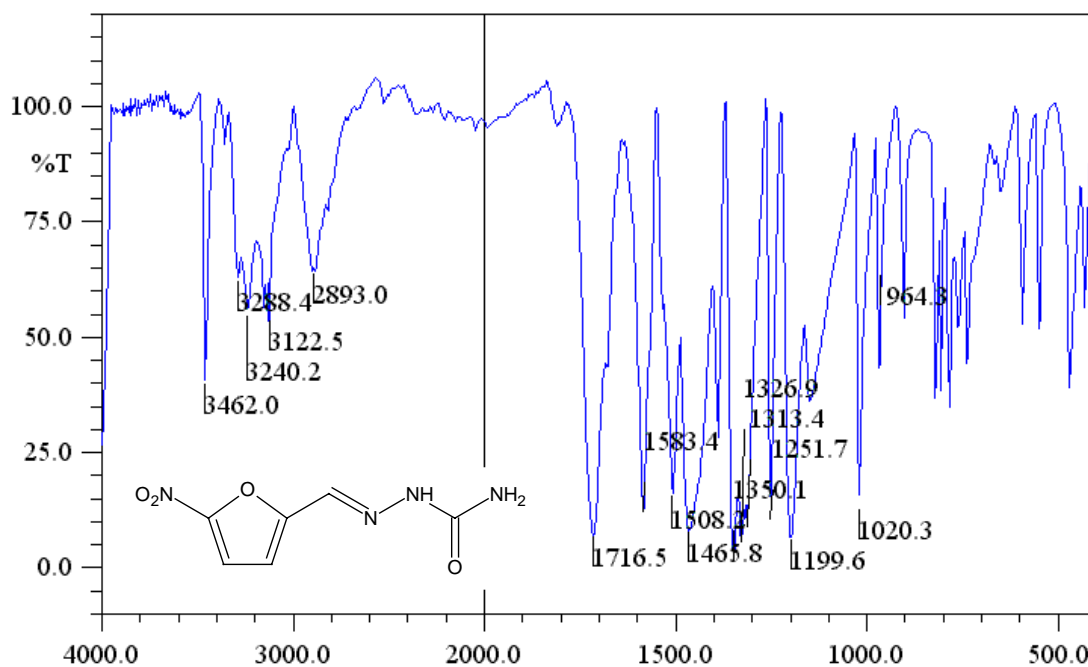
### 1. Obtenção e Identificação do hidroximetilnitrofural (NFOH).

Para a obtenção do NFOH partiu-se da matéria-prima NF, a qual foi caracterizada como um pó amarelo e com faixa de decomposição de 220-226°C, de acordo com os valores da literatura.

A identificação do NFOH foi realizada por comparação das análises da matéria-prima NF com aquelas do produto obtido (faixa de fusão, espectrofotometria de absorção no infravermelho e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ).

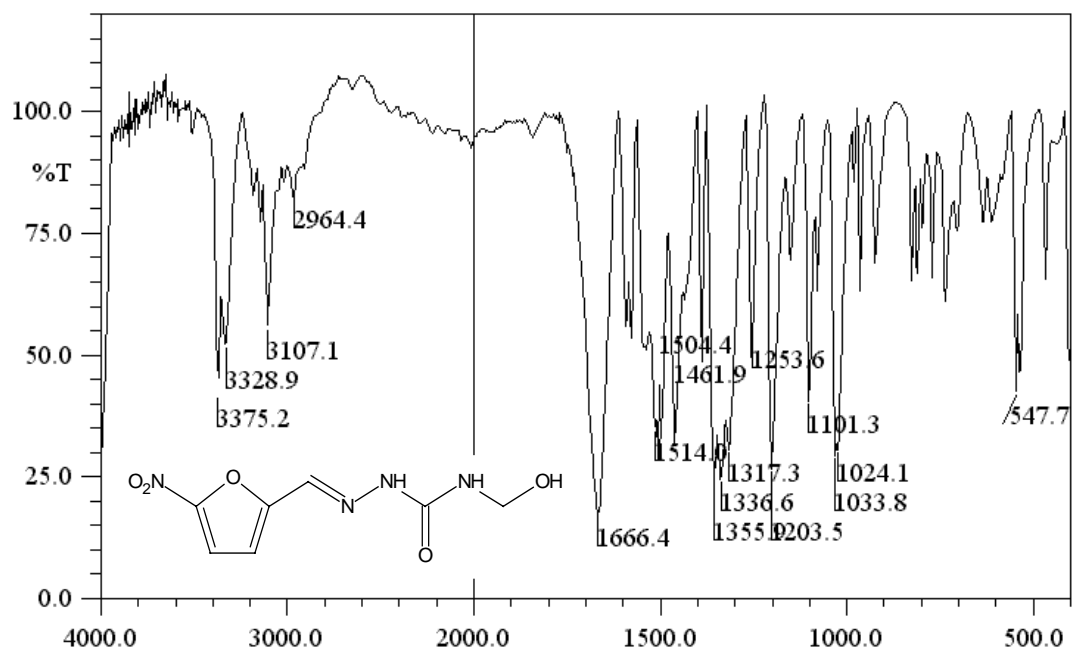
O produto obtido foi caracterizado apresentando-se como um sólido amarelo ouro e faixa de decomposição 172-180°.

Os **Espectros 1 e 2** mostram os resultados das análises do espectro de absorção no Infravermelho para NF e para NFOH.

**Espectro 1.** Espectro no infravermelho do nitrofural (KBr)

**Tabela 2** – Bandas de absorção do espectro de infravermelho do nitrofural

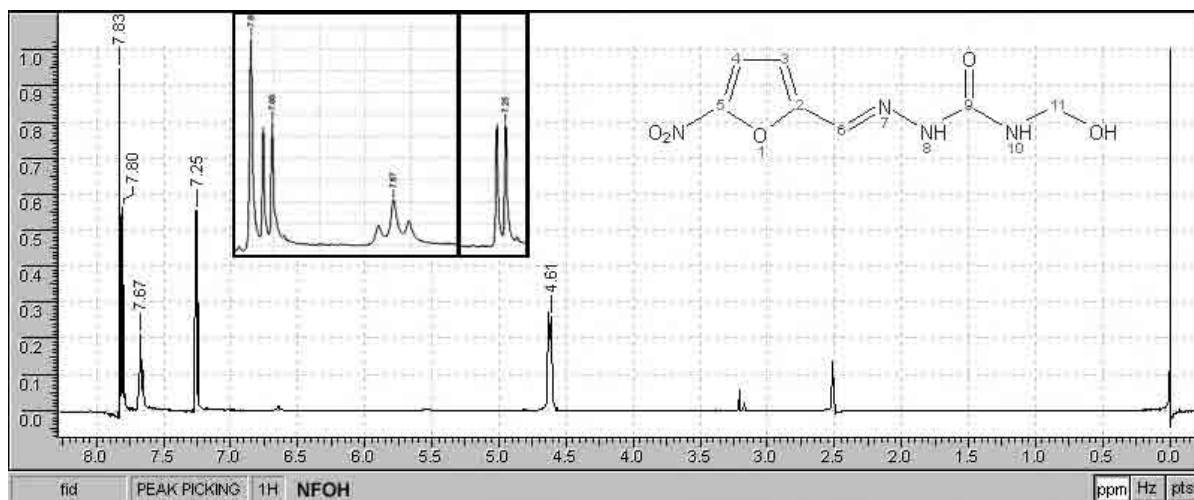
| Grupo funcional         | $\nu$ (cm <sup>1</sup> ) |
|-------------------------|--------------------------|
| NH <sub>2</sub>         | 3122 e 3240              |
| N-H (amida secundária)  | 3462                     |
| C=O e NH (sobreposição) | 1716,5                   |
| C-H                     | 2893-2964                |
| NO <sub>2</sub>         | 1508 e 1350              |
| C-N                     | 1465                     |
| C=C                     | 1583                     |

**Espectro 2.** Espectro no infravermelho do hidroximetilnitrofural (KBr)

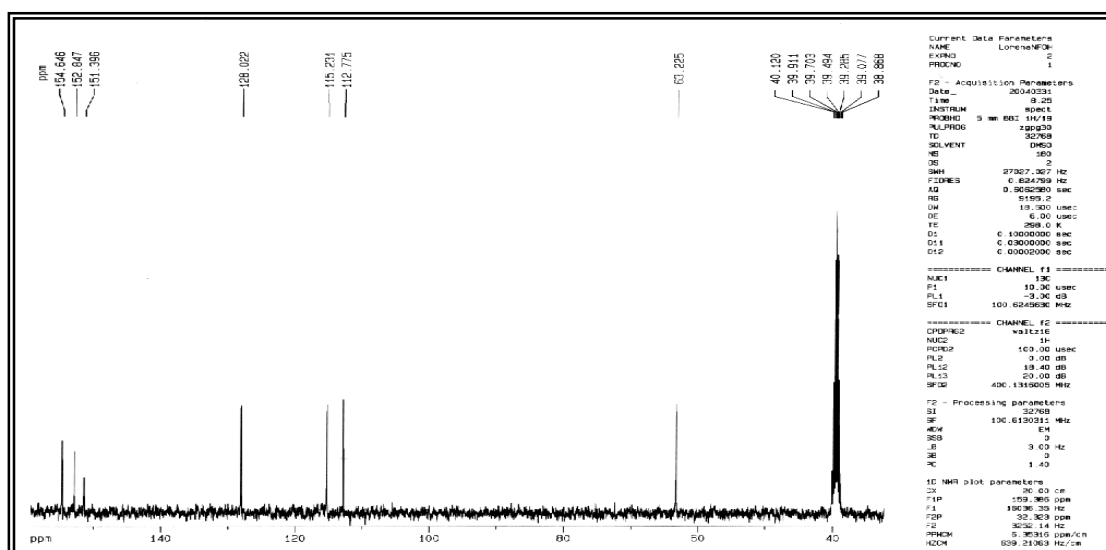
**Tabela 3** – Bandas de absorção do espectro de infravermelho do hidroximetinitrofural

| Grupo funcional         | $\nu$ (cm <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|---------------------------|
| N-H (amida secundária)  | 3375 e 3328               |
| C=O e NH (sobreposição) | 1666                      |
| C-H                     | 2964-3107                 |
| NO <sub>2</sub>         | 1514 e 1350               |
| C-N                     | 1461                      |

Estão apresentados a seguir os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Espectros 3** e **4**) e a **Tabela 4**, os quais mostram os resultados das análises para o produto obtido (hidroximetilnitrofural).

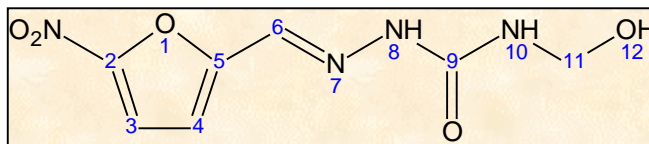


**Espectro 3** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO-d}_6$  hidroximetilnitrofural (400MHz)



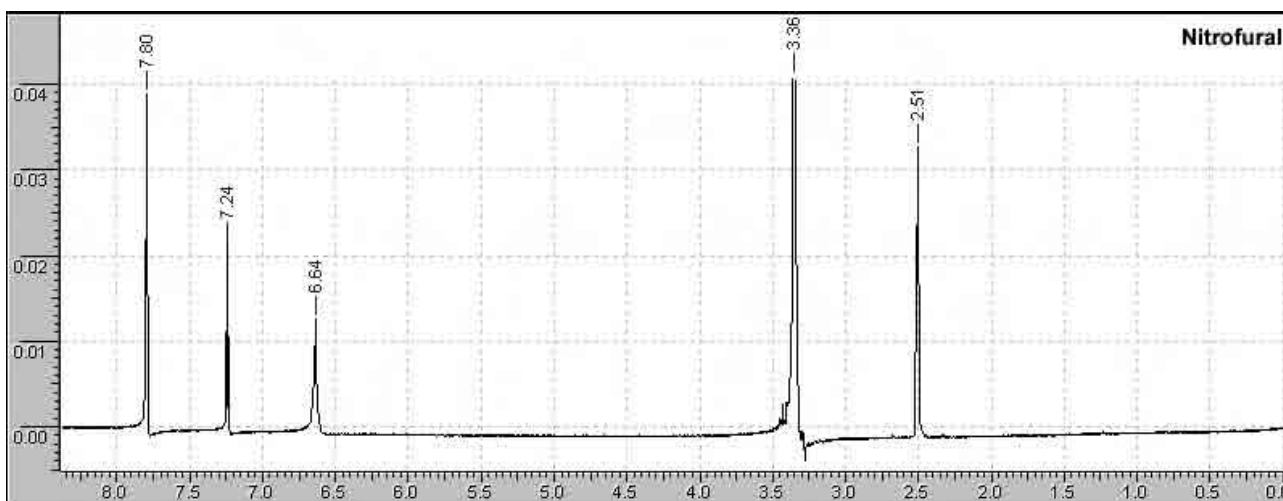
**Espectro 4** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO-d}_6$  hidroximetilnitrofural (100MHz).

**Tabela 4:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) do pro-fármaco hidroximetilnitrofural em DMSO  $d_6$ . Os deslocamentos químicos apresentados na tabela estão em (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

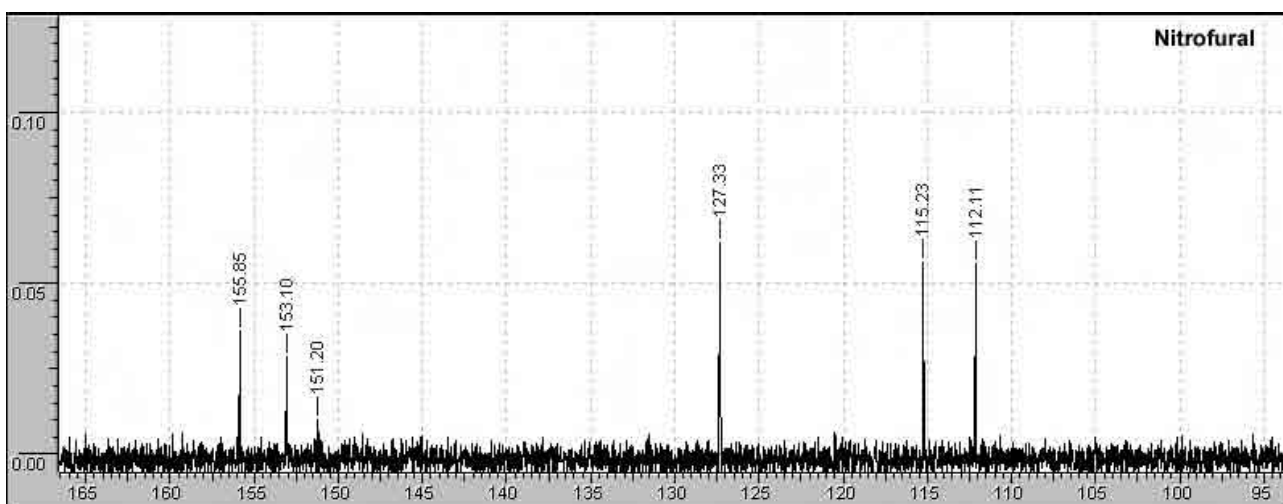


| C/H | $\delta_C$ | $\delta_H$             |
|-----|------------|------------------------|
| 1   | -          | -                      |
| 2   | 151,4      | -                      |
| 3   | 112,7      | 7,25(d; J=3,9 Hz; 1 H) |
| 4   | 115,2      | 7,80(d; J=3,9 Hz; 1 H) |
| 5   | 152,8      | -                      |
| 6   | 128,0      | 7,80(s; 1 H)           |
| 7   | -          | -                      |
| 8   | -          | -                      |
| 9   | 154,8      | -                      |
| 10  | -          | 7,67(t; J=6,7 Hz; 1 H) |
| 11  | 63,2       | 4,61(d; J=6,2 Hz; 2 H) |

Estão apresentados a seguir os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**espectro 5 e 6**) dos resultados das análises do composto matriz NF, permitindo a comparação aos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**espectro 3 e 4**) do derivado.



**Espectro 5** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  em DMSO- $d_6$  do fármaco nitrofurais (400MHz).

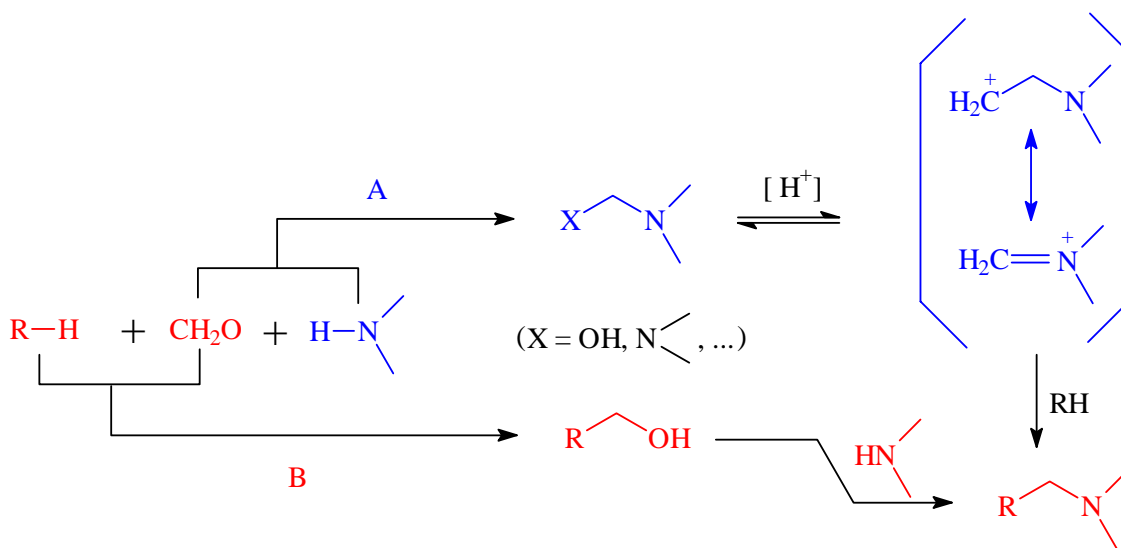


**Espectro 6** - Espectro de RMN-  $^{13}\text{C}$  em DMSO- $d_6$  do fármaco nitrofurais (400MHz)



Para a formação do derivado de NFOH (1), seguiram-se os procedimentos descritos por Chung M. C., 1996, cuja reação baseia-se na formação da Base de Mannich.

Conforme a representação da reação química, a reação de Mannich consiste na condensação entre o substrato RH contendo, no mínimo, um átomo de hidrogênio ativo, formaldeído (mais raramente com outros aldeídos) e aminas primárias ou secundárias (Tramontini & Angiolini, 1990). Preferencialmente ocorre, via rota “A”, segundo o esquema apresentado na **Figura 15**. Entretanto, dependendo da natureza dos reagentes e condições experimentais, esta reação pode ocorrer também pela rota “B”.



**Figura 15.** Esquemas de rotas de síntese para formação de bases de Mannich (Tramontini & Angiolini, 1990)

Dois fatores despertaram o grande interesse pela química das bases de Mannich (NARVAÉZ, 1983):

1º) são compostos muito reativos e, conseqüentemente, podem ser transformados facilmente em numerosos outros compostos, constituindo-se assim, em intermediários úteis na síntese de heterocíclicos, aminoácidos e outros derivados;

2º) por introduzir uma função básica, permitem tornar os derivados solúveis em solventes aquosos, quando transformados em sais de aminas.

Cerca de 35% dos trabalhos publicados sobre as bases de Mannich estão em revistas farmacêuticas (TRAMONTINI, ANGIOLINI, 1990) o que mostra a importância dessas bases nessa área e, em especial, na Química Farmacêutica.

Com amplo espectro de atividades biológicas, as bases de Mannich são aplicadas em Medicina (KUDRIN, VEROBEV, 1970) e muitos estudos são feitos para introdução de novos compostos na terapêutica.

O experimento foi realizado na tentativa de reproduzir o método descrito por CHUNG M. C, (1996), sendo que o produto sólido obtido apresentava mancha única, com  $R_f = 0,72$  após análise por CCD.

O espectro de Infravermelho do nitrofural (**Espectro 1**) apresenta bandas de deformação axial de amida primária resultante das deformações simétrica  $3122\text{ cm}^{-1}$  e assimétrica  $3240\text{ cm}^{-1}$  de NH. A deformação axial de C=O, e a deformação angular de N-H aparecem sobrepostas em  $1716\text{ cm}^{-1}$ . A deformação axial de C-N é observada em  $1465\text{ cm}^{-1}$  e a deformação angular fora do plano de N-H é visualizada entre  $600\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ .

Outra banda de deformação axial importante observada neste experimento foi a de N-H de amida secundária em  $3462\text{ cm}^{-1}$ .

Outros deslocamentos foram ainda observados referentes aos outros grupos funcionais existentes na molécula. Um dos grupos existentes no nitrofural é o grupo nitro. Observou-se deformações axiais assimétricas de  $\text{NO}_2$  em  $1583\text{ cm}^{-1}$  e simétricas em  $1350\text{ cm}^{-1}$ . Observaram-se ainda, deformações axiais simétricas e assimétricas de C-H na região  $2893\text{-}2964\text{ cm}^{-1}$ .

No espectro no IV do NFOH (**espectro 2**), não se observam as bandas de deformação axial simétrica e assimétrica de amida primária resultante de NH. A deformação axial de C=O e a deformação angular de N-H aparecem sobrepostas em  $1666\text{ cm}^{-1}$ . A deformação axial de C-N é observada em  $1461\text{ cm}^{-1}$  e a deformação angular fora do plano de N-H é visualizada ente  $600\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ . No espectro de infravermelho de amidas secundárias em amostras sólidas a banda de N-H livre é substituída por bandas múltiplas na região de  $3330\text{-}3060\text{ cm}^{-1}$  (Silverstein, 1999). O que se observa no espectro de IV do hidroximetilnitrofural são duas bandas justamente em  $3328\text{ cm}^{-1}$  e  $3375\text{ cm}^{-1}$ .

Outros deslocamentos foram ainda observados referentes aos outros grupos funcionais existentes na molécula. O grupo nitro existente nos dois compostos é observado com deformações axiais assimétricas em  $1514\text{ cm}^{-1}$  e simétricas em  $1350\text{ cm}^{-1}$ .

Observaram-se ainda, deformações axiais simétricas e assimétricas de C-H na região  $2964\text{-}3107\text{ cm}^{-1}$ . A superposição das deformações axiais de N-H e O-H torna difícil a diferenciação das estruturas desses compostos através do espectro de IV.

A confirmação da obtenção do produto foi obtida a partir das análises de identificação por RMN  $^1\text{H}$  (**Espectro 3**) e de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 4**) através dos deslocamentos em  $4,61\delta$  (ppm) e  $7,67\delta$  (ppm) do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e o deslocamento em  $63,2\delta$  (ppm) do RMN  $^{13}\text{C}$ . O deslocamento em  $4,61\delta$  é referente ao H do  $\text{CH}_2$  introduzido na molécula, não visualizado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectro 5**) do composto matriz NF.

Os resultados do teste de solubilidade de NF e NFOH são apresentados a seguir na **tabela 5**.

**Tabela 5** – Solubilidade do NF e NFOH em diferentes solventes.

| <b>Solvente</b>            | <b>NF</b>                            | <b>NFOH</b>                           |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Água</b>                | Insolúvel                            | Muito pouco solúvel<br>1:10000 partes |
| <b>Metanol</b>             | Muito pouco solúvel<br>1:1200 partes | Muito pouco solúvel<br>1:1100 partes  |
| <b>Etanol</b>              | Muito pouco solúvel<br>1:3800 partes | Muito pouco solúvel<br>1:10000        |
| <b>Acetona</b>             | Muito pouco solúvel<br>1:3000 partes | Muito pouco solúvel<br>1:1800 partes  |
| <b>Dimetilsufóxido</b>     | Facilmente solúvel<br>1:5 partes     | Facilmente solúvel<br>1:3 partes      |
| <b>Dimetiformamida</b>     | Facilmente solúvel<br>1:6 partes     | Facilmente Solúvel<br>1:4 partes      |
| <b>Acetonitrila</b>        | Muito pouco solúvel<br>1:2600 partes | Muito pouco solúvel<br>1:2500         |
| <b>Propilenoglicol</b>     | insolúvel                            | Muito pouco solúvel<br>1:2500 partes  |
| <b>THF</b>                 | Muito pouco solúvel<br>1:9000 partes | Muito pouco solúvel<br>1:1500         |
| <b>Ácido Acético</b>       | insolúvel                            | Muito pouco solúvel<br>1:1200         |
| <b>Butanol</b>             | Muito pouco solúvel<br>1:6000 partes | Insolúvel                             |
| <b>Álcool isopropílico</b> | Muito pouco solúvel<br>1:3500        | Insolúvel                             |
| <b>Hidróxido de Amônio</b> | Muito pouco solúvel<br>1:6000        | Muito pouco solúvel<br>1:3000         |

## 2. TESTES TOXICOLÓGICOS.

### 2.1. Determinação da toxicidade aguda em camundongos e ratos (Dose simples)

A dose letal mediana  $DL_{50}$  foi calculada pelo método estatístico de probitos, conforme metodologia apresentada por LITCHFIELD e WILCOXON, 1949.

Os resultados obtidos em todos os testes de toxicidade aguda com NF e NFOH em camundongos e ratos estão resumidos na **tabela 6**. A seguir os resultados de cada teste estão descritos e discutidos individualmente.

**Tabela 6** – Resumo dos resultados dos testes de toxicidade aguda.

| Animal     | Via  | Solvente               | Substância Teste | $DL_{50}$<br>(mg/Kg) |
|------------|------|------------------------|------------------|----------------------|
| Camundongo | v.o. | DMSO                   | NFOH             | >2000                |
| Camundongo | i.p. | DMSO/H <sub>2</sub> O  | NF               | 197,1                |
| Camundongo | i.p. | DMSO/ H <sub>2</sub> O | NFOH             | 327,0                |
| Rato       | v.o. | DMSO                   | NF               | *                    |
| Rato       | v.o. | DMSO                   | NFOH             | 912,7                |
| Rato       | v.o. | Goma arábica           | NF               | 556,3                |
| Rato       | v.o. | Goma arábica           | NFOH             | >2000                |

\* não foi possível o cálculo.

### 2.1.1. Toxicidade aguda em camundongos

A literatura recomenda o uso de soluções aquosas, mas quando necessário o uso de outros solventes, deve-se conhecer os efeitos tóxicos do mesmo. Dentre os vários solventes, o DMSO é um dos mais utilizados nos laboratórios, particularmente pela sua capacidade de solubilizar compostos orgânicos e aquosos. A utilização do DMSO nos testes foi proposta devido a sua alta capacidade de solubilização dos compostos NF e NFOH (**Tabela 5**).

A toxicidade do DMSO é considerada baixa e seus principais efeitos tóxicos derivam da combinação com outros elementos que são transportados ou potencializados ou ambos (ALSUP, 1984; SANTOS *et al*, 2003).

Os eventuais efeitos tóxicos do DMSO têm gerado muita controvérsia, não existindo consenso quanto ao uso do solvente em testes pré-clínicos. Em conseqüência, para a utilização do solvente nos experimentos foram realizados testes preliminares, definindo a concentração aceitável para cada via utilizada.

A concentração de 0,1 mL/10g foi eleita para realização dos ensaios, uma vez que não provocou mortes nos animais por via oral. Entretanto, no teste i.p esta concentração provocou morte em 100% dos animais.

Desta forma concentrações menores de DMSO foram testadas (para utilização nos ensaios i.p.), chegando-se a solução de DMSO:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) sem causar óbitos.

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com NF e NFOH em camundongos estão apresentados nas **tabelas 7, 8, 9** e **gráficos 1 e 2**. Os testes pela via intraperitoneal permitiram a determinação das doses letais medianas do NF e NFOH.

**Tabela 7** – Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via oral no ensaio de toxicidade do NFOH em camundongos.

| <i>Grupos</i> | <i>Dose<br/>(mg/Kg)</i> | <i>Nº de obitos</i> | <i>Mortalidade<br/>(%)</i> |
|---------------|-------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>I</i>      | DMSO                    | 0                   | 0                          |
| <i>II</i>     | 1000                    | 0                   | 0                          |
| <i>III</i>    | 1500                    | 0                   | 0                          |
| <i>IV</i>     | 2000                    | 3                   | 30                         |
| <i>V</i>      | 2500                    | 5                   | 50                         |
| <i>VI</i>     | 3000                    | 2                   | 20                         |

**Tabela 8** – Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via intraperitoneal no ensaio toxicidade aguda do NFOH em camundongos.

| <i>Grupos</i> | <i>Dose<br/>(mg/Kg)</i> | <i>Nº de óbitos</i> | <i>Mortalidade<br/>(%)</i> |
|---------------|-------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>I</i>      | DMSO/H <sub>2</sub> O   | 0                   | 0                          |
| <i>II</i>     | 150                     | 0                   | 0                          |
| <i>III</i>    | 250                     | 1                   | 10                         |
| <i>IV</i>     | 300                     | 5                   | 50                         |
| <i>VI</i>     | 400                     | 7                   | 70                         |
| <i>VII</i>    | 600                     | 10                  | 100                        |

DL<sub>50</sub> média = 327,0 mg/Kg

Limite superior DL<sub>50</sub> = 383,6 mg/Kg

Limite inferior DL<sub>50</sub> = 283,2 mg/Kg

**Tabela 9** – Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via intraperitoneal no ensaio toxicidade aguda do NF em camundongos.

| <i>Grupos</i> | <i>Dose<br/>(mg/Kg)</i> | <i>Nº de óbitos</i> | <i>Mortalidade<br/>(%)</i> |
|---------------|-------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>I</i>      | DMSO/H <sub>2</sub> O   | 0                   | 0                          |
| <i>II</i>     | 98,0                    | 1                   | 10                         |
| <i>III</i>    | 200,0                   | 5                   | 50                         |
| <i>IV</i>     | 250,0                   | 6                   | 60                         |
| <i>V</i>      | 300,0                   | 8                   | 80                         |
| <i>VI</i>     | 400,0                   | 10                  | 100                        |

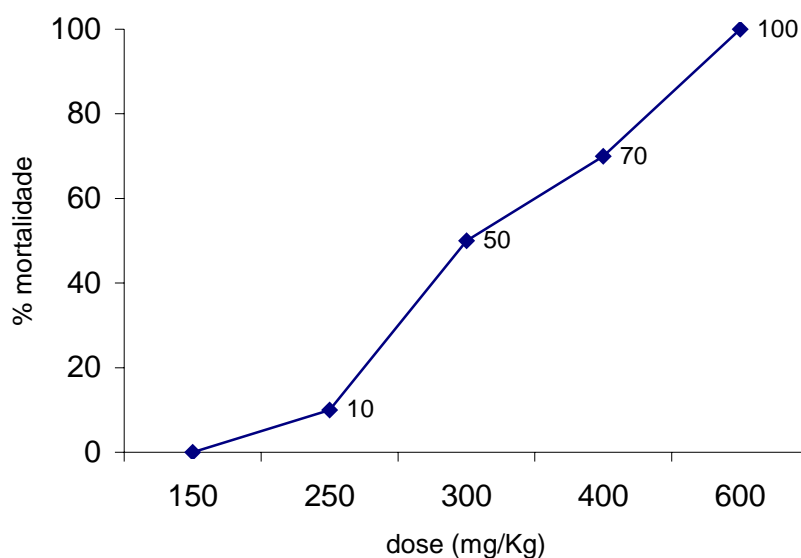
DL<sub>50</sub> média = 197,1 mg/Kg

Limite superior DL<sub>50</sub> = 239,6 mg/kg

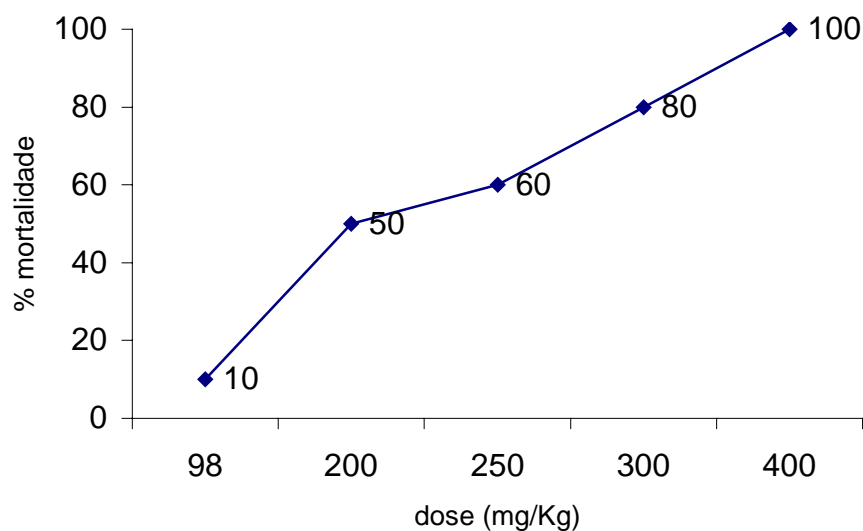
Limite inferior DL<sub>50</sub> = 145,8 mg/kg

Nos testes não foram observados sinais severos de intoxicação, alguns animais apresentaram redução da atividade motora e piloereção. Os óbitos ocorreram nos três primeiros dias após a administração.





**Gráfico 1** – Relação dose-resposta no teste de toxicidade aguda com NFOH, em camundongos, via intraperitoneal.



**Gráfico 2** – Relação dose-resposta no teste de toxicidade aguda com NF, em camundongos, via intraperitoneal.

Devido aos problemas de solubilidade, os resultados não possibilitaram o cálculo efetivo da  $DL_{50}$  média, uma vez que a dose 2500 mg/Kg de NFOH levou a óbito 50% dos animais e a dose superior a esse valor levou a óbito um

número menor de animais, sugerindo problemas na absorção. Considerando os resultados obtidos, há um indicativo para  $DL_{50}$  em torno de 2500 mg/Kg para NFOH.

Sugere-se baixa toxicidade do derivado, uma vez que NFOH apresenta menor toxicidade aguda em relação ao NF de acordo com a literatura. Os valores de  $DL_{50}$  v.o. em camundongos encontrados para o NF foram: 380 mg/Kg (Krantz & Evans, 1945) e 590 mg/Kg (Miyali, 1971).

Segundo a OMS os agentes tóxicos via oral são classificados como extremamente tóxicos ( $DL_{50}$  igual ou inferior a 25 mg/Kg), altamente tóxicos ( $DL_{50}$  entre 100 e 500 mg/Kg), mediamente tóxicos ( $DL_{50}$  entre 500 e 2000 mg/Kg) e pouco tóxicos ( $DL_{50}$  acima de 2000 mg/kg). Desta forma, os resultados obtidos pela via oral ainda caracterizam o NFOH como pouco tóxico.

É sabido que no estudo da toxicidade aguda deverão ser utilizadas duas vias de administração, sendo que uma delas deverá estar relacionada com a recomendada para o uso terapêutico proposto e a outra deverá ser uma via que assegure a absorção do fármaco. Uma vez que os valores obtidos por via oral não determinaram efetivamente um valor, decidiu-se a realização da avaliação também em outra via, a intraperitoneal (i.p.) para fins comparativos.

Os resultados obtidos no teste de toxicidade aguda do NFOH por via i.p. demonstraram uma  $DL_{50}$  média de 327,0 mg/Kg, com limite superior 383,6 mg/Kg e limite inferior 283,2 mg/Kg. Comparando com os valores obtidos no teste com NF, a  $DL_{50}$  média de 197,1 mg/Kg, com limite superior 239,6 mg/kg e limite inferior 145,8 mg/kg, sugere-se que o derivado NFOH é menos tóxico pela via i.p., com um valor de  $DL_{50}$  maior em relação ao fármaco matriz.

### 2.1.2. Toxicidade aguda em ratos

Os testes em ratos foram realizados, inicialmente, utilizando DMSO como solvente, devido a sua alta capacidade de solubilizar os dois compostos, sendo que as amostras foram administradas em forma de solução. Os resultados obtidos nos testes com o solvente DMSO estão apresentados nas tabelas 10, 11 e gráfico 3.

**Tabela 10** – Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via oral no ensaio toxicidade aguda do NF (solvente DMSO) em ratos.

| <i>Grupos</i> | <i>Dose<br/>(mg/Kg)</i> | <i>Nº de obitos</i> | <i>Mortalidade<br/>(%)</i> |
|---------------|-------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>I</i>      | DMSO                    | 0                   | 0                          |
| <i>II</i>     | 500                     | 0                   | 0                          |
| <i>III</i>    | 1000                    | 1                   | 10                         |
| <i>IV</i>     | 1500                    | 10                  | 100                        |
| <i>V</i>      | 2000                    | 10                  | 100                        |

Os resultados demonstrados na **tabela 10** não possibilitaram a determinação da  $DL_{50}$  do NF, em DMSO, por via oral. Nos dois níveis mais altos de dose os sinais de toxicidade foram observados após 24 horas da administração e incluem piloereção, redução da atividade e sangramento de narinas e olhos.

Os dois animais sobreviventes da dose 2000 mg/Kg até 10º dia foram pesados e foi observada redução de cerca de 26% do peso inicial. Os óbitos iniciaram-se cerca de 48 horas após a administração e ocorreram até no 8º dia de teste para a dose de 1500 mg/Kg e 12º dia para a dose de 2000 mg/Kg.

Na dose de 1000 mg/Kg a mortalidade observada foi baixa, entretanto 90% dos animais apresentaram sinais de toxicidade após 24 horas da administração. Os sinais incluem redução da atividade, sangramento de narinas e olhos e ataques apopléticos. Alguns animais ficaram bem debilitados, mas se recuperaram. No nível de dose mais baixo apenas um animal apresentou sinais de toxicidade, incluindo piloereção e sangramento das narinas e olhos.

Na necrópsia dos animais que foram a óbito dos grupos de 1500 mg/Kg e 2000 mg/Kg foram observadas altas quantidades de fármaco no estômago e nenhuma no intestino (esta observação só foi possível devido à coloração do fármaco). Os resultados sugerem que a baixa solubilidade no NF em água faça com que o mesmo precipite no estômago, podendo prejudicar absorção.

**Tabela 11** – Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via oral no ensaio toxicidade aguda do NFOH (solvente DMSO) em ratos.

| <i>Grupos</i> | <i>Dose</i><br><i>(mg/Kg)</i> | <i>Nº de óbitos</i> | <i>Mortalidade</i><br><i>(%)</i> |
|---------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| <i>I</i>      | DMSO                          | 0                   | 0                                |
| <i>II</i>     | 250                           | 0                   | 0                                |
| <i>III</i>    | 500                           | 2                   | 20                               |
| <i>IV</i>     | 1000                          | 4                   | 40                               |
| <i>V</i>      | 1500                          | 9                   | 90                               |
| <i>VI</i>     | 2000                          | 6                   | 60                               |

DL<sub>50</sub> média = 912,7 mg/Kg

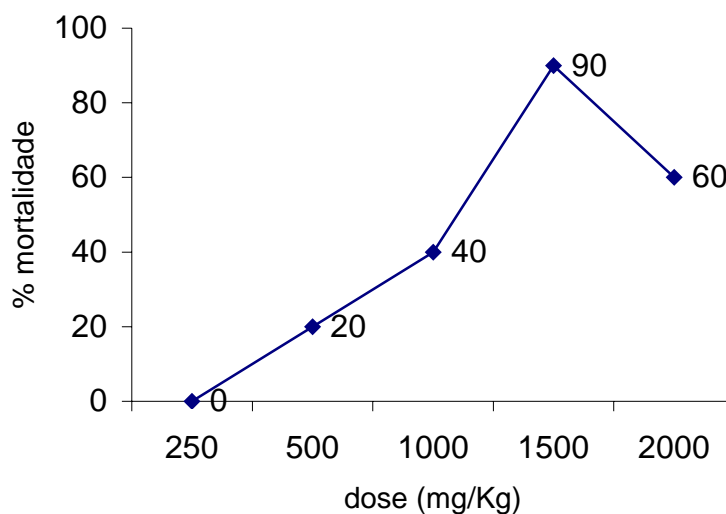
Limite superior DL<sub>50</sub> = 601,6 mg/Kg

Limite inferior DL<sub>50</sub> = 1319,8 mg/Kg

Ao contrário dos resultados obtidos no teste de toxicidade aguda de NF, os resultados obtidos no teste com NFOH, utilizando como solvente DMSO, mostrados na **tabela 11**, possibilitaram a determinação da dose letal mediana.

Em todos os grupos tratados os sinais de toxicidade não foram severos, com redução da atividade e em alguns casos piloereção que surgiram após 2 a 3 horas da administração. Também contrariando os resultados de NF os animais foram a óbito até as 48 horas após a administração e os sobreviventes apresentaram aumento de peso. As mortes foram rápidas e sem sofrimento.

Na necrópsia geral foi encontrado fármaco no estômago, no intestino e em alguns animais também na urina, sugerindo que o DMSO favorece a absorção do NFOH. Os dados obtidos na necrópsia geral são complementares e não conclusivos, necessitando de estudos farmacocinéticos de dosagem para a confirmação dos resultados a cerca da absorção dos compostos.



**Gráfico 3** – Relação dose-resposta no teste de toxicidade aguda com NFOH (DMSO), em ratos, via oral.

O resultado obtido na dose 2000 mg/Kg (**Tabela 11 e Gráfico 3**) foi incoerente e sugere baixa absorção do derivado na dose mais alta.

Sabendo das diferenças de solubilidade dos compostos NF e NFOH em DMSO e principalmente em H<sub>2</sub>O, e através dos resultados citados anteriormente, sugere-se que o DMSO favoreceu a absorção do derivado NFOH. Dessa maneira foi proposta a realização de um novo teste, utilizando uma suspensão à base de água e goma arábica para ambos os compostos.

A goma arábica (concentração 6,66%) foi utilizada nos testes com ratos. A utilização da goma arábica foi proposta após a realização do teste de toxicidade aguda em ratos com o solvente DMSO, uma vez que os resultados iniciais com DMSO foram insatisfatórios.

Morgareidge (1972) realizou estudos de toxicidade aguda por via oral com a goma arábica (acácia) em várias espécies animais e as doses letais medianas determinadas foram: em camundongo 16,0 g/Kg, rato 18,0 g/Kg, hamster 16,0 g/Kg e coelho 8,0 g/Kg.

Alguns estudos de toxicidade à curto prazo com a goma arábica foram realizados, entre eles estudos com ratos, estes receberam 15 % de goma na sua dieta por 62 dias, foi observado um efeito catártico (substâncias que tem qualidades purgativas mais enérgicas que os laxantes e menos que os drásticos), os animais alimentaram-se normalmente havendo aumento de peso, os valores hematológicos e o peso dos órgãos se mantiveram normais (BOOTH *et al.*, 1963).

Os resultados obtidos nos testes com a suspensão de goma arábica estão apresentados nas **tabelas 12, 13 e gráfico 4**. Os resultados possibilitaram a determinação da DL<sub>50</sub> do NF.

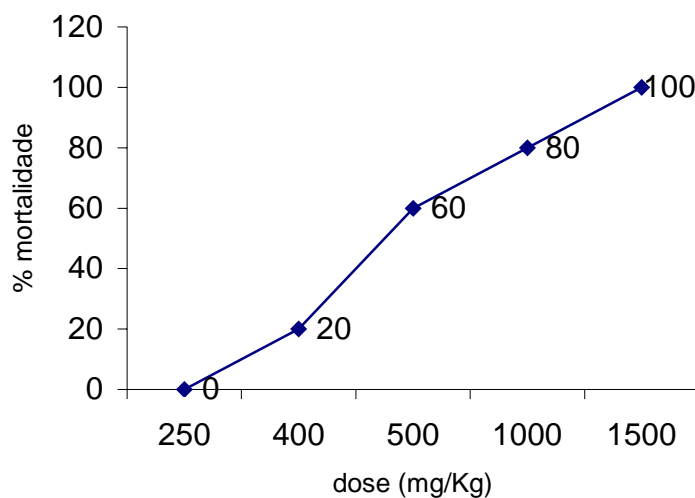
**Tabela 12** – Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via oral no ensaio toxicidade aguda do NF (solvente goma arábica) em ratos.

| <i>Grupos</i> | <i>Dose<br/>(mg/Kg)</i> | <i>Nº de obitos</i> | <i>Mortalidade<br/>(%)</i> |
|---------------|-------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>I</i>      | Goma arábica            | 0                   | 0                          |
| <i>II</i>     | 250                     | 0                   | 0                          |
| <i>III</i>    | 400                     | 2                   | 20                         |
| <i>IV</i>     | 500                     | 6                   | 60                         |
| <i>V</i>      | 1000                    | 8                   | 80                         |
| <i>VI</i>     | 1500                    | 10                  | 100                        |
| <i>VII</i>    | 2000                    | 10                  | 100                        |

DL<sub>50</sub> média = 556,3 mg/Kg

Limite superior DL<sub>50</sub> = 442,5 mg/Kg

Limite inferior DL<sub>50</sub> = 718,1 mg/Kg



**Gráfico 4** – Relação dose-resposta no teste de toxicidade aguda com NF (suspensão goma arábica), em ratos, via oral.

**Tabela 13** – Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via oral no ensaio toxicidade aguda do NFOH (suspensão goma arábica) em ratos.

| <i>Grupos</i> | <i>Dose<br/>(mg/Kg)</i> | <i>Nº de obitos</i> | <i>Mortalidade<br/>(%)</i> |
|---------------|-------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>I</i>      | Goma arábica            | 0                   | 0                          |
| <i>II</i>     | 500                     | 0                   | 0                          |
| <i>III</i>    | 1000                    | 1                   | 10                         |
| <i>IV</i>     | 1500                    | 3                   | 30                         |
| <i>V</i>      | 2000                    | 4                   | 40                         |

Inversamente ao teste realizado com o DMSO, os resultados empregando goma arábica (**Tabela 12 e 13**) não demonstraram diferenças entre os dois compostos em relação aos sintomas (piloereção, sangramento de narinas e olhos e ataques apopléticos) e o tempo de aparecimento dos mesmos. Os óbitos ocorreram nas primeiras 48 horas e na necrópsia geral foi encontrado composto no estômago e no intestino para ambos os testes.

A dose letal mediana para o NF foi determinada em 556,3 mg/Kg, com limite inferior de 442,5 mg/Kg e limite superior de 718,1 mg/Kg. Como a dose limite para o teste foi de 2000 mg/Kg, no teste com o NFOH a mesma levou a óbito apenas 40% dos animais, sugerindo que a  $DL_{50}$  seja maior que esse valor. Esse resultado é semelhante ao obtido no teste com camundongos e caracteriza o derivado como pouco tóxico, segundo a OMS.



## 2.2. Determinação da toxicidade aguda/doses repetidas em camundongos (28 dias)

Os sintomas observados no grupo controle DMSO e nas duas doses administradas de NFOH e NF foram: sedação e incordenação motora (conseqüência da sedação). Uma vez que estes sintomas são observados com o controle positivo do solvente, sugere-se que os efeitos observados com os grupos NF e NFOH sejam decorrentes ao DMSO e não das substâncias de estudo.

Após cerca de duas semanas de ensaio os animais não apresentavam mais sedação após a administração dos compostos, sugerindo resistência ao solvente. A **tabela 14** mostra a mortalidade nos diferentes tratamentos.

**Tabela 14** – Porcentagem de mortalidade NFOH e NF após 28 dias de tratamento.

| <i>Grupos</i> | <i>Dose<br/>(mg/Kg)</i> | <i>Nº de óbitos</i> | <i>Mortalidade<br/>(%)</i> |
|---------------|-------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>I</i>      | H <sub>2</sub> O        | 0                   | 0                          |
| <i>II</i>     | DMSO/ H <sub>2</sub> O  | 0                   | 0                          |
| <i>III</i>    | 100 NFOH                | 0                   | 0                          |
| <i>IV</i>     | 200 NFOH                | 5                   | 25                         |
| <i>V</i>      | 50,0 NF                 | 4                   | 20                         |

A **tabela 15** mostra a média dos pesos iniciais e finais e a diferença entre o peso inicial e o final de cada grupo.

**Tabela 15** – Peso corporal no início e após 28 dias de tratamento.

| <i>Grupos</i> | <i>Dose<br/>(mg/Kg)</i> | <i>Peso final</i> | <i>Peso Inicial</i> | <i>Diferença entre<br/>os pesos</i> |
|---------------|-------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------------------|
| <i>I</i>      | H <sub>2</sub> O        | 52,00             | 39,33               | 12,67                               |
| <i>II</i>     | DMSO                    | 43,80             | 44,80               | -1,00                               |
| <i>III</i>    | 100 NFOH                | 41,50             | 42,50               | -1,00                               |
| <i>IV</i>     | 200 NFOH                | 47,60             | 46,40               | 1,20                                |
| <i>V</i>      | 50 NF                   | 43,70             | 44,45               | 0,75                                |

\* valores negativos indicam diminuição do peso corporal durante o ensaio.

A análise estatística realizada através do teste *t* demonstrou haver diferença significativa ao nível de 5% das médias dos pesos iniciais e finais do grupo controle negativo H<sub>2</sub>O. Nos demais grupos não foram observados diferença significativa entre as médias. No início do experimento houve, uma redução dos pesos (exceto grupo H<sub>2</sub>O) e após cerca de duas semanas os animais começaram a recuperar seu peso inicial, mas não adquiriram peso adicional quando comparados com o grupo controle.

Nos teste de toxicidade à médio-prazo (incluindo os teste de 28 e 60 dias) é importante também avaliar possíveis alterações bioquímicas e hematológicas. Nesse sentido, foram realizados análises hematológicas das séries vermelha (eritograma) e branca (leucograma). No eritograma foi realizada a contagem de plaquetas e de hemácias, a determinação do hematócrito, da hemoglobina, do VCM - volume corpuscular médio, da HCM - hemoglobina corpuscular média e da CHCM - concentração de hemoglobina média. No leucograma contaram-se os leucócitos e fez-se a contagem da diferenciação celular.

A leucocitose (aumento do número global de leucócitos) e a leucopenia (diminuição do número global de leucócitos), estão diretamente relacionadas com o aumento e a diminuição de qualquer um dos elementos do sangue.

Assim, a leucocitose e/ou a leucopenia pode ser, neutrófila, eosinófila, basófila, etc, de acordo com o elemento que estiver alterado (JANINI E JANINI FILHO, 1995).

Os neutrófilos, dos elementos do sangue, são os mais ativos e dotados de vitalidade. Constituem a segunda linha de defesa contra os organismos patogênicos, e encontram-se aumentados no sangue toda vez que o organismo é invadido por germes ou quando houver destruição dos tecidos. Ainda, há casos de neutrofilia em perturbações metabólicas, como uremia, acidose, eclâmpsia e por várias intoxicações por substâncias químicas e fármacos (JANINI E JANINI FILHO, 1995).

Pouco se sabe sobre a função dos linfócitos, mas não há dúvidas que esta célula está envolvida no processo de cura, teria também a função de fixação de toxinas, formação de anticorpos e interviria no metabolismo das gorduras. Dos leucócitos, os monócitos, são os que têm maior tendência a sofrer transformação. Um pequeno número deles é lançado na corrente sanguínea onde são destruídos ou voltam novamente para o tecido. De modo geral, pode-se dizer que sua função é de defesa orgânica, pois nos processos infecciosos o seu aumento é muitas vezes índice de boa reação (JANINI E JANINI FILHO, 1995).

Muito se tem discutido quanto à função do eosinófilo, mas parece que o papel mais importante do mesmo é participar contra certos corpos estranhos, principalmente, contra proteínas introduzidas no organismo por via digestiva, parenteral, cutânea ou respiratória. É interessante citar que a eosinopenia sanguínea pode ocorrer em reação de alarme, desencadeadas por choques devido à ação direta de agente agressor e reações de defesa do organismo (JANINI e JANINI FILHO, 1995).

Os parâmetros hematológicos em camundongos e ratos são influenciados por vários fatores, incluindo local de coleta da amostra, idade, sexo, anestesia

e estresse. Deste modo, estabelecer valores de referência para camundongos e ratos é difícil, sendo que os valores utilizados para comparação dos tratamentos foram obtidos de Thrall e col. (2004).

Durante a coleta de sangue dos animais ocorreram vários problemas, o que dificultou um maior número de amostras sanguíneas para os exames bioquímicos e hematológicos. Além disso, o sangue apresentou hemólise, inclusive nos animais controle. Os resultados destes testes foram apresentados como indicativo, sendo necessário sua repetição para confirmação dos dados.

Os valores médios hematológicos em função dos diferentes tratamentos estão apresentados na **tabela 16 e 17 e gráfico 5**.

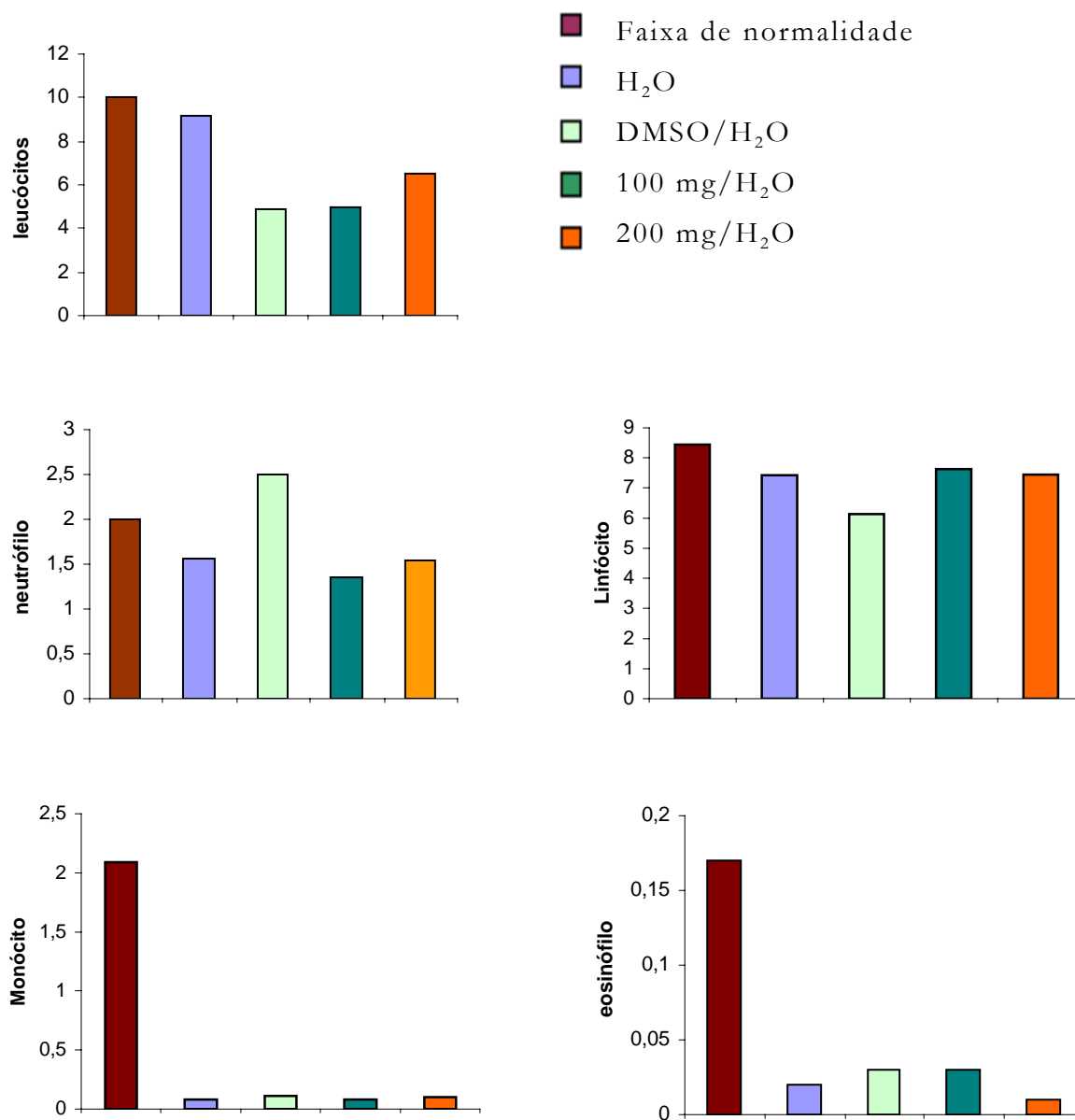
**Tabela 16** – Leucograma dos camundongos após 28 dias de tratamento.

| Parâmetros hematológicos            | Faixa normalidade    | Controle                | Controle                     | Dose            | Dose            |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
|                                     |                      | H <sub>2</sub> O<br>N=3 | DMSO/H <sub>2</sub> O<br>n=3 | 100mg/Kg<br>N=4 | 200mg/kg<br>n=4 |
| Leucócito<br>(10 <sup>3</sup> /μl)  | 6,33<br>(2,61-10,05) | 9,13 ± 0,61             | 4,87 ± 0,60                  | 4,93 ± 1,50     | 6,55 ± 1,41     |
| Neutrófilo<br>(10 <sup>3</sup> /μl) | 1,20<br>(0,4-2,0)    | 1,57 ± 0,5              | 2,50 ± 0,62                  | 1,35 ± 0,52     | 1,55 ± 0,24     |
| Linfócito<br>(10 <sup>3</sup> /μl)  | 4,86<br>(1,27-8,44)  | 7,43 ± 0,57             | 6,13 ± 1,08                  | 7,63 ± 0,87     | 7,45 ± 0,13     |
| Monócito<br>(10 <sup>3</sup> /μl)   | 0,14<br>(0-0,29)     | 0,08 ± 0,02             | 0,11 ± 0,03                  | 0,08 ± 0,04     | 0,10 ± 0,03     |
| Eosinófilo<br>(10 <sup>3</sup> /μl) | 0,08<br>(0-0,17)     | 0,02 ± 0,02             | 0,03 ± 0,02                  | 0,03 ± 0,02     | 0,01 ± 0,01     |

Os resultados se referem à média ± desvio padrão.

Em relação ao leucograma o número reduzido de amostra não possibilitou a análise estatística. A comparação dos valores da literatura e do grupo controle H<sub>2</sub>O com os resultados dos grupos tratados com NFOH não

apresentaram grandes variações. A maior variação, e que excedeu a faixa de normalidade (**gráfico 5**), ocorreu com os resultados da contagem específica dos neutrófilos, o que pode ser atribuído à intoxicação com o fármaco ou mesmo com solvente DMSO.



**Gráfico 5** – Leucograma dos camundongos após 28 dias de tratamento (Leucócito (10<sup>3</sup>/μl), neutrófilo (10<sup>3</sup>/μl), linfócito (10<sup>3</sup>/μl), monócito (10<sup>3</sup>/μl) e eosinófilo (10<sup>3</sup>/μl)).

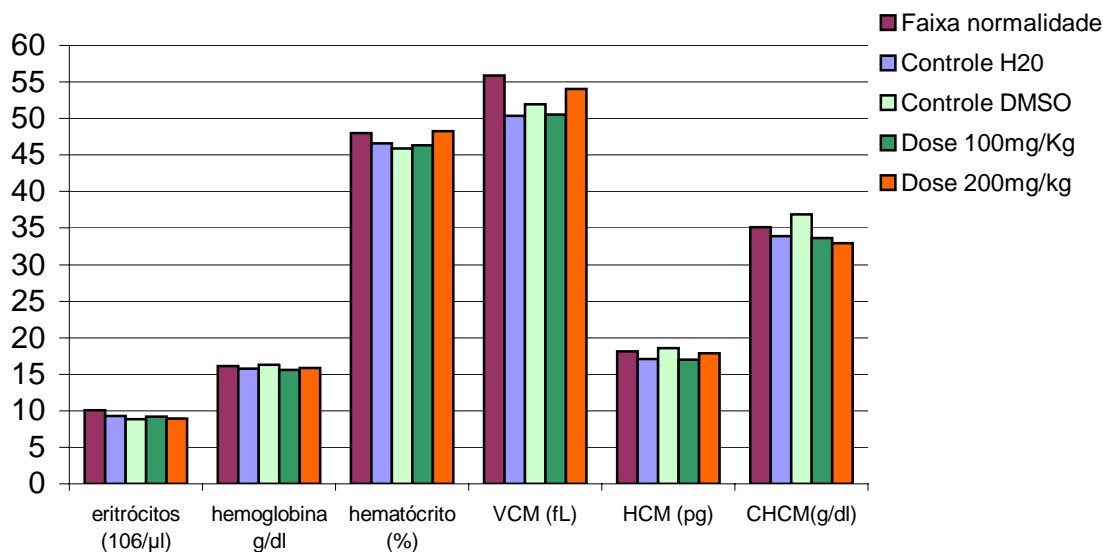
O eritograma é um exame clínico que avalia os achados normais e patológicos mais comuns dos eritrócitos encontrados no sangue e assim tirar conclusões a respeito da perturbação existente na série vermelha.

**Tabela 17**– Eritograma dos camundongos após 28 dias de tratamento

| <i>Parâmetros hematólogicos</i>        | <i>Faixa Normalidade</i> | <i>Controle H<sub>2</sub>O n=1</i> | <i>Controle DMSO n=3</i> | <i>Dose 100mg/Kg n=4</i> | <i>Dose 200mg/kg n=4</i> |
|--|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Eritrócitos (10<sup>6</sup>/µl)</b> | 6,5 – 10,1               | 9,25                               | 8,83 ± 0,29              | 9,16 ± 0,63              | 8,97 ± 0,77              |
| <b>hemoglobina (g/dl)</b>              | 10,1 – 16,1              | 15,80                              | 16,33 ± 1,40             | 15,63 ± 1,92             | 15,88 ± 0,79             |
| <b>hematócrito (%)</b>                 | 32,8 – 48,0              | 46,60                              | 45,87 ± 2,72             | 46,33 ± 3,89             | 48,28 ± 1,73             |
| <b>VCM (fL)</b>                        | 42,3 – 55,9              | 50,40                              | 51,90 ± 1,91             | 50,53 ± 1,42             | 54,03 ± 2,78             |
| <b>HCM (pg)</b>                        | 13,7 – 18,1              | 17,10                              | 18,53 ± 1,80             | 17,03 ± 1,07             | 17,83 ± 1,28             |
| <b>CHCM(g/dl)</b>                      | 29,5 – 35,1              | 33,90                              | 36,87 ± 4,15             | 33,68 ± 1,63             | 32,93 ± 1,20             |

VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média, CHCM = concentração de hemoglobina média. Os resultados se referem à média ± desvio padrão.

Quando os valores do eritograma dos vários grupos de tratamento são comparados com o grupo controle e a faixa de normalidade da literatura no **gráfico 6**, observa-se que todos estão dentro ou muito próximos da normalidade.



**Gráfico 6** – Eritograma dos camundongos após 28 dias de tratamento, hematócrito, hemoglobina, VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina média).

A enzimas comumente utilizadas para detectar doenças hepáticas de roedores incluem fosfatase alcalina, gama glutamil transferase, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, lactato deidrogenase e sorbitol deidrogenase. A concentração sérica ou plasmática dessas enzimas se elevam com o aumento da produção e liberação ou a diminuição do “clearance”. Em camundongos, a hiperproteinemia frequentemente é associada com severa desidratação e pode ocorrer com a perda de proteína pela urina na doença renal (Thrall *et al*, 2004).

Devido à baixa quantidade de amostra coletada duas enzimas foram selecionadas para análise, a Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST).

Na **tabela 18** estão apresentados os resultados das determinações bioquímicas de ALT, AST e Albumina nos vários grupos de tratamento.

**Tabela 18** – Perfis bioquímicos de NF e NFOH após 28 dias de tratamento.

| Parâmetros bioquímicos | Faixa normalidade | Controle H <sub>2</sub> O<br>n=8 | Controle DMSO<br>n=8 | Dose 100mg/Kg<br>n=8 | Dose 200mg/kg<br>n=8 | Dose 50mg/ kg<br>NF |
|------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| ALT (U/l)              | 40 – 189          | 74,62<br>(53-91)                 | 93,75<br>(70-121)    | 81,37<br>(54-118)    | 105,5<br>(73-141)    | 200,75<br>(127-310) |
| AST (U/l)              | 77 – 383          | 338,25<br>(233-418)              | 294,87<br>(200-394)  | 316,5<br>(207-422)   | 421,50<br>(240-625)  | 750<br>(420-1390)   |
| Albumina (g/dL)        | 2,5 – 4,0         | 2,32<br>(2,0-2,8)                | 2,58<br>(2,2-3,0)    | 2,51<br>(1,6-3,0)    | 2,37<br>(2,0-2,9)    | 2,6<br>(2,2-3,1)    |

A AST é uma enzima mitocondrial e citosólica com alta atividade no fígado, coração, músculo esquelético, rins e baixa atividade nos intestinos, cérebro, pulmão. Aumentos na atividade sérica ou plasmática da AST usualmente estão associados com injúria hepática, do músculo cardíaco ou músculo esquelético. (THRALL *et al* , 2004).

Em ratos e camundongos a atividade de ALT é alta no fígado, nos roedores em geral há também atividade nos intestinos, rins, coração, músculo esquelético, cérebro, pele e pâncreas. Aumento da atividade sérica e no plasma relacionado com dano hepatocelular é maior em roedores, e a enzima parece ser mais específica para fígado em ratos e camundongos (THRALL *et al* , 2004).

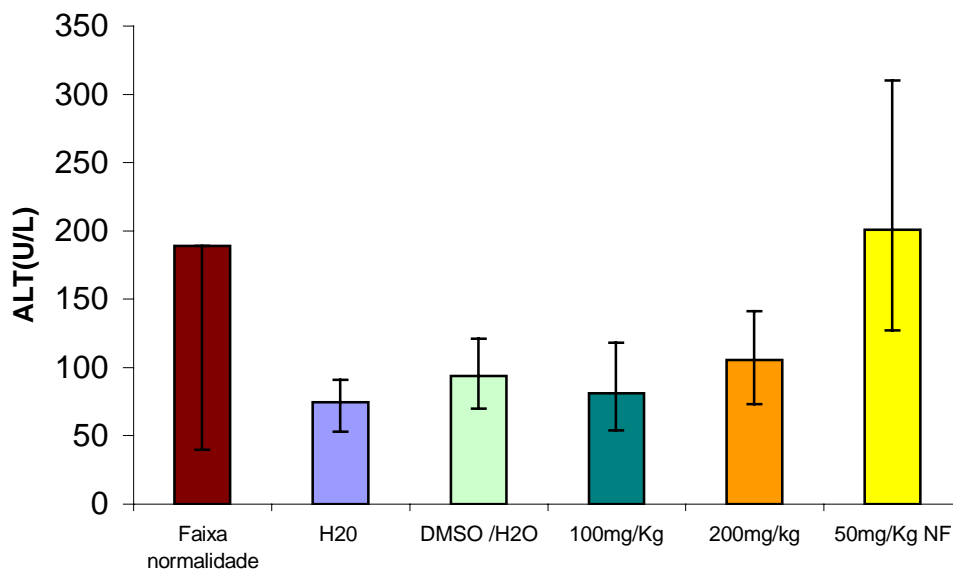
A análise estatística dos resultados (ANOVA) comparou as médias dos diferentes grupos de tratamento e demonstrou não haver diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das análises de albumina (F calculado 1,03; F crítico 2,64).



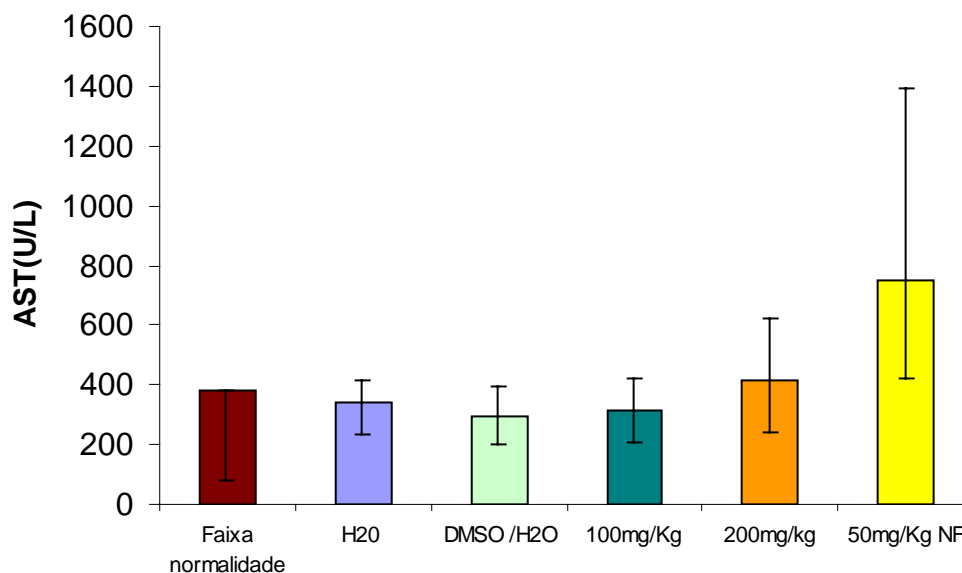
Para as análises de ALT e AST observaram-se diferenças significativas entre as médias (F calculado: ALT 16,38; AST 8,89, F crítico: 2,64). Os dados foram submetidos ao teste de Tukey, sendo os resultados iguais para as duas enzimas, demonstrando diferença significativa entre as médias dos grupos controle com o grupo 50 mg/Kg de NF.

Já os grupos tratados com NFOH não apresentaram diferenças significativas com os grupos controles (H<sub>2</sub>O e H<sub>2</sub>O/DMSO) e entre as duas doses administradas do derivado.

Os **gráficos 7, 8 e 9** ilustram a comparação entre os parâmetros para a avaliação do dano hepático e de proteína sanguínea, que oferecem resultados dos níveis de ALT, AST e Albumina nos diferentes grupos em relação a faixa de normalidade encontrada na literatura (Thrall *et al* , 2004 ).



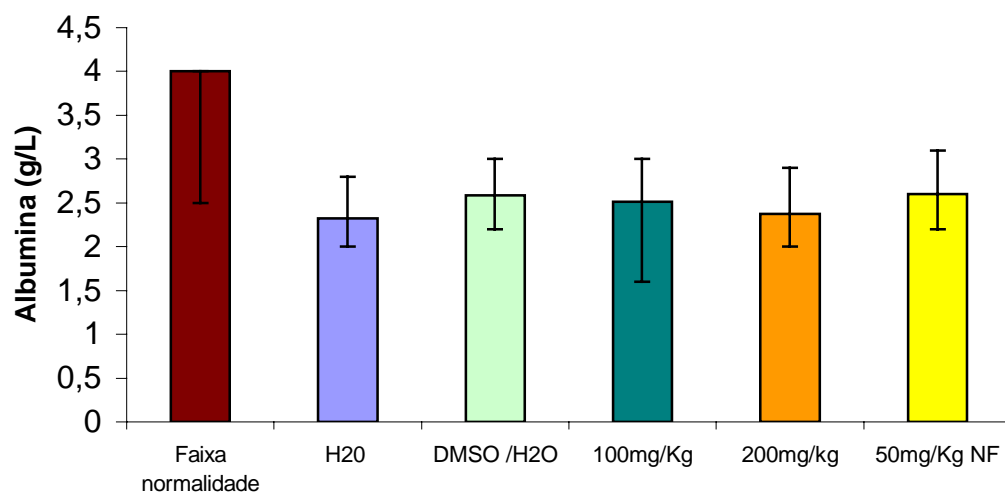
**Gráfico 7** – Níveis de Alanina Aminotransferase (ALT) do soro dos camundongos após 28 dias de tratamento.



**Gráfico 8** - Níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) no soro dos camundongos após 28 dias de tratamento.

No **gráfico 7** pode-se observar que os níveis de Alanina Aminotransferase (ALT) de todos os grupos de tratamento (controle e NFOH) estão dentro da faixa de normalidade, exceto o grupo tratado com NF. No **gráfico 8** observam-se resultados semelhantes, com valores maiores da AST.

A análise estatística dos dados confirmou a maior variação da média do grupo tratado com 50 mg NF em relação ao grupo controle H<sub>2</sub>O, sabendo que os demais (DMSO/H<sub>2</sub>O e NFOH 100 e 200mg/Kg) não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle para ambas enzimas.



**Gráfico 9** - Níveis de Albumina do soro dos camundongos após 28 dias de tratamento.

O **gráfico 9** mostra pequenas alterações em todos os grupos sempre em relação ao limite inferior da faixa de normalidade dos níveis de albumina, mas a análise estatística não revelou haver diferenças significativas entre as médias.

### 2.3. Determinação da toxicidade subcrônica em camundongos (60 dias)

Os sintomas observados neste ensaio foram os mesmos observados no teste de 28 dias. O grupo controle positivo DMSO/H<sub>2</sub>O também apresentou sinais de intoxicação, entretanto, em menor escala do que o grupo DMSO do teste anterior.

Os sinais também desaparecem com o tempo de ensaio, sugerindo resistência dos animais ao DMSO. A **tabela 19** mostra a taxa de mortalidade dos diferentes tratamentos.

Durante a observação diária detectou-se canibalismo, onde foi necessário o sacrifício de alguns animais e até de grupos inteiros.

**Tabela 19** – Porcentagem de mortalidade NFOH após 60 dias de tratamento.

| Grupos     | Dose<br>(mg/Kg)       | Nº de óbitos | Mortalidade<br>(%) |
|------------|-----------------------|--------------|--------------------|
| <i>I</i>   | H <sub>2</sub> O      | 0            | 0                  |
| <i>III</i> | DMSO/H <sub>2</sub> O | 0            | 0                  |
| <i>IV</i>  | 100,0*                | 2            | 10                 |
| <i>VI</i>  | 200,0*                | 8            | 80                 |

\* alguns animais destes grupos foram à óbito por canibalismo

A **tabela 20** mostra a média dos pesos iniciais e finais e a diferença entre o peso inicial e o final de cada grupo.

**Tabela 20** – Peso corporal no início e após 60 dias de tratamento.

| Grupos     | Dose<br>(mg/Kg)       | Peso final | Peso Inicial | Diferença entre<br>os pesos |
|------------|-----------------------|------------|--------------|-----------------------------|
| <i>I</i>   | H <sub>2</sub> O      | 57,75      | 37,63        | 20,13                       |
| <i>II</i>  | DMSO/H <sub>2</sub> O | 44,75      | 25,25        | 19,50                       |
| <i>IV</i>  | 100                   | 51,83      | 23,00        | 28,83                       |
| <i>VII</i> | 200                   | *          | *            | *                           |

\* grupo sacrificado por canibalismo

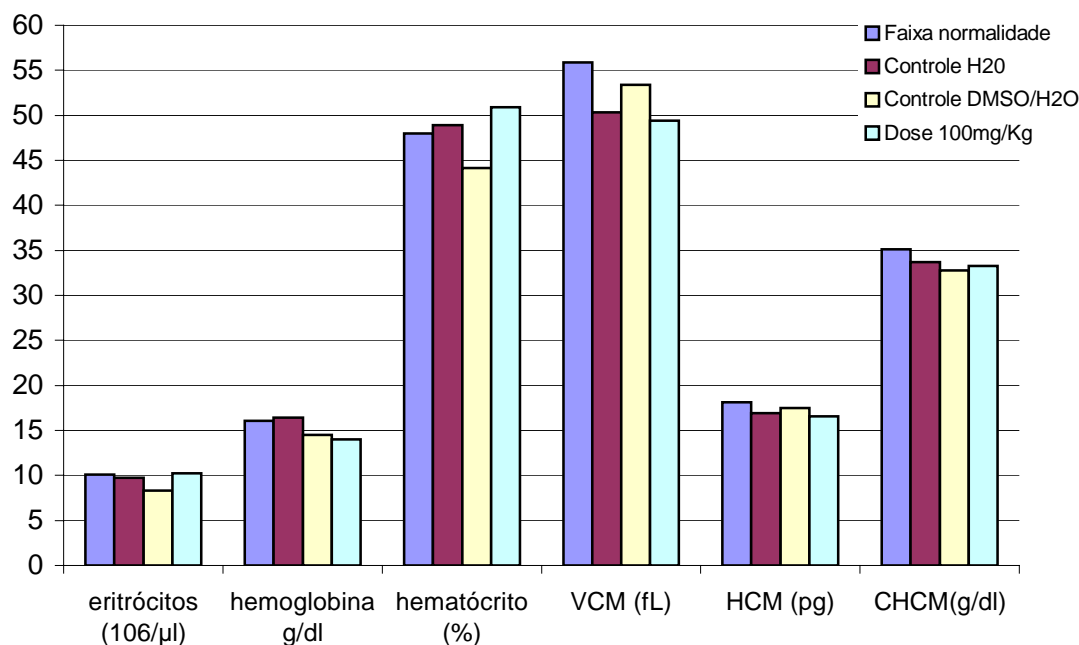
A média dos pesos finais de todos os grupos apresentou diferença significativa em relação à média dos pesos iniciais. No início do experimento também houve uma redução dos pesos (exceto grupo H<sub>2</sub>O), e após cerca de 2 semanas os animais começaram a recuperar e aumentar seu peso em relação ao peso inicial, indicando desenvolvimento normal dos animais.

Os valores médios hematológicos em função dos diferentes tratamentos estão apresentados na **tabela 21**. O **gráfico 10** compara os grupos com os valores da faixa de normalidade.

**Tabela 21** – Eritograma dos camundongos após 60 dias de tratamento.

| Parâmetros<br>hematológicos       | Faixa<br>Normalidade | Controle<br>H <sub>2</sub> O<br>n = 1 | Controle<br>DMSO/H <sub>2</sub> O<br>n=3 | Dose<br>100mg/Kg<br>N=3 |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------------|--|-------------------------|
| eritrócitos (10 <sup>6</sup> /μl) | 6,5 – 10,1           | 9,71                                  | 8,31 ± 1,53                              | 10,25 ± 0,85            |
| hemoglobina g/dl                  | 10,1 – 16,1          | 16,40                                 | 14,50 ± 2,35                             | 17,00 ± 1,57            |
| hematócrito (%)                   | 32,8 – 48,0          | 48,90                                 | 44,13 ± 6,77                             | 50,93 ± 4,01            |
| VCM (fL)                          | 42,3 – 55,9          | 50,30                                 | 53,37 ± 2,35                             | 49,73 ± 1,07            |
| HCM (pg)                          | 13,7 – 18,1          | 16,90                                 | 17,50 ± 0,44                             | 16,53 ± 0,23            |
| CHCM(g/dl)                        | 29,5 – 35,1          | 33,70                                 | 32,80 ± 0,72                             | 33,30 ± 0,62            |

VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média, CHCM = concentração de hemoglobina média. Os resultados se referem à média ± desvio padrão.



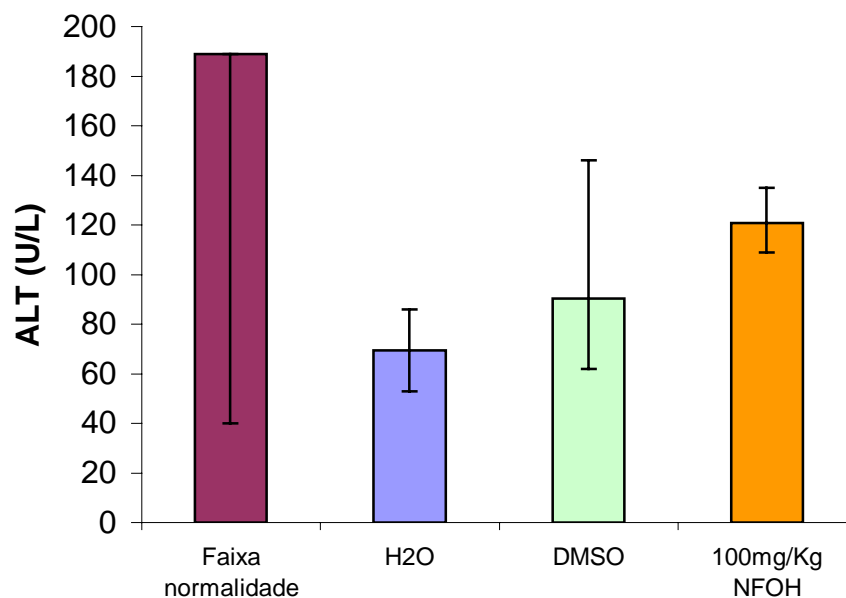
**Gráfico 10** - Eritograma dos camundongos após 60 dias de tratamento, hematócrito, hemoglobina, VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina média).

O **gráfico 10** sugere que após 60 dias de tratamento os valores do eritograma dos camundongos estão dentro ou muito próximos da faixa de normalidade.

**Tabela 22** – Perfil bioquímico de NFOH após 60 dias de tratamento.

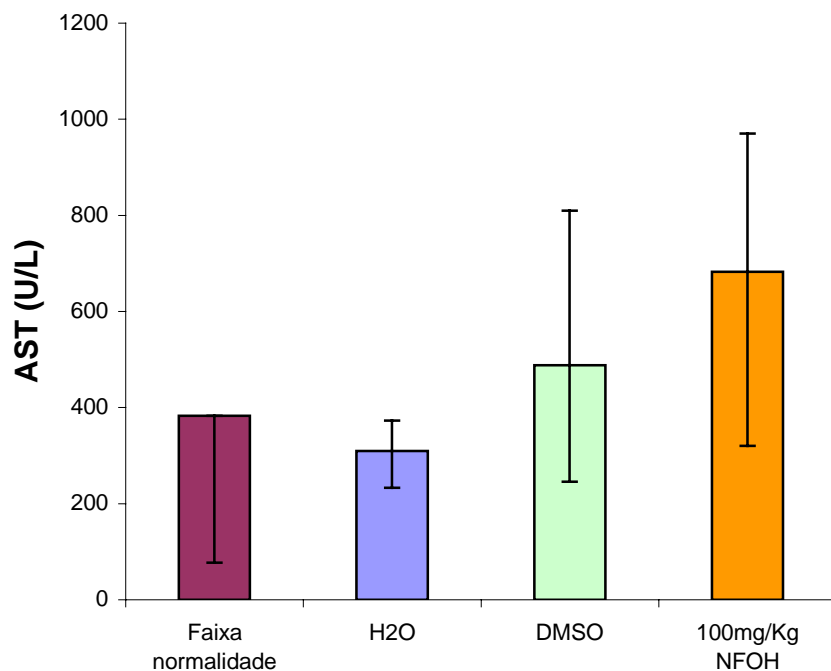
| Parâmetros bioquímicos | Faixa normalidade | Controle H <sub>2</sub> O<br>n=4<br>(média)<br>(mínimo/máximo) | Controle DMSO/H <sub>2</sub> O<br>n=6<br>(média)<br>(mínimo/máximo) | Dose 100mg/Kg<br>n=4<br>(média)<br>(mínimo/máximo) |
|------------------------|-------------------|--|---|--|
| ALT (U/l)              | 40 – 189          | 69,50<br>(53-86)   | 90,33<br>(62-146)   | 120,75<br>(109-135)                                |
| AST (U/l)              | 77 – 383          | 309,50<br>(233-373)  | 488,0<br>(246-810)  | 682,50<br>(320-970)                                |
| Albumina (g/dL)        | 2,5 – 4,0         | 2,40<br>(2,0-2,8)  | 2,48<br>(1,8-3,4)   | 2,65<br>(2,2-3,1)                                  |

Os **gráficos 11, 12 e 13**, ilustram a comparação entre os parâmetros para a avaliação do dano hepático e de proteína sanguínea, que oferecem resultados dos níveis de ALT, AST e Albumina nos diferentes grupos em relação a faixa de normalidade encontrada na literatura.



**Gráfico 11** – Níveis de Alanina Aminotransferase (ALT) do soro dos camundongos após 60 dias de tratamento.

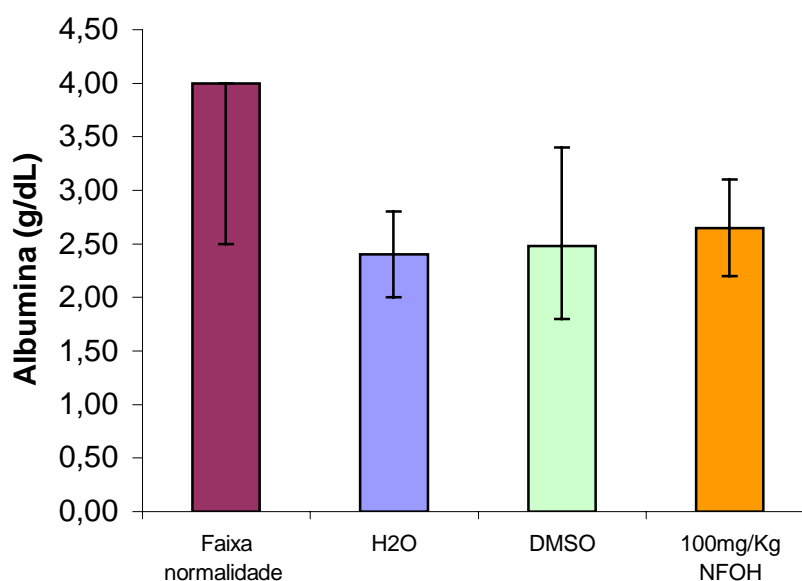
O teste de 60 dias de tratamento confirmou os dados obtidos no teste de 28 dias não havendo alterações dos valores níveis de ALT em relação à faixa de normalidade dos grupos tratados com NFOH (**Gráfico 11**).



**Gráfico 12** – Níveis de Aspartato Aminotransferase do soro dos camundongos após 60 dias de tratamento.

O **gráfico 12** mostra alterações dos valores nos níveis de AST do grupo controle DMSO e da dose de 100mg/kg, estando estas fora da faixa de normalidade. Estes dados sugerem alterações nas enzimas pelo DMSO, não sendo conclusivos para o NFOH. Sugere-se a utilização do teste utilizando outro solvente, como a goma.





**Gráfico 13** – Níveis de Albumina do soro dos camundongos após 60 dias de tratamento.

O valor de referência da albumina encontrado na literatura tem seu limite inferior de 2,5 g/dL, o **gráfico 13** mostra valores abaixo desse limite. Comparando o grupo controle DMSO e o tratamento NFOH de 100mg/Kg com os valores de grupo controle H<sub>2</sub>O os resultados são parecidos.

A análise estatística dos resultados não foi possível, mas os resultados são parecidos com os obtidos no teste de 28 dias, indicando que o NFOH não alterou os valores dos vários parâmetros avaliados, mantendo os dentro da faixa de normalidade encontrada na literatura.

## VI – CONCLUSÕES

1) Os resultados obtidos nos teste de toxicidade aguda (14 dias) com camundongos sugerem baixa toxicidade do derivado. Por via oral os resultados caracterizam o NFOH como pouco tóxico, segundo a OMS com um valor de  $DL_{50}$  acima de 2000mg/kg. Os resultados nos testes por via intraperitoneal também indicam baixa toxicidade, no qual obteve-se um valor de  $DL_{50}$  de 327 mg/Kg, e ainda demonstraram menor toxicidade do derivado em relação ao fármaco matriz ( $DL_{50}$  197,1 mg/Kg) por esta via.

2) Os resultados do teste de toxicidade aguda com doses repetidas (28 dias) e do teste de toxicidade subcrônica (60 dias) sugerem baixa toxicidade do derivado, sendo que os valores hematológicos e bioquímicos (exceto AST) estão dentro da faixa de normalidade, sendo confirmada com a análise estatística no teste de 28 dias.

3) Os testes de toxicidade aguda com ratos utilizando DMSO, sugerem que o solvente pode ter favorecido a absorção do NFOH, mas não de NF.

4) Os valores de  $DL_{50}$  em goma arábica foram:

- $DL_{50}$  NF 556,3mg/Kg, com limite inferior de 442,5 mg/Kg e limite superior de 718,1 mg/Kg;
- $DL_{50}$  NFOH maior 2000mg/Kg;

Esse resultado é semelhante ao obtido no teste com camundongos e caracteriza o derivado como pouco tóxico, segundo a OMS.

5) Os resultados obtidos justificam a continuidade dos testes pré-clínicos em outras espécies animais, como ratos e cães.

**VII – PERPECTIVAS**

- ❖ Empregar a goma rábica como veículo para os compostos no próximos testes.
  
- ❖ Concluir os testes de toxicidade a médio prazo (toxicidade subcrônica) e realizar os testes a longo prazo (toxicidade crônica) com avaliação dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos. Determinar a concentração de fármaco no Sistema Nervoso Central em ratos.
  
- ❖ Avaliar a capacidade carcinogênica do derivado através de testes de genotoxicidade e citotoxicidade.
  
- ❖ Iniciar os testes de toxicidade em cães.

**VIII - Referências** (elaboradas segundo a Norma 6023:2002 da ABNT)

ALI, B.H. The effect of nitrofurazone on the thiamine status of chickens. **Comp. Biochem. Physiol A.**, n.76, p.131-134, 1983.

ALI, B.H.; SILSBY, J.; EL HALAWANI, M.E. Effect of furazolidone and nitrofurazone on egg production, on plasma luteinising hormone and on prolactin concentrations in turkeys. **Brit. Poultry Sci.**, n.28, p.613-621, 1987.

ALI, B.H.; SILSBY, J.L.; EDENS, F.; EL HALAWANI, M.E. Effects of furazolidone or nitrofurazone on the concentrations of hypothalamic amines and plasma luteinizing hormone (LH) and prolactin (PRL) levels in young turkeys. **Gen. Pharmac.**, n.19, p. 91-95, 1988.

ALSUP, E.M. Dimethyl sulfoxide. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.185, n.9, p.1011-1014, 1984.

AMATO V.N.; SHIKANAI M.Y.; AMATO W.S. Doença de Chagas aguda. In: DIAS J.C.P.; COURA (orgs.) **Clínica e Terapêutica da doença de Chagas Uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997, p. 127-134.

ANANDAN, J.V.; Parasitic disease. In: DIPIRO, J. T. *et. al* (Eds). **Pharmacotherapy physiological approach**. 3.ed. London: Appleton & Lange, 1997, p. 2161-2172.

ANDERSON, D. Cytogenetic analysis in rat bone marrow with nitrofurazone. Project n.466.59.63. **Unpublished report for Norwich Eaton Pharmaceuticals, Inc.** Submitted to WHO by Orphahell B.V.; Mijdrecht, Netherlands, 1983.

BOOTH, A.N.; HENDRICKSON, A.P. Physiologic effects of three microbial polysaccharides on rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, n.5, p.478, 1963.

BRENER, Z.; CANÇADO, J.R. Terapêutica. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.

BRITO, A.S. **Manual de Ensaios Toxicológicos In Vivo**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1994, p11-39.

BUNDGAARD, H. **Design of produgs**. Amsterdam: Elsevier, 1985, p360.

BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. **Drugs Future**. v.16, p. 443-458, 1991.

CAMANDAROBA, E.L.; PINHEIRO, C.M.; ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, n.44(2), p.97-103, 2002.

CAMARGO, M.E. Serological diagnosis: an appraisal of Chagas' disease serodiagnosis. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A. (eds.) **Chagas's disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: ISBT, 1992. p. 165-178.

CANÇADO J. P. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazol. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 44, p. 29-37, 2002.

CANÇADO, J.P. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benznidazol. In: BRENER, Z. *et al.* **Trypanossoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p.389-405.

CASTRO, C.; MACEDO, V.O.; REZENDE, J.M.; PRATA, A. Estudo radiológico longitudinal do esôfago em área endêmica da doença de Chagas, em um período de 13 anos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, n. 27, p.227-233, 1994.

CELESTE, A.N. SILVEIRA; EDWIN, C.; CLEUDSON, C. Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, n.2, 2000.

CHUNG, M. C. *et al.* Synthesis and *in vitro* antichagasic activity of hidroximetilnitrofurazone, a produg of nitrofurazone, **Bioorg. Med. Chem**, v.11 p. 4779-4783, 2003.

CHUNG, M.C. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos**. 1996. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, são Paulo.

CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.41, n.2, p.155-180, 2005.

CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. O processo de latenciação no desenvolvimento de fármacos. **Quím. Nova**, v.22, n.1, p. 75-84, 1999.

CHUNG, M.C. *et al.* Synthesis and in vitro activity of dipeptide prodrugs of primaquine potentially antichagasic. **Pharm. Sci.**, v.86, n.10, p.1127-1131, 1997.

ANVISA - Conselho Nacional de Saúde, **resolução CNS n° 251/97** de 05 de agosto de 1997.

COURA J.R.; DE ABREU L.L.; WILLCOX H.P.; PETANA W. Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.30, p.139-144, 1997.

COURA, J.R; CASTRO, S.L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, n.1, p.3-24, 2002.

CROFT, S. Pharmacological approaches to antitrypa-nosomal chemotherapy. **Mem. Inst. Osw. Cruz.**, n.94, p. 215-220, 1999.

DIAS, J.C.P. Acute Chagas Disease. **Mem. Inst. Osw. Cruz.**, v. 79, p.85-79, 1984.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: epidemiologia e prevenção. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 63, p.451-455, 1994.

DIAS J.C.P.; JATENE A.D. Doença de Chagas no Brasil - Situação atual e perspectivas. **Ver. Soc. Brás. Med. Trop.**, v. 25, p. 6-8, 1992.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: clínica e terapêutica. Brasília-DF, **Ministério da Saúde**, SUCAM, 1990.

DIAS, J.C.P., COURA, J. R. Epidemiologia. Em: DIAS, J.C.P., COURA, J. R. (eds). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ editora, 1997, p.33-66.

DIAS, J.C.P., VINHAES M.C. Doença de Chagas no Brasil. **Caderno Saúde Pública**, v.16, supl.2, p. 7-12, 2000.

EDWARDS, D.I. Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms I. Mechanisms of action. **J. Antimicrob. Chemother.**, n. 31, p. 9-20, 1993.

FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil, **Caderno de Saúde Pública**, v.14, 1980.

FRIIS,G.J.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORDS, T.; MADSEN, U.A. **A textbook of drugs design and development.**, 2.ed. Harwood: Academic Publishers, 1996.

GUIDO, R. V. C. *et al.* Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofural (nitrofurazona). **Rev. Cien. Farm.**, v. 22, n.2, p. 319-333, 2001.

HAN, H.K.; AMIDON, G.L. Targeted prodrug design to optimize drug delivery. **AAPS Pharm. Sci.**, v.2., p.e6, 2000.

HENDERSON, G.B. *et al.* "Subversive" substrates for the enzyme trypanotione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of chagas disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.85, p. 5374-5378, 1988.



HIRAKU, Y. *et al.* Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA damage and cell proliferation. **Cancer Lett**, n. 215(2), p.141-50, 2004.

JANINI, P.; FILHO JANINI, P. **Interpretação Clínica do Hemograma**, 10<sup>o</sup> ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

JOCKERS-SCHRÜBL, M.C.; SCHIMER, R.H.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Trypanothione reductase from *T. cruzi*; catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. **Eur. J. Biochem.**, v.180, p. 267-272, 1989.

KEDDERIS, G.L.; MIWA, G.T. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. **Drug. Met. Rev.**, n. 19, p.33-62, 1988.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001/2002.

KOROLKOVAS, A. **Essencial of medicinal chemistry**. 2.ed, New York: Wiley-Interscience, 1988, p.579-670.

KRANTZ, J.C., EVANS, W.E. A contribution to the pharmacology of 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, n.85, p.324-331, 1945.

KRAUTH-SIEGEL, R.L.; INHOFF, O. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. **Res. Parasitol.**, v.90, p.S77-S85, 2003.

LARANJA F. S.; DIAS E, NÓBREGA G.; MIRANDA A. Chagas' Disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. **Circulation**, v. 14, p. 1035-1060. 1956.

MARQUES, F. Estudo confirma uma forma diferente de transmissão da doença de Chagas, Agência Fiocruz de Notícias, **Fiocruz**, 2005. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/ccs/especiais/chagas/chagas\\_fer.htm](http://www.fiocruz.br/ccs/especiais/chagas/chagas_fer.htm)>. Acessado em: 28 agosto 2005

MENÉNDEZ, J.C., AVENDAÑO, M.C. Diseño de fármacos por modulación de su farmacocinética. Estrategias y aplicaciones. In: AVENDAÑO, M.C. **Introducción A La Química Farmaceutica**. McGraw-Hill, 2000, p. 197-227.

MILLS, T., ROBERSON, J. C. **Instrumental Data for Drug Analysis**, 2º ed., Elsevier, v. 3, 1987, p. 1628-1629.

MIYAJI, T. Acute and chronic toxicity of furylfuramide in rats and mice. **J Exp. Med.**, n. 103, p. 331-369, 1971.

MORGAREIDGE, K. Acute toxicity studies on gum Arabic. **Unpublished. Food and Drug Research Laboratories**, Inc. Contract No. FDA 71-260. Submitted to the World Health Organization by the US Food and Drug Administration, 1972.

NTP, Toxicology and carcinogenesis studies of nitrofurazone (CAS No. 59-87-0) in F344/N rats and B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> mice. **Technical Report Series**, n. 337. US Department of Health and Human Services, Public Health Service/National Institutes of Health National Toxicology Program 1988.

PRATA, A. R. **Situação e Perspectivas do Controle das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. In: Documento elaborado pelo grupo de

pesquisadores convidados pelo ministério da saúde para a discussão e análise do combate à doença de Chagas pela SUCAM. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, 1981, p. 317 – 319.

RACHEL, L. Do caldo de cana ao suco de açai (Parte I). JORNAL DA UNICAMP, **Campinas**, 2005. Disponível em [http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/jornalPDF/ju283pag02.pdf](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju283pag02.pdf);, Acesso em: julho/2005).

SANTOS, N.C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.;SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects. **Biochem. Pharmacol.**, v.65, p.1035–1041, 2003.

SCHUMUNIS, G.A. A Tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In BRENER, Z. *et al.* **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SILVEIRA A.C. Profilaxia. In: BRENER, Z. *et al.* **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 75-87, 1999.

SILVEIRA. A.C.; REZENDE, D.F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, v. 29, p.5-28, 1994.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6ª. ed., Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SMITH, C.G.; GRADY, J.E.; NORTHAN, J.I. Relationship between cytotoxicity *in vitro* and whole animal toxicity. **Cancer Chemotherapy Reports**, n.20, p. 9-12, 1963

SOUZA, W.O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z. *et al.* **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 88-123.

STORINO, R.; MILEI, J. **Enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Mosby Editora, 1994, p. 652.

STREIGER, M.L.; BARCO, M.L. del; FABBRO, D.L. *et al.* Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, n.5, p.365-375, 2004.

SZAJNMAN, S.H.; YAN, W.; BAILEY, B. N.; DOCAMPO, R.; ELHALEM, E.; RODRÍGUEZ, J.B. Design and Synthesis of Aryloxythyl Thiocyanate Derivatives as Potent Inhibitors os trypanosoma cruzi Proliferation. **J. Med Chem.**, v. 43, p. 1826-1840, 2000.

TESTA, B. Drug Metabolism. WOLF, M.E. (ed.) **Burger's medicinal chemistry and drug discovery**. 5° ed. New York: John Wiley & Sons, cap. 6, 1995, p.129-180.

THRALL M. A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, cap.16 and 31.

TRACY, J.W.; WEBSTER J.R., Chemoterapy of parasitic infections. In: HARDMAN, J.G. *et al*, (Eds). GOODMAN & GILMAN'S. **The pharmacological bases of therapeutics**. 10<sup>th</sup> ed. New York: McGraw Hill, 2001, p. 1097-1120.

TROUILLER P. *et al*, "**Neglected diseases and pharmaceuticals: between deficient market and public health failure**" no prelo, 2001.

VINHAES, M.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil, **Caderno Saúde Pública**, v.16, sup.2, p.7-12, 2000.

WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.M.; RASSI, A. Chagas disease (American tripanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. **ISTB – SBHH** (Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia), 1992.

WERMUTH, C.G.; GAIGNAULT, J.C.; MARCHANDEAU, C. Designing prodrugs and bioprecursors I: Carrier Prodrugs. In: **The Practice of Medicinal Chemistry**. WERMUTH, C. G. London: Academic, 1996, p 671.

WHO, "Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Fortieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives" **WHO Tech. Rep.**, n.832, p.37:40, 1993.

WHO, Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva, **WHO Tech. Rep.**, series 905, p.109, 2002.

WOLFF, M.E. **Burger's medicinal chemistry and drug discovery. Principles and practice**. New York: John Wiley & Sons., v.1, 1995, p.1064.



## ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Toxicidade aguda do nitrofural  | 17 |
| <b>Tabela 2</b> - Bandas de absorção do espectro de infravermelho do nitrofural (NF)  | 40 |
| <b>Tabela 3</b> - Bandas de absorção do espectro de infravermelho do Hidroximetinitrofural (NFOH)   | 41 |
| <b>Tabela 4</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz) do pro-fármaco NFOH em DMSO $d_6$   | 43 |
| <b>Tabela 5</b> - Solubilidade do NF e NFOH em diferentes solventes   | 48 |
| <b>Tabela 6</b> - Resumo dos resultados dos testes de toxicidade aguda  | 49 |
| <b>Tabela 7</b> - Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via oral no ensaio de toxicidade aguda do NFOH em camundongos                  | 51 |
| <b>Tabela 8</b> - Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via intraperitoneal no ensaio toxicidade aguda do NFOH em camundongos          | 51 |
| <b>Tabela 9</b> - Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via intraperitoneal no ensaio toxicidade aguda do NF em camundongos            | 52 |
| <b>Tabela 10</b> - Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via oral no ensaio toxicidade aguda do NF (solvente DMSO) em ratos            | 55 |
| <b>Tabela 11</b> - Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via oral no ensaio toxicidade aguda do NFOH (solvente DMSO) em ratos          | 56 |
| <b>Tabela 12</b> - Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via oral no ensaio toxicidade aguda do NF (solvente goma arábica) em ratos    | 59 |
| <b>Tabela 13</b> - Porcentagem de mortalidade obtida nas diferentes doses administradas por via oral no ensaio toxicidade aguda do NFOH (suspensão goma arábica) em ratos | 60 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 14</b> - Porcentagem de mortalidade NFOH e NF após 28 dias de tratamento | 61 |
| <b>Tabela 15</b> - Peso corporal no início e após 28 dias de tratamento            | 62 |
| <b>Tabela 16</b> - Leucograma dos camundongos após 28 dias de tratamento           | 64 |
| <b>Tabela 17</b> - Eritograma dos camundongos após 28 dias de tratamento           | 66 |
| <b>Tabela 18</b> - Perfis bioquímicos de NF e NFOH após 28 dias de tratamento      | 68 |
| <b>Tabela 19</b> - Porcentagem de mortalidade NFOH após 60 dias de tratamento      | 72 |
| <b>Tabela 20</b> - Peso corporal no início e após 60 dias de tratamento            | 73 |
| <b>Tabela 21</b> - Eritograma dos camundongos após 60 dias de tratamento           | 73 |
| <b>Tabela 22</b> – Perfil bioquímico de NFOH após 60 dias de tratamento            | 74 |



## ÍNDICE DE FIGURAS, ESPECTROS E GRÁFICOS.

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Distribuição geográfica da doença de Chagas   | 3  |
| <b>Figura 2</b> - <i>Triatoma infestans</i> : inseto transmissor da doença de Chagas  | 4  |
| <b>Figura 3</b> - Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> .   | 5  |
| <b>Figura 4</b> - Paciente com sinal de Romaña (chagoma de inoculação)  | 10 |
| <b>Figura 5</b> - Tripanomicidas em uso   | 11 |
| <b>Figura 6</b> - Redução de tripanotiona dissulfeto para ditiol<br>tripanotiona pela enzima tripanotiona redutase  | 13 |
| <b>Figura 7</b> - Estrutura do nitrofural (nitrofurazona)   | 14 |
| <b>Figura 8</b> - Ativação por redução de compostos Nitroaromaticos   | 16 |
| <b>Figura 9</b> - Mecanismo proposto de dano ao DNA e indução de<br>carcinogênese pelo nitrofural   | 18 |
| <b>Figura 10</b> - Alguns dos problemas que limitam a utilização de<br>um fármaco   | 23 |
| <b>Figura 11</b> -Efeito de 5 µM NF, 10 µM NF, 5 µM NFOH e 10 Mm Bz<br>(benznidazol) em porcentagem de <i>amastigotas</i> em 6, 7, 8, 12, 14 e<br>15 dias depois da infecção das células com formas <i>amastigotas</i> de <i>T. cruzi</i>         | 24 |
| <b>Figura 12</b> - Efeito de 5 µM NF, 10 µM NF, 5 µM NFOH e 10 µM Bz<br>(benznidazol) em porcentagem de <i>tripomastigotas</i> em 6, 7, 8, 12, 14 e15<br>dias depois da infecção das células com formas <i>tripomastigotas</i> de <i>T. cruzi</i> | 24 |
| <b>Figura 13</b> - Atividade mutagênica ( <i>S. Typhimurium</i> cepa TA98)<br>do hidroximetilnitrofural em comparação ao nitrofural em ensaios<br>com e sem ativação metabólica (S9)  | 26 |
| <b>Figura 14</b> - Atividade mutagênica ( <i>S. Typhimurium</i> cepa TA102)<br>do hidroximetilnitrofural em comparação ao nitrofural em ensaios<br>com e sem ativação metabólica (S9)   | 26 |
| <b>Figura 15</b> - Esquemas de rotas de síntese para formação de bases de<br>Mannich  | 47 |
| <b>Espectro 1</b> - Espectro no infravermelho do nitrofural (NF)(KBr)   | 42 |
| <b>Espectro 2</b> - Espectro no infravermelho do hidroximetilnitrofural<br>(NFOH) (KBr)   | 43 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Espectro 3</b> - Espectro de RMN – $^1\text{H}$ em DMSO- $\text{d}_6$ do NFOH(400MHz)                                  | 44 |
| <b>Espectro 4</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ em DMSO- $\text{d}_6$ NFOH (100MHz)                                   | 44 |
| <b>Espectro 5</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ em DMSO- $\text{d}_6$ do NF (400MHz)                                     | 46 |
| <b>Espectro 6</b> - Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ em DMSO- $\text{d}_6$ do NF (400MHz)                                 | 46 |
| <b>Gráfico 1</b> - Relação dose-resposta no teste de toxicidade aguda com NFOH em camundongos, via intraperitoneal.       | 55 |
| <b>Gráfico 2</b> - Relação dose-resposta no teste de toxicidade aguda com NF, em camundongos, via intraperitoneal.        | 55 |
| <b>Gráfico 3</b> - Relação dose-resposta no teste de toxicidade aguda com NFOH (DMSO), em ratos, via oral.                | 59 |
| <b>Gráfico 4</b> - Relação dose-resposta no teste de toxicidade aguda com NF suspensão goma arábica), em ratos, via oral. | 61 |
| <b>Gráfico 5</b> - Leucograma dos camundongos após 28 dias de tratamento  | 67 |
| <b>Gráfico 6</b> - Eritograma dos camundongos após 28 dias de tratamento  | 69 |
| <b>Gráfico 7</b> - Níveis de Alanina Aminotransferase (ALT) do soro dos camundongos após 28 dias de tratamento            | 71 |
| <b>Gráfico 8</b> - Níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) do soro dos camundongos após 28 dias de tratamento          | 72 |
| <b>Gráfico 9</b> - Níveis de Albumina do soro dos camundongos após 28 dias de tratamento                                  | 73 |
| <b>Gráfico 10</b> - Eritograma dos camundongos após 60 dias de tratamento   | 76 |
| <b>Gráfico 11</b> - Níveis de Alanina Aminotransferase (ALT) do soro dos camundongos após 60 dias de tratamento           | 77 |
| <b>Gráfico 12</b> - Níveis de Aspartato Aminotransferase do soro dos camundongos após 60 dias de tratamento               | 78 |
| <b>Gráfico 13</b> - Níveis de Albumina do soro dos camundongos após 60 dias de tratamento                                 | 79 |