

RESSALVA

Alertamos para ausência dos Anexos não incluídos pelo(a) autor(a) no arquivo original.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GRUPO NITRO NA ATIVIDADE
ANTICHAGÁSICA E MUTAGÊNICA DO CANDIDATO A FÁRMACO
HIDROXIMETILNITROFURAL (NFOH)**

PRISCILA LONGHIN BOSQUESI

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

ARARAQUARA - SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GRUPO NITRO NA ATIVIDADE
ANTICHAGÁSICA E MUTAGÊNICA DO CANDIDATO A FÁRMACO
HIDROXIMETILNITROFURAL (NFOH)**

PRISCILA LONGHIN BOSQUESI

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.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

ARARAQUARA - SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

B744a Bosquesi, Priscila Longhin
Avaliação da presença do grupo nitro na atividade antichagásica e mutagênica do candidato a fármaco hidroximetilnitrofural (NFOH). / Priscila Longhin Bosquesi. – Araraquara, 2009.
123 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Chung Man Chin

. 1. Hidroximetilnitrofural (NFOH). 2. Bioisósteros. 3. Mutagenicidade.
4. Química farmacêutica . I. Chung Man Chin, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

CANDIDATA: PRISCILA LONGHIN BOSQUESI

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GRUPO NITRO NA ATIVIDADE
ANTICHAGÁSICA E MUTAGÊNICA DO CANDIDATO A FÁRMACO
HIDROXIMETILNITROFURAL (NFOH).**

A comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 20 de maio de 2009, considera a candidata:

☒ (X) APROVADA

☐ () REPROVADA

1) Examinadora: (Profa. Dra. Ivone Carvalho)_____

2) Examinadora: (Profa. Dra. Márcia da Silva)_____

3) Presidente: (Profa. Dra. Chung Man Chin) _____

*“A experiência dos erros é tão importante quanto à
experiência dos acertos por que vistos de um jeito certo,
os erros, nos preparam para nossas vitórias e conquistas futuras.
Não há aprendizado na vida que não passe pela experiência dos erros”*

Pe. Fábio de Melo

“A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante”.

(Paulo Coelho)

*Aos meus pais José Wanderlei e Zilda,
que eu amo tanto, e que um dia sonharam e
hoje compartilham comigo este importante momento.
Obrigada pela oportunidade, pelo apoio, incentivo, suporte,
confiança e amor incondicional.*

*A minha irmã Camila, pelo amor,
compreensão e por ser simplesmente maravilhosa.*

A minha avó Lourdes pelas orações, carinho e amor.

*Ao meu querido José Ricardo, pelo companheirismo,
cumplicidade, afeto, carinho, paciência e amor em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho em muito se deve à colaboração e apoio de diversas pessoas, as quais transmito os mais sinceros agradecimentos:

À Deus e Nossa Senhora, em primeiro lugar, por terem me dado força, ânimo, sabedoria e pela graça de terem me permitido concluir este trabalho.

Aos meus pais, José Wanderlei e Zilda, pelo amor incondicional, compreensão, força, estímulo e participação em todos os momentos difíceis.

À minha irmã Camila, pela alegria, amor e carinho.

Ao meu namorado José Ricardo, que esteve presente em todos os momentos da realização deste trabalho, por todo amor, carinho, dedicação, cuidado e paciência.

À todos os meus familiares e amigos que estiveram presentes durante esta jornada.

À minha orientadora, Prof. Dra. Chung Man Chin, pelos ensinamentos, amizade, apoio, respeito e incentivo em todos os momentos da realização desse trabalho. Agradeço a oportunidade que me foi dada.

À Profa. Dra. Eliana Varanda pela confiança, abrindo as portas de seu laboratório, por toda atenção, dedicação e por sua participação ativa e grande contribuição a este durante a qualificação.

À Profa. Dra. Adélia Emília de Almeida pela força, amizade e contribuição durante este trabalho, inclusive na qualificação.

À Profa. Dra. Márcia da Silva, pelo carinho, amizade e contribuição na etapa final deste trabalho.

À Profa. Dra. Ivone Carvalho, por suas considerações pertinentes durante a defesa.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa e à Funcionária Maria Zenaide Tita Fernandes, pelo uso do microscópio de fluorescência, pelo apoio e colaboração.

À Prof. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli e sua mestrandia Gabriela Duó Passerini pela colaboração na avaliação da atividade antichagásica dos compostos.

À Profa. Dra. Raquel Regina Duarte e ao Técnico Luiz Eduardo dos Santos pela amizade, e apoio.

Aos colegas de laboratório, Renato Menegon, Lorena Blau, Ednir Vizioli, Eliana Serafim e todos os estagiários pela convivência e amizade. Agradeço em especial ao meu

amigo Jean Leandro Santos pela atenção, paciência e ensinamentos durante todos os momentos da realização deste trabalho.

Aos técnicos Osmar e Mateus, agradeço a atenção, disponibilidade e toda a ajuda prestada sempre que necessário.

À seção de Pós-Graduação, especialmente à Cláudia, Sônia e Laura, pela ajuda paciência e valiosas orientações.

À toda equipe da biblioteca da FCF (UNESP), pelo auxílio na aquisição do material bibliográfico;

À FAPESP pela credibilidade no projeto, bolsa concedida e apoio financeiro.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xiv
LISTA DE ESPECTROS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
2.1 Objetivo geral.....	04
2.2 Objetivo específico.....	04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
3.1 Doença de Chagas.....	05
3.2 Ciclo evolutivo e vias de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i>	07
3.3 Manifestações clínicas.....	11
3.4 Tratamento da doença de Chagas.....	13
3.5 Compostos nitro-heterocíclicos com atividade na doença de Chagas.....	15
3.6 Nitrofural e hidroximetilnitrofural.....	16
3.7 Toxicidade dos nitrofuranos.....	21
3.8 Planejamento de novos fármacos.....	25
3.9 A importância da avaliação da genotoxicidade dos fármacos.....	28
3.10 Teste de micronúcleo.....	30

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Reagentes e solventes.....	32
4.2 Metodologia de síntese.....	32
4.3 Métodos analíticos.....	34
4.3.1 Análise cromatográfica em camada delgada.....	34
4.3.2 Determinação da faixa de fusão.....	34
4.3.3 Análise de espectrofotometria de absorção no infravermelho (I.V.).....	34
4.3.4 Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono.....	35
4.4 Ensaios Biológicos.....	35
4.4.1 Avaliação da atividade antichagásica dos compostos sintetizados.....	35
4.4.2 Teste do micronúcleo para avaliação da atividade clastogênica e aneugênica.....	35
5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	37
5.1 Procedimentos de síntese.....	37
5.1.1 Síntese do 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida.....	37
5.1.2 Síntese do [5-(metilsulfonyl)furan-2-carbaldeído].....	37
5.1.3 Síntese do 1-[{5-(metilsulfonyl)furan-2-il}metileno]semicarbazida.....	38
5.1.4 Síntese do 1-[{5-(hidroximetil)furan-2-il}metileno]semicarbazida.....	39
5.1.5 Síntese do 1-[{5-(carboxil)furan-2-il}metileno]semicarbazida.....	39
5.1.6 Preparação do hidroximetilnitrofural (NFOH).....	40
5.2 Avaliação da atividade antichagásica dos compostos sintetizados.....	40
5.2.1 Cultivo das formas epimastigotas de <i>Trypanossoma cruzi</i>	40
5.2.2 Padronização do método colorimétrico utilizando MTT.....	41
5.3 Ensaio de mutagenicidade do BNZ, NF e NFOH através do teste de micronúcleo.....	42
5.3.1 Preparo das lâminas com laranja de acridina (acridine orange).....	44
5.3.2 Obtenção do sangue e preparo das células.....	44
5.3.3 Análise estatística dos resultados.....	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46

6.1 Síntese dos compostos 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (1), 1-[{5-(metilsulfonyl)furan-2-il}metileno]semicarbazida (3) e 1-[{5-(hidroximetil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (4).....	46
6.1.1 Síntese do 1-((furan-2-il)metileno)semicarbazida (1).....	47
6.1.1.1 Espectrofotometria no infravermelho.....	48
6.1.1.2 Espectrometria de RMN ¹ H e RMN ¹³ C.....	50
6.1.2 Síntese do 1-[{5-(metilsulfonyl)furan-2-il}metileno]semicarbazida (3).....	54
6.1.2.1 Espectrofotometria no infravermelho.....	55
6.1.2.2 Espectrometria de RMN ¹ H e RMN ¹³ C.....	58
6.1.3 Síntese do 1-[{5-(hidroximetil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (4).....	62
6.1.3.1 Espectrofotometria no infravermelho.....	62
6.1.3.2 Espectrometria de RMN ¹ H e RMN ¹³ C.....	64
6.2 Síntese do 1-[{5-(carboxil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (5).....	67
6.2.1 Espectrofotometria no infravermelho.....	67
6.2.2 Espectrometria de RMN ¹ H e RMN ¹³ C.....	69
6.3 Avaliação da atividade antichagásica dos compostos sintetizados.....	72
6.4 Síntese do hidroximetilnitrofural.....	74
6.4.1 Espectrofotometria no infravermelho.....	75
6.4.2 Espectrometria de RMN ¹ H e RMN ¹³ C.....	77
6.5 Avaliação da mutagenicidade do NF, NFOH e BNZ através do teste de micronúcleo....	80
7. CONCLUSÕES.....	90
8. PERSPECTIVAS.....	91
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXO.....	104

ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
BNZ	Benznidazol
CCD	Cromatografia em camada delgada
CMC	Carboximetilcelulose
DCA	Doença de Chagas aguda
DNDi	Drugs for Neglected Diseases
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DMF	Dimetilformamida
FDA	Food and Drug Administration
IARC	International Agency for Research on Cancer
JEFCA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
MSF	Médico Sem Fronteiras
MN	Micronúcleo
MNRET	Reticulócito micronucleado
NF	Nitrofural
NFOH	Hidroximetilnitrofural
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Peso Corpóreo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SN	Substituição nucleofílica
SP	Substância protótipo
Vd	Volume de distribuição

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição geográfica da doença de Chagas.....	06
Figura 2	Barbeiro (<i>Triatoma infestans</i>): inseto transmissor da doença de Chagas.....	06
Figura 3	Ciclo evolutivo do <i>Trypanossoma cruzi</i>	07
Figura 4	<i>Trypanossoma cruzi</i> – forma tripomastigota.....	08
Figura 5	<i>Trypanossoma cruzi</i> – forma epimastigota.....	09
Figura 6	<i>Trypanossoma cruzi</i> – forma amastigota.....	09
Figura 7	Edema de pálpebras (Sinal de Romana).....	11
Figura 8	Coração de pacientes que desenvolveram doença de Chagas e morreram por: (A) morte súbita (B) megacólon ou mega-esôfago (C) insuficiência cardíaca congestiva (ICC)	13
Figura 9	Estrutura química dos compostos benznidazol (I), nifurtimox (II), furazolidona (III), metronidazol (IV), secnidazol (V), ornidazol (VI) e tinidazol VII) utilizados como anti-protozoários e antimicrobianos.....	16
Figura 10	Estrutura química do nitrofural.....	16
Figura 11	Estrutura química do hidroximetilnitrofural.....	17
Figura 12	Efeito de 5µM e 10µM de NF e NFOH; 10µM benznidazol (Bz) em porcentagem de <i>amastigotas</i> e <i>tripomastigotas</i> em 6, 7, 8, 12, 14, e 15 dias após a infecção das células com formas <i>amastigotas</i> e <i>tripomastigotas</i> de <i>T. cruzi</i> . Controle: 100% <i>mastigotas</i> e <i>tripomastigotas</i>	18
Figura 13	Atividade mutagênica (<i>S.typhimurium</i> cepa TA98) dos compostos NFOH e NF em ensaios com (+S9) e sem ativação metabólica (S9).....	19
Figura 14	Atividade mutagênica (<i>S.typhimurium</i> cepa TA102) dos compostos NFOH e NF em ensaios com (+S9) e sem ativação metabólica (S9).....	19
Figura 15	Possíveis mecanismos de mutagenicidade dos nitrofurânicos	22
Figura 16	Ativação por redução de compostos nitroaromáticos.....	23
Figura 17	Mecanismo proposto de dano ao DNA e indução de carcinogênese pelo nitrofural.....	25
Figura 18	Reticulócito micronucleado (coloração: Acridine Orange; 1000 x).....	31

Figura 19	Mecanismo de reação da formação de iminas.....	33
Figura 20	Reticulócito micronucleado (coloração: Acridine Orange; 1000 x).....	36
Figura 21	Mecanismo de reação de formação dos compostos 1, 3 e 4, onde R= H (1); CH ₃ SO ₂ (3); CH ₂ OH (4).....	47
Figura 22	Mecanismo de reação de substituição nucleofílica SN ₂	54
Figura 23	Mecanismo de reação do 1-[5-(carboxil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (5).....	67
Figura 24	Mecanismo da reação de formação do NFOH, em meio básico.....	74
Figura 25	Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com ciclofosfamida (controle positivo), CMC/Tween (controle negativo) e água (controle branco)..	83
Figura 26	Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses de NF.....	84
Figura 27	Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses de NFOH.....	84
Figura 28	Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com o fármaco benznidazol.....	85
Figura 29	Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 50 mg/kg de BNZ, NF e NFOH.....	86
Figura 30	Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 100 mg/kg de BNZ, NF e NFOH.....	86
Figura 31	Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 250 mg/kg de BNZ, NF e NFOH.....	87
Figura 32	Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 500 mg/kg de BNZ, NF e NFOH.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Principais efeitos colaterais observados no tratamento específico da doença de Chagas.....	15
Tabela 02	Resultados do teste de toxicidade aguda dos fármacos NF e NFOH.....	20
Tabela 03	Bioisósteros clássicos e bioisósteros não clássicos.....	27
Tabela 04	Valores de absorção no infravermelho para os reagentes furfural e cloridrato de semicarbazida, e o composto 1.....	50
Tabela 05	Deslocamentos químicos de RMN ^1H do furfural, cloridrato de semicarbazida e composto 1, e RMN ^{13}C do composto 1 (DMSO_{d6} , 300 MHz para ^1H e 400 MHz para ^{13}C).....	52
Tabela 06	Valores de absorção no infravermelho para o reagente 5-bromo-2-furfural e para os compostos 2 e 3.....	57
Tabela 07	Deslocamentos químicos de RMN ^1H do reagente 5-bromo-2-furfural, do composto 2 e do composto 3, e RMN ^{13}C do composto 3 (DMSO_{d6} , 300 MHz para ^1H e 400 MHz para ^{13}C).....	60
Tabela 08	Valores de absorção no infravermelho para o reagente hidroximetilfurfural e o composto 4.....	63
Tabela 09	Deslocamentos químicos de RMN ^1H do reagente hidroximetilfurfural e composto 4, e RMN ^{13}C do composto 4 (DMSO_{d6} , 300 MHz para ^1H e 400 MHz para ^{13}C).....	65
Tabela 10	Valores de absorção no infravermelho para os compostos 4 e 5.....	68
Tabela 11	Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos 4 e 5 (DMSO_{d6} , 300 MHz para ^1H e 400 MHz para ^{13}C).....	70
Tabela 12	Resultados da atividade antichagásica dos compostos isósteros de NF.....	72
Tabela 13	Valores de absorção no infravermelho para o NF e NFOH.....	76
Tabela 14	Deslocamentos químicos de RMN ^1H e de ^{13}C do NF e NFOH (DMSO_{d6} , 300 MHz para ^1H e 400 MHz para ^{13}C).....	80
Tabela 15	Número de células micronucleadas por animal, média e desvio padrão (SD)....	82

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01	Síntese do 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (1).....	37
Esquema 02	Síntese do [5-(metilsulfonil)furano-2-carbaldeído] (2).....	37
Esquema 03	Síntese do 1-[{5-(metilsulfonil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (3).....	38
Esquema 04	Síntese do 1-[{5-(hidroximetil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (4).....	39
Esquema 05	Síntese do 1-[{5-(carboxil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (5).....	39
Esquema 06	Síntese do NFOH.....	40

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 01	Espectro no infravermelho do reagente furfural.....	48
Espectro 02	Espectro no infravermelho do reagente cloridrato de semicarbazida.....	48
Espectro 03	Espectro no infravermelho do 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (1)....	49
Espectro 04	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do reagente furfural....	50
Espectro 05	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do reagente cloridrato de semicarbazida.....	51
Espectro 06	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (1).....	53
Espectro 07	Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (1).....	53
Espectro 08	Espectro no infravermelho do reagente 5-bromo-2-furfural.....	55
Espectro 09	Espectro no infravermelho do [5-(metilsulfonyl)furan-2-carbaldeído] (2)...	56
Espectro 10	Espectro no infravermelho do 1-[(5-(metilsulfonyl)furan-2-il)metileno]semicarbazida (3).....	57
Espectro 11	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do reagente 5-bromo-2-furfural.....	58
Espectro 12	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do [5-(metilsulfonyl)furan-2-carbaldeído] (2).....	59
Espectro 13	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(5-(metilsulfonyl)furan-2-il)metileno]semicarbazida (3).....	61
Espectro 14	Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(5-(metilsulfonyl)furan-2-il)metileno]semicarbazida (3).....	61
Espectro 15	Espectro no infravermelho do reagente hidroximetilfurfural.....	62
Espectro 16	Espectro no infravermelho do 1-[(5-hidroximetil)furan-2-il)metileno]semicarbazida (4).....	63
Espectro 17	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do reagente hidroximetilfurfural.....	64

Espectro 18	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(5-hidroximetil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (4).....	66
Espectro 19	Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(5-hidroximetil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (4).....	66
Espectro 20	Espectro no infravermelho do 1-[(5-(carboxil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (5).....	68
Espectro 21	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(5-(carboxil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (5).....	71
Espectro 22	Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(5-(carboxil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (5).....	71
Espectro 23	Espectro no infravermelho do nitrofural (NF).....	75
Espectro 24	Espectro no infravermelho do hidroximetilnitrofural (NFOH).....	76
Espectro 25	Espectro de RMN ^1H ampliado (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do fármaco nitrofural.....	77
Espectro 26	Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do fármaco nitrofural.....	78
Espectro 27	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do hidroximetilnitrofural.....	79
Espectro 27a	Espectro de RMN ^1H ampliado (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do hidroximetilnitrofural.....	79
Espectro 28	Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) hidroximetilnitrofural.....	79

Resumo

A doença de Chagas constitui um dos maiores problemas de Saúde Pública em países do cone sul das Américas. Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas e aproximadamente cento e vinte milhões estão sob risco de contaminação. No Brasil, apenas o benznidazol (BNZ) está disponível para o tratamento da doença, e apesar de seu uso clínico, este fármaco apresenta efeitos secundários indesejáveis, sendo ativo apenas na fase aguda da doença.

O nitrofural (NF) é ativo contra o *Trypanossoma cruzi*, entretanto, a alta toxicidade impede o seu uso na parasitose. O hidroximetilnitrofural (NFOH) é um pró-fármaco do nitrofural, que apresenta maior atividade contra *T. cruzi*, e, além disso, pesquisas vêm demonstrando menor toxicidade do NFOH quando comparado ao fármaco matriz, nitrofural. Resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda para o NFOH com camundongos e ratos, sugeriram baixa toxicidade deste, obtendo-se uma dose letal mediana (DL₅₀) maior em relação ao fármaco de partida, NF (556,3 mg/kg). Por via oral os resultados caracterizaram o NFOH como pouco tóxico, segundo a OMS com um valor de DL₅₀ acima de 2000mg/kg. No Teste de Ames os resultados indicaram que a latenciação do NF em NFOH foi capaz de diminuir a atividade mutagênica em aproximadamente quatro vezes, nos ensaios com (+S9) ou sem ativação metabólica (-S9), nas linhagens testadas.

Contudo, este trabalho avaliou a influência do grupo nitro na molécula de nitrofural, através da substituição deste grupo por isósteros do grupo nitro e também o potencial mutagênico dos fármacos NF e BNZ, e do candidato a fármaco NFOH empregando-se o teste de micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos.

A atividade dos compostos sintetizados neste trabalho modificou-se drasticamente, ou seja, os compostos não apresentaram atividade antichagásica nas formas epimastigotas em nenhuma das concentrações utilizadas. Entretanto, os resultados obtidos no ensaio de mutagenicidade através do teste de micronúcleo, sugerem que os fármacos, nas condições experimentais avaliadas, não possuem um potencial significativo para induzir danos ao DNA quando comparado ao grupo controle positivo, no entanto os fármacos NF e BNZ induziram de forma significativa um aumento na incidência de micronúcleos quando comparado aos grupos controle (negativo e água) e ao NFOH, demonstrando através dos resultados deste teste e de outros realizados anteriormente que o NFOH é um forte candidato a fármaco antichagásico.

Abstract

Chagas' disease is a major public health problem in countries of the southern cone of the Americas. It is estimated that 16 to 18 million people are infected and about hundred and twenty million are at risk of contamination. In Brazil, only benznidazole is available for the treatment of the disease, although its clinical use, this drug shows toxic side effects and is active only in the acute phase of illness.

The nitrofurazone (NF) is active against *Trypanosoma cruzi*, although, its high toxicity prevents it from being used in parasitosis. The hydroxymethylnitrofurazone (NFOH) is the nitrofurazone prodrugs that presents the highest level of activity against the *T. Cruzi*, fact which is supported by researches that have been evidentiating its less significant toxicity when compared to the matrix drug nitrofurazone. Results obtained in tests of acute toxicity to the NFOH with mice and rats, suggested that low toxicity, resulting in a median lethal dose (LD₅₀) more than in the drug of departure, NF (556,3 mg/kg). Orally NFOH characterized the results as somewhat toxic, according to the WHO with a value of LD₅₀ over 2000 mg/kg. In the Ames Test results indicate that NF latention in the NFOH was able to reduce the mutagenic activity in about 4 times in trials with (S9 +) or without metabolic activation (-S9), the strains tested.

However, this study evaluated the influence of nitro group in the molecule of nitrofurazone, by replacing this group by isosteric the nitro group and also the mutagenic potential of drugs NF and BNZ, and the drug candidate NFOH by using the test micronucleus test in cells in the peripheral blood of mice.

The activity of compounds synthesized in this work has changed dramatically, ie the compound showed no activity in epimastigotes antichagasic in any of the concentrations used. However, the results obtained in the testing of mutagenicity by the micronucleus test, suggest that the drugs under the experimental evaluated conditions, do not have a significant potential to induce damage to DNA when compared to positive control group. However the drugs NF and BNZ induced a significant increase in the incidence of micronucleus compared to control groups (negative and water), and NFOH, by showing the results of this test and others made earlier that the NFOH is a strong drug candidate antichagasic.

1 INTRODUÇÃO

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. Segundo o documento Desequilíbrio Fatal produzido pela organização Médicos Sem Fronteiras (MSF) e pelo Drugs for Neglected Diseases (DNDi) das 1393 novas drogas descobertas entre 1975 e 1999, apenas 13 destinaram-se a doenças negligenciadas - cerca de 1% - apesar de essas doenças representarem mais de 12% das enfermidades mundiais (TROUILLER et al., 2001; DNDi, 2004).

Cerca de 3,5 bilhões de indivíduos no mundo sofrem de algum tipo de infecções parasitárias causadas por protozoários ou helmintos patogênicos (TRACY, 2001; WHO/PAHO, 2008).

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana é uma das patologias de maior incidência e distribuição nas Américas (VINHAES, 2000). Descoberta em 1909 pelo médico e cientista brasileiro Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, a doença tem por agente causal o *Trypanosoma cruzi* um protozoário causador de um quadro inflamatório subcutâneo em torno do local da picada do seu vetor, sendo este encontrado desde o sul dos Estados Unidos à Argentina (DIAS, 2001; REY, 2001; BLACK, 2002).

A doença é uma antroponose e representa um dos mais sérios problemas médico-sanitários da América Latina. Nos 21 países endêmicos, estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas e aproximadamente cento e vinte milhões estão sob risco de contaminação (DIAS, 2001; WHO, 2008).

Clinicamente, a doença humana transcorre numa fase inicial aguda, caracterizada por febre, muitos parasitas circulantes e poucas semanas de duração, uma fase intermediária, seguindo-se uma fase crônica, afebril, com poucos parasitas no sangue e causadora de importantes alterações cardíacas e digestivas (danos principalmente no esôfago e intestino grosso) (DIAS, 1999). A morbi-mortalidade da doença de Chagas no Brasil é significativa, vitimando 25% ou mais dos indivíduos infectados, que adquirem cardiopatia chagásica crônica evolutiva (DIAS, 2000; SDR, 2008; SZAJNMAN et al., 2005). Estima-se que de 25-

30% dos indivíduos infectados terão seus quadros patológicos evoluídos para danos irreversíveis.

Apesar desta realidade, as respostas farmacológicas contra a doença de Chagas permanecem ainda insuficientes (BOIANI et al., 2008). Do ponto de vista terapêutico, apenas dois fármacos são disponíveis, o benznidazol (BNZ), um derivado nitroimidazol, e o nifurtimox, um nitrofurano; destes apenas o benznidazol é comercializado no Brasil uma vez que o nifurtimox apresenta problemas quanto ao fato de as cepas brasileiras de *Trypanosoma cruzi* serem resistentes ao mesmo, fato este, provocado principalmente devido à grande incidência da parasitose em nosso país (GÜIDO et al., 2001).

Frente à falta de medicamentos específicos para o tratamento da doença de Chagas e a elevada toxicidade dos quimioterápicos têm-se a necessidade de recorrer a novas alternativas terapêuticas para a obtenção de fármacos mais seguros e eficazes, principalmente para a fase crônica da doença.

A modificação molecular tem sido bastante promissora na introdução de novos fármacos na terapêutica (WERMUTH, 1996; BUNDGAARD, 1985), constituindo um desenvolvimento natural da química orgânica. 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 (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 (CHUNG et al., 2005).

Utilizando principalmente a latenciação de fármacos como estratégia de modificação molecular, Chung (1996) sintetizou uma série de pró-fármacos recíprocos de nitrofural (NF) e primaquina, tendo como grupo espaçantes aminoácidos e dipeptídeos. Como intermediário da síntese de base de Mannich entre o nitrofural e o dipeptídeo de primaquina obteve-se o derivado hidroximetilado do nitrofural (NFOH), o qual foi avaliado e mostrou-se o mais ativo de todos os derivados sintetizados tanto em formas amastigotas quanto em tripomastigotas no ensaio *in vitro*.

Outra estratégia empregada com sucesso no desenvolvimento de novos agentes bioativos fundamenta-se no bioisosterismo que refere-se a compostos ou subunidades estruturais de compostos bioativos que apresentem volumes moleculares, formas, distribuições eletrônicas e propriedades físico-químicas semelhantes, capazes de apresentar propriedades biológicas similares. É uma estratégia de modificação molecular de composto-protótipo, baseada na troca de determinado(s) fragmento(s) molecular (es), por exemplo, um grupamento funcional por outro que apresentem propriedades físico-químicas similares (BARREIRO, 2008).

Contudo, este trabalho avalia a influência do grupo nitro na molécula de nitrofural, através da substituição deste grupo por isósteros do grupo nitro e também o potencial mutagênico dos fármacos nitrofural e benznidazol, e do candidato a fármaco hidroximetilnitrofural, empregando-se o teste de micronúcleo em células de sangue periférico de camundongos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Uma vez que o grupo nitro tem sido associado aos efeitos tóxicos de fármacos, o presente trabalho tem como objetivo obter isómeros de nitrofural (NF), e avaliar possíveis danos cromossômicos causados pelo NF, NFOH e benznidazol (BNZ).

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção dos bioisómeros de NF:
1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida;
1-[(5-(metilsulfonyl)furan-2-il)metileno]semicarbazida;
1-[(5-hidroxi)metil)furan-2-il]metileno]semicarbazida;
1-[(5-(carboxil)furan-2-il)metileno]semicarbazida;
- Avaliação da atividade antichagásica *in vitro* dos compostos obtidos;
- Preparação de NFOH;
- Avaliação de possíveis danos cromossômicos causados pelo NF, NFOH e BNZ, empregando-se o teste de micronúcleo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas constitui-se pela sua vasta distribuição, altos índices de prevalência e gravidade de evolução, um dos maiores problemas de Saúde Pública em países do cone sul das Américas (DIAS, 2001; REY, 2001). A tripanossomíase americana, posteriormente denominada doença de Chagas em homenagem ao seu descobridor o pesquisador brasileiro Carlos Chagas, é uma importante doença parasitária resultante da infecção pelo protozoário parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, tendo insetos triatomíneos como vetores. As formas mais importantes de transmissão da doença de Chagas ainda são as vetoriais (seja via lesão resultante da picada, seja por mucosa ocular ou oral), contudo apresentam também importância epidemiológica a transmissão transfusional e congênita (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A doença é uma zoonose endêmica em 21 países, com estimativa de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*. Existente somente no continente Americano, está amplamente distribuída na América Central e Sul, estendendo-se do sul dos Estados Unidos até a Argentina (figura 01). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam 50.000 mortes/ano e cerca de 120 milhões de indivíduos ainda expostos ao risco de infecção (SZAJNMAN et al., 2005; WHO, 2008). Dados do Instituto Evandro Chagas, do período entre 1968 a 2000, registram 205 casos de doença de Chagas na Amazônia Brasileira, sendo 178 (86,8%) em fase aguda, entre os quais nove óbitos (PINTO et al., 2007).



Figura 01. Distribuição geográfica da doença de Chagas.

Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Doen%C3%A7a_de_Chagas (acesso em: 23/01/2008)

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 *T. infestans*, conhecido vulgarmente como “barbeiro” (figura 02), devido ao seu hábito de picar a face das pessoas (URBINA, 2003; WILLIAMS-BLANGERO, 2003; WHO, 2008).



Figura 02. Barbeiro (*Triatoma infestans*): inseto transmissor da doença de Chagas.

Fonte: <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTinf.html> (acesso em: 20/06/2008)

Embora eminentemente rural, a doença de Chagas representa um problema também para os centros urbanos. Admite-se que dos 3,4 milhões de infectados existentes no Brasil, 60% estejam vivendo no espaço urbano em grandes centros como Grande São Paulo (cerca de

300 mil) e Grande Belo Horizonte (cerca de 100 mil). A doença de Chagas é a terceira mais importante causa *mortis* entre as doenças infecciosas e parasitárias (13,6%) e o número absoluto de óbitos (cerca de 6.000/ano) ainda é muito relevante sendo que os estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e os da região Nordeste apresentam a mais alta endemicidade no Brasil (DIAS, 2000; RASSI, 1991).

3.2 Ciclo evolutivo e vias de transmissão do *Trypanosoma 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 03. São elas as seguintes formas evolutivas: *epimastigota* (encontrada no tubo digestivo do vetor), *trypomastigota* (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).

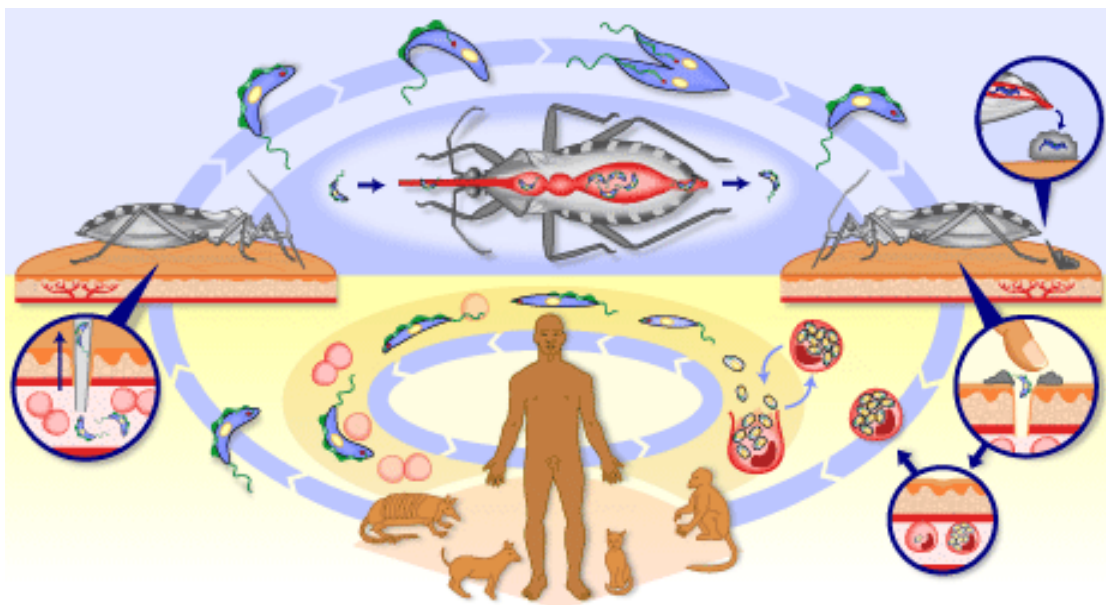


Figura 03. Ciclo evolutivo do *T. cruzi*.

Fonte: [http:// www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm) (acesso em: 20/06/2008).

O ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado inicia-se quando o sangue de animais infectados é ingerido durante o repasto sanguíneo. Ao chegar ao estômago, a forma *tripomastigota* (figura 04) 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.

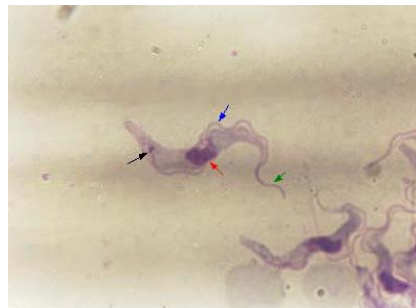


Figura 04. *Trypanosoma cruzi* - forma tripomastigota. Seta preta - cinetoplasto; vermelha - núcleo; azul - membrana ondulante; verde - flagelo.

Fonte: www.ucm.es/info/parasito/atlas.htm, (acesso em: 20/06/2008).

Em seguida, os parasitas migram para o intestino, onde se multiplicam como formas *epimastigotas* (figura 05), 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).



Figura 05. *Trypanosoma cruzi* – forma epimastigota – observa-se a presença do cinetoplasto próximo e anterior ao núcleo.

Fonte: www.ucm.es/info/parasito/atlas.htm, (acesso em: 20/06/2008).

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* (figura 06). Nesse estágio, os parasitas reproduzem-se por fissão binária (BRENER e CANÇADO, 1979; DIAS, 1990; SOUZA, 1999).

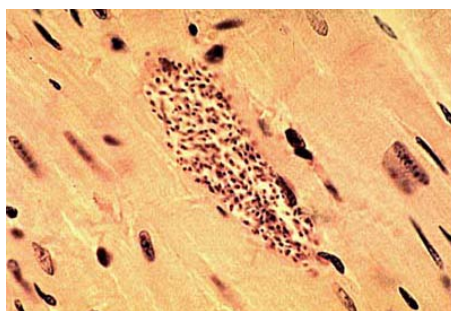


Figura 06. *Trypanosoma cruzi* – forma amastigota. Fibras musculares cardíacas (hematoxilina/eosina) infestadas pelo *T. cruzi*. Os amastigotas multiplicam-se, destroem o tecido e formam pseudocistos.

Fonte: http://www.who.int/tropical_diseases/databases/imagelib.pl?imageid=0005365, (acesso em: 20/06/2008).

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 por um novo agente vetor não contaminado e a ingestão de formas sanguíneas do parasita, junto com sangue do hospedeiro, essas se transformam em formas fusiformes denominadas epimastigotas. Estas se desenvolvem no aparelho digestivo do parasita e são transmitidas a outros indivíduos vertebrados por meio das excretas do inseto vetor contaminado ou se estabelecem em reservatórios naturais (BRENER e CANÇADO, 1979; DIAS, 1990; SZAJNMAN et al., 2005).

Além da propagação da doença de Chagas por dejeções de triatomíneos infectados pelo protozoário, outras vias são a transfusão sangüínea e a transmissão congênita, que ocorrem em uma proporção de 1 a 11% entre as mães chagásicas. Há ainda, relatos de contaminação durante transplantes de órgãos e infecção por ingestão do protozoário em alimentos contaminados. A infecção pelo parasita por via oral, pela ingestão de alimentos contaminados por fezes de triatomíneos, tais como: cana-de-açúcar, banana, milho, suco de açaí e feijão, pode ser também possível, bem como, pela ingestão de carne crua de animais infectados (TARTAROTTI et al., 2004; PÉREZ-GUTIÉRREZ et al, 2006).

A transmissão oral da doença de Chagas para seres humanos e outros mamíferos está demonstrada experimental, clínica e epidemiologicamente, significando hoje uma importante via de transmissão (ANVISA, 2008).

Em 2007, foram divulgadas quatro Notas Técnicas relatando casos de surtos ocorridos na região amazônica pela Secretaria de Vigilância em Saúde. De janeiro a outubro de 2007 foram notificados 100 casos de doença de Chagas Aguda (DCA), com 4 óbitos (letalidade de 4,0%) relacionados a surtos ocorridos em 11 municípios da região norte, sendo 1 município do estado do Amazonas, 1 município do estado do Amapá e 9 municípios do estado do Pará, sendo o alimento mais freqüentemente envolvido, o Açaí (ANVISA, 2008).

No ano de 2006, a forma oral foi identificada como de potencial risco para a Saúde Pública, houve a confirmação de 115 casos de DCA, na região Norte e Nordeste, sendo 94 casos de transmissão via oral, devido ao consumo na maioria dos casos de açaí contaminado. Registrou-se neste período também surto pela ingestão de bacaba e de cana-de-açúcar (ANVISA, 2008).

O risco de um receptor infectar-se via transfusão a partir de doador chagásico é de 12,5 a 27%. Estudos indicam que há cerca de 1% de prevalência da doença de Chagas entre os

doadores de sangue, porcentagem esta mantida devido aos critérios sorológicos dos hemocentros das grandes cidades (TARTAROTTI et al., 2004).

A doença de Chagas pode se dispersar também por migração de indivíduos chagásicos para regiões não endêmicas, pois aqueles transformam-se em potenciais doadores. Por exemplo, no Brasil, nas últimas três décadas, o número de pessoas infectadas nas áreas urbanas aumentou devido à migração de pessoas das áreas rurais. Desde meados de 1970, milhões de pessoas provenientes de lugares onde a doença de Chagas é endêmica têm imigrado para os Estados Unidos. Estimativas sugerem que há no mínimo 100.000 indivíduos infectados/ano neste país (TARTAROTTI et al., 2004; BATISTA et al., 2007).

3.3 Manifestações clínicas

A doença de Chagas pode se manifestar de forma aguda, indeterminada e crônica. Os primeiros sintomas da fase aguda se apresentam, geralmente, entre 7 a 10 dias após a infecção pelo parasita. No local de entrada do parasita ocorre um processo inflamatório, o qual nem sempre é visível. No entanto, em infecções pela mucosa ocular, observa-se um sinal característico da fase aguda da doença de Chagas, denominado sinal de Romanã (figura 07) e consiste no inchaço de ambas as pálpebras do olho infectado (NEVES, 2002).



Figura 07. Edema de pálpebras (Sinal de Romanã).

Fonte: <http://www.cpqrr.fiocruz.br>, (acesso em: 20/06/2008).

As manifestações gerais são: febre, mal-estar geral, dor de cabeça, perda do apetite, fraqueza, edema localizado ou generalizado, inchaço de gânglios linfáticos (adenopatia), hepatomegalia, esplenomegalia, alterações no eletrocardiograma, sinais de miocardite aguda, sinais de meningoencefalite (principalmente em crianças menores de dois anos). O comprometimento cardíaco é muito raro nesta fase da doença (WENDEL et al., 1992; GOLDMAUM et al., 2004). A fase aguda da doença pode durar de um mês a um ano, podendo o paciente evoluir para a fase crônica ou indeterminada.

A fase indeterminada trata-se de uma fase crônica com baixa parasitemia e alto teor de anticorpos, assintomática e sem manifestações clínicas. Após a fase aguda, a maioria dos pacientes evolui durante uma ou duas décadas nesta forma indeterminada, na qual, embora exista a infecção ativa, praticamente não há lesões clinicamente demonstráveis e os órgãos e sistemas se encontram preservados em sua anatomia e sua reserva funcional (DIAS, 2001).

Cerca de um terço dos casos agudos da doença de Chagas evolui para a fase crônica. A fase crônica da doença em alguns casos segue imediatamente o período agudo; em outros, instala-se depois de um intervalo assintomático de duração variável (REY, 2001; BLACK, 2002).

A importância do parasita como agente patogênico na forma crônica da doença de Chagas tomou grande impulso nas últimas décadas. Recentemente foram descobertos e estudados especialmente por pesquisadores do Triângulo Mineiro, sítios onde aparentemente o *Trypanosoma cruzi* se oculta. O *T. cruzi* tem seu habitat no interior da célula e na infecção crônica multiplica-se lentamente. Após algum tempo rompe-se a membrana celular sendo lançados na corrente sanguínea novos parasitos que aí permanecem algum tempo para a seguir penetrar e albergar em outras células. Em geral o parasitismo tecidual é baixo na fase crônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A forma crônica da doença de Chagas é representada por diversas formas clínicas, afetando um ou mais órgãos de forma irreversível, destacando-se as alterações cardíacas como as principais (figura 08). A cardiopatia crônica e o aparecimento dos megas, megaesôfago e megacólon, principalmente, representam formas clínicas de considerável gravidade (SZAJNMAN et al., 2000; CAZZULO et al., 2001; MONCAYO, 2003).

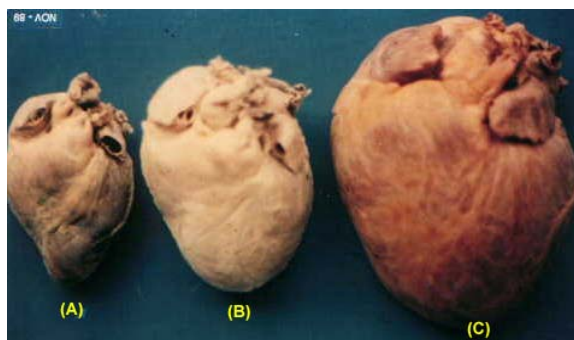


Figura 08. Coração de pacientes que desenvolveram doença de Chagas e morreram por: (A) morte súbita (B) megacólon ou mega-esôfago (C) insuficiência cardíaca congestiva.

Fonte: <http://www.uftm.edu.br/instpub/fmtm/patge/imagem/mac0220.jpg>, (acesso em: 05/02/2008).

A prevalência das manifestações digestivas ou cardíacas na doença de Chagas depende principalmente da região endêmica. É comum encontrar casos de megaesôfago na região central do Brasil, sendo essa manifestação rara em outras áreas. Atualmente, estima-se que existem no Chile ao redor de 150.000 indivíduos com enfermidade de Chagas em fase indeterminada ou crônica (SALAZAR et al, 2006).

A forma cardíaca apresenta como principais sintomas a arritmia (75.000 casos/ano), a insuficiência cardíaca e o trombo-embolismo. As manifestações digestivas ocorrem pelo comprometimento das funções do órgão afetado. No caso do megaesôfago (45.000 casos/ano), observa-se o aumento do diâmetro do órgão e alterações na motilidade, além de sintomas como dores epigástricas, regurgitação e hipertrofia das glândulas salivares. O megacólon (30.000 casos/ano) apresenta como principal característica a obstipação do órgão, que pode durar semanas (WENDEL et al., 1992; MONCAYO, 2003).

3.4 Tratamento da doença de Chagas

A doença de Chagas, por sua grande difusão, pela gravidade das manifestações que pode acarretar, por não ter tratamento específico definido e pela complexidade de sua profilaxia, representa grave e alarmante problema sanitário (RASSI, 1991).

Os fármacos utilizados para a doença de Chagas até o presente permitem efeitos supressivos, mas não curativos. Isto é, podem diminuir muito ou mesmo suprimir a

parasitemia no curso do tratamento e reduzi-la apreciavelmente no pós-tratamento, a ponto de negatizar xenodiagnósticos. Mas isto não garante e não significa cura (TEIXEIRA, 2002).

Os primeiros compostos testados para o tratamento da doença de Chagas foram atoxil (arsênico), fucsina, tartarato de antimônio potássico e cloreto de mercúrio, empregados experimentalmente por Mayer e Rocha Lima (1912, 1914), sendo que nenhum deles apresentou resultado positivo (COURA et al., 2002).

Packchanian (1952, 1957) mostrou uma nova e promissora linha de fármacos potentes com os nitrofuranos, primeiros compostos nitroheterocíclicos utilizados na quimioterapia (PÉREZ, 2001) liderado pelo nitrofural (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona).

Desde a década de 1970 até os dias de hoje, apenas dois fármacos estão disponíveis no mercado mundial para o tratamento da doença de Chagas; o nifurtimox, cujo mecanismo de ação envolve um anion superóxido, que é tóxico ao parasita, e o benznidazol, onde a ação deste envolve uma diminuição da síntese de proteínas, redução de incorporação dos precursores de RNA e diminuição da incorporação da timidina em DNA (ANANDAN, 1997; TRACY, 2001; COURA e CASTRO, 2002; OTERO, 2006). No entanto, estes fármacos são ativos apenas na fase aguda da doença e o tratamento é ineficaz em pacientes na fase crônica (SZAJNMAN, 2003; URBINA et al., 2003; SDR, 2008; BOIANI et al., 2006). No Brasil, apenas o benznidazol é comercializado.

Associando a grande incidência de parasitoses em nosso país ao fato de as cepas brasileiras de *Trypanosoma cruzi* serem resistentes ao nifurtimox e a ameaça de suspensão da produção do benznidazol pela Roche no Brasil, é de suma relevância e urgência o desenvolvimento de agentes antichágasicos realmente eficazes, principalmente para a fase crônica da doença (JANNIN e VILLA, 2007).

Estes compostos, nifurtimox e benznidazol, apresentam ainda outros inconvenientes (tabela 01), tais como: (a) graves e freqüentes efeitos colaterais como vômito, anorexia, neuropatia periférica, dermatopatia alérgica, alterações psíquicas, mutagenicidade, entre outras; (b) sensibilidade seletiva para diferentes cepas de *T. cruzi*; (c) tratamentos muito longos (JANNIN e VILLA, 2007).

Tabela 01. Principais efeitos colaterais observados no tratamento específico da doença de Chagas.

Sintoma / Sinal	Benznidazol	Nifurtimox
Anorexia	++	+++
Cefaléia	+	++
Dermatopatia	+++	+
Excitação psíquica	-	+++
Gastralgia	+	+++
Insônia	+	++
Náusea	++	+++
Perda de peso	+	+++
Polineuropatia	+	++
Vômito	++	+++

Fonte: CANÇADO, 1997; RASSI et al., 2000.

3.5 Compostos nitro-heterocíclicos com atividade na doença de Chagas

O grupo de compostos nitro-heterocíclicos biologicamente ativos contra o *T. cruzi*, incluem vários 5- e 2-nitroimidazóis e 5-nitrofuranos (figura 09), os quais podem ser utilizados como agentes terapêuticos contra uma grande variedade de protozoários e bactérias anaeróbias, patogênicas em humanos e animais. Dentre estes compostos tem-se: benznidazol (I), nifurtimox (II), furazolidona (III), metronidazol (IV), secnidazol (V), ornidazol (VI) e tinidazol (VII), todos com amplo espectro de ação (RAETHER E HÄNEL, 2003).

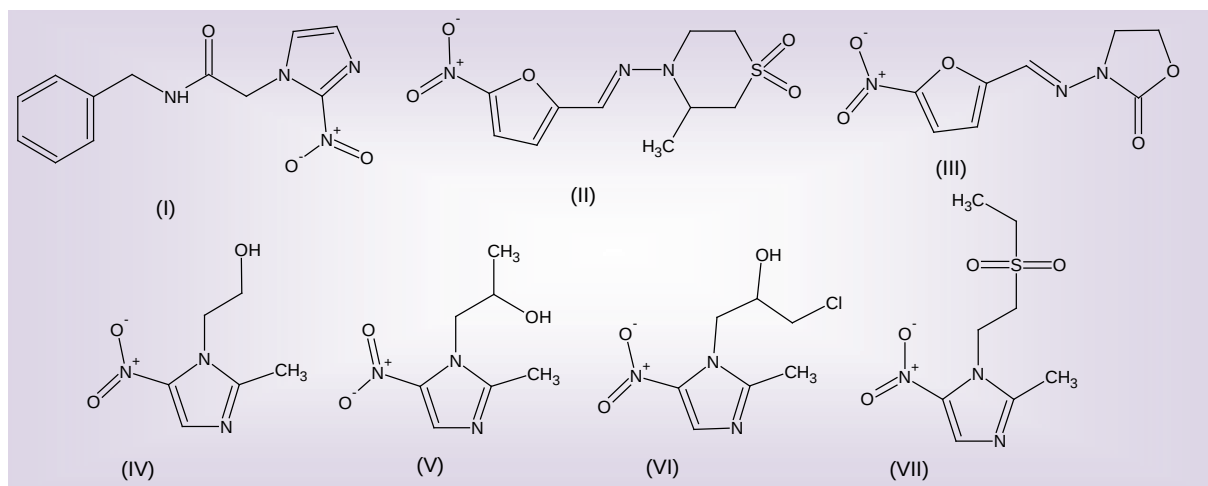


Figura 09. Estrutura química dos compostos benznidazol (I), nifurtimox (II), furazolidona (III), metronidazol (IV), secnidazol (V), ornidazol (VI) e tinidazol (VII) utilizados como antiprotozoários e antimicrobianos.

3.6 Nitrofural (NF) e Hidroximetilnitrofural (NFOH)

O 5-nitro-2-furaldeído semicarbazona, também conhecido como nitrofural (figura 10), foi o primeiro derivado nitrofurânico introduzido na prática médica, sintetizado em 1944 por Dodd e Stillman, no entanto, demonstrou-se que seu emprego por via sistêmica produzia graves efeitos tóxicos, sendo usado como antimicrobiano tópico (FONSECA, 1999).

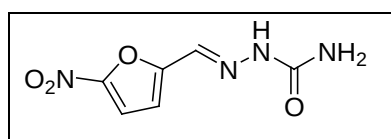


Figura 10. Estrutura química do nitrofural.

Em 1969, ANDRADE e BRENER observaram que a atividade tripanomicida do nitrofural tornava o *T. cruzi* inativo. Em 1988, HENDERSON e colaboradores constataram a inibição da tripanotona redutase por naftoquinonas e nitrofuranos, incluindo o nitrofural.

GONÇALVES e colaboradores, em 1994, identificaram que a atividade do nitrofural em associação com primaquina era potencializada quando ensaiado em cultura de células LLC-MK₂, infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

A toxicidade desse nitrofurano é alta por via oral, em razão da hemólise e neuropatia grave que provoca. Em alguns países foi retirado do mercado e em outros continua sendo empregado apenas por via tópica, no tratamento de infecções estafilocócicas da pele, queimaduras e úlceras, especialmente aquelas resistentes a outros fármacos.

A formação do nitro radical aniônico a partir do nitrofural foi comprovada por meio de geração eletroquímica, com o uso de eletrodo de carbono vítreo (LA-SCALEA et al., 1999).

Frente à falta de medicamentos específicos para o tratamento da doença de Chagas e a elevada toxicidade dos quimioterápicos têm-se a necessidade de recorrer a novas alternativas terapêuticas para a obtenção de fármacos mais seguros e eficazes, principalmente para a fase crônica da doença.

A modificação molecular tem sido bastante promissora na introdução de novos fármacos na terapêutica (WERMUTH, 1996; BUNDGAARD, 1985), constituindo um desenvolvimento natural da química orgânica. Utilizando principalmente a latenciação de fármacos como estratégia de modificação molecular, Chung (1996) sintetizou uma série de pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina, tendo como grupo espaçantes aminoácidos e dipeptídeos. Como intermediário da síntese de base de Mannich entre o nitrofural e o dipeptídeo de primaquina obteve-se o hidroximetilnitrofural (NFOH) (figura 11), o qual demonstrou-se ativo tanto em amastigotas quanto em tripomastigotas no ensaio *in vitro* em culturas de células infectadas com *Trypanosoma cruzi*.

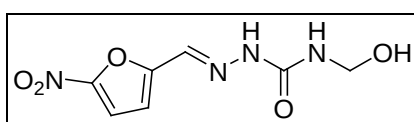


Figura 11. Estrutura química do hidroximetilnitrofural.

A figura 12 mostra que a atividade do NFOH é maior tanto nas formas *tripomastigota* quanto na *amastigota*, comparativamente ao benznidazol (fármaco utilizado na terapêutica).

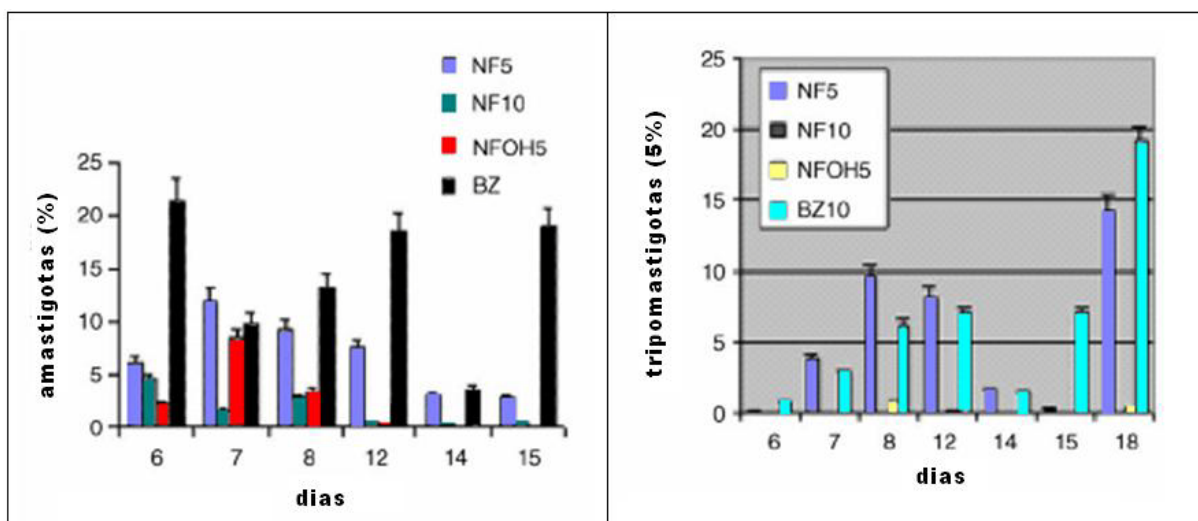


Figura 12. Efeito de 5µM e 10µM de NF e NFOH; 10µM benznidazol (BNZ) em porcentagem de amastigotas e tripomastigotas em 6, 7, 8, 12, 14, e 15 dias após a infecção das células com formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Controle: 100% amastigotas e tripomastigotas (CHUNG et al., 2003).

O aspecto altamente promissor desse composto é a diminuição da toxicidade em quatro vezes, comparativamente ao nitrofural, segundo observado no teste de mutagenicidade em duas linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA102) (GUIDO et al., 2001).

As figuras 13 e 14 apresentam os resultados do estudo de GUIDO et al., 2001, os quais relatam que para as mesmas concentrações utilizadas, o número de revertentes do pró-fármaco NFOH é menor em relação 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 (NF) em hidroximetilnitrofural (NFOH) foi capaz de diminuir a atividade mutagênica em aproximadamente 4 vezes, nos ensaios com (+S9) ou sem ativação metabólica (-S9), em ambas linhagens testadas.

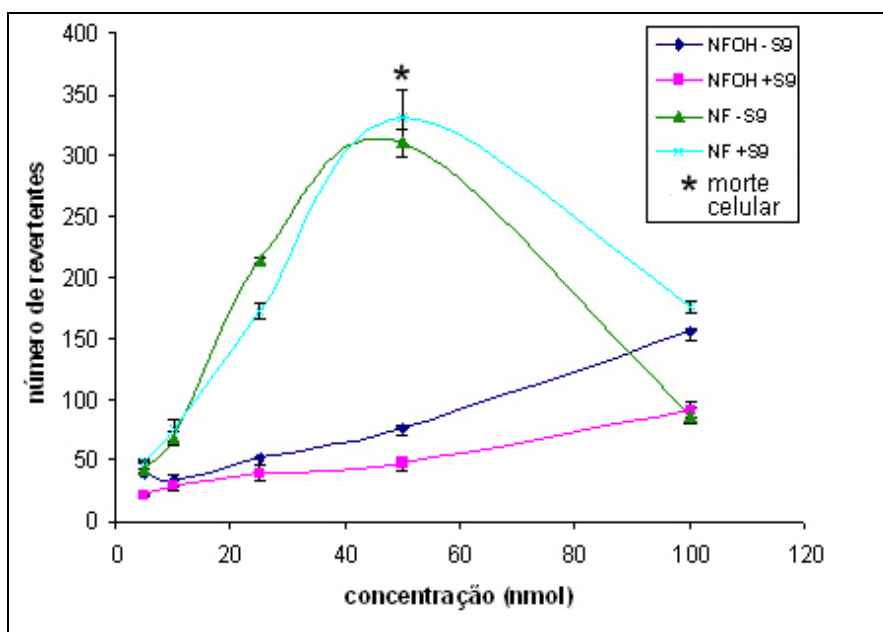


Figura 13. Atividade mutagênica (*S. typhimurium* cepa TA98) dos compostos NFOH e NF em ensaios com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica (GUIDO et al., 2000).

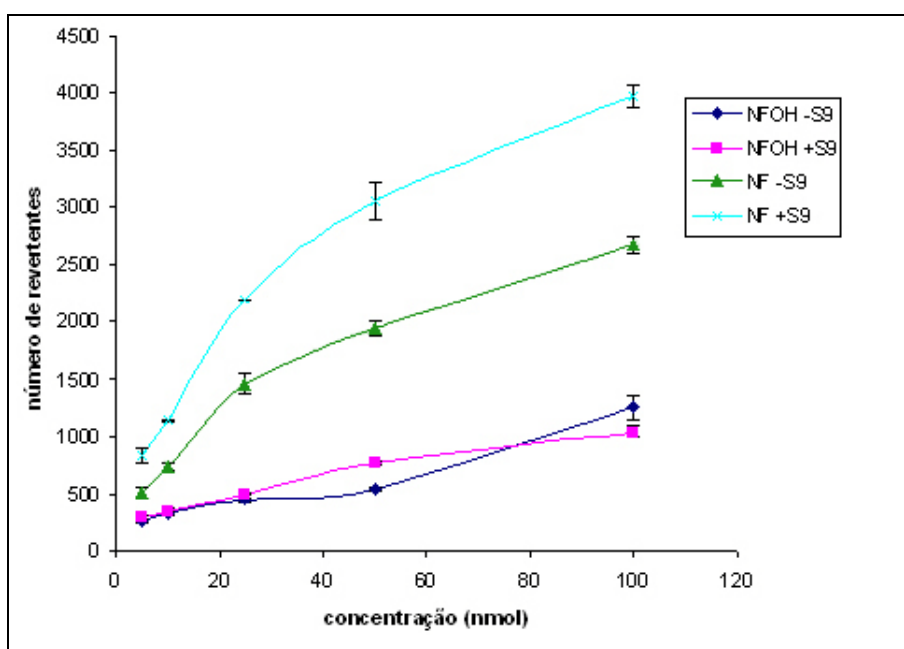


Figura 14. Atividade mutagênica (*S. typhimurium* cepa TA102) dos compostos NFOH e NF em ensaios com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica (GUIDO et al., 2001).

Resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda (14, 28 e 60 dias) para o derivado hidroximetilado de nitrofural com camundongos e ratos, sugeriram baixa toxicidade deste, obtendo-se uma dose letal mediana (DL_{50}) maior em relação ao fármaco de partida, NF (556,3

mg/kg). Por via oral os resultados caracterizaram o NFOH como pouco tóxico, segundo a OMS com um valor de DL_{50} acima de 2000mg/kg (MELO, 2006).

Os resultados obtidos em todos os testes de toxicidade aguda com NF e NFOH em camundongos e ratos estão resumidos na tabela 02.

Tabela 02. Resultados do teste de toxicidade aguda dos fármacos NF e NFOH

Animal	Via	Solvente	Fármaco	DL ₅₀ (mg/kg)
Camundongo	v.o.	DMSO	NFOH	>2000
Camundongo	i.p.	DMSO/H ₂ O	NF	197,1
Camundongo	i.p.	DMSO/H ₂ 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

Fonte: MELO, 2006

Em 2005, LA-SCALEA e colaboradores estudaram o comportamento voltamétrico do nitrofural e do derivado hidroximetilnitrofural por voltametria cíclica, varredura linear e pulso diferencial, comparando-o ao do metronidazol e do cloranfenicol. A redução do nitrofural é pH-dependente e em meio ácido o derivado hidroxilamínico, envolvendo 4 elétrons, é o principal produto formado.

Em meio alcalino e com prévio tratamento do eletrodo de carbono vítreo, a redução do nitrofural ocorre em duas etapas: a primeira envolve 1 elétron para formar o nitro-radical aniônico e a segunda etapa corresponde à formação da hidroxilamina. O hidroximetilnitrofural possui comportamento voltamétrico semelhante e, de forma análoga, apresentou a mesma eletroatividade e capacidade de estabilização do nitro-radical, indicando que a modificação molecular do nitrofural não introduziu alterações no seu comportamento voltamétrico. Embora o estudo voltamétrico tenha sido incapaz de explicar as diferenças biológicas entre ambos compostos, a voltametria pode ser uma técnica complementar útil para ajudar estudos de mecanismos biológicos (LA-SCALEA et al., 2005).

BARBOSA e colaboradores (2007) testaram a atividade deste derivado nitrofurânico utilizando reação de *trans-splicing*. Neste processo de pré-maturação de RNA mensageiro, conhecido como *splicing*, os íntrons (regiões não codificantes de polipeptídeos) são removidos a partir dos transcritos primários e os éxons (região codificante) adicionadas para formar uma sequência contígua especificando um polipeptídeo funcional. Foi demonstrado, através da reação de *trans-splicing*, que o NFOH interfere no processo de pré-maturação do RNA mensageiro, afetando o processamento de RNA nestes parasitas.

Estudos realizados por Serafim (2008) demonstraram que no ensaio de conversão *in vitro* o NFOH é mais estável quimicamente em pH 7,4 (37 °C), o qual favorece, provavelmente, a conversão em NF, e em meio ácido (pH 1,2), converte-se totalmente em NF após 48 horas, enquanto em pH 7,4 converte-se apenas 20%, após este mesmo período. Neste mesmo estudo, os resultados demonstraram que o volume de distribuição (Vd) para o NFOH foi de 337,5 enquanto que para o NF foi de 17,64, indicando que o NFOH, após a absorção, é melhor distribuído (cerca de 20 vezes) pelos tecidos para atingir o alvo, enquanto o NF permanece na corrente sanguínea (SERAFIM, 2008).

3.7 Toxicidade dos nitrofuranos

Dentre as várias substâncias químicas mutagênicas existentes, os nitrocompostos são considerados um dos grupos mais importantes. Os compostos nitrofurânicos são potenciais agentes mutagênicos devido ao grupo nitro presente na molécula (GÜIDO et al., 2001).

A mutagenicidade e a possível carcinogenicidade dos nitrofuranos devem-se, provavelmente, à presença de dois grupos potencialmente reativos: o nitro na posição 5 e os substituintes (R) na posição 2 do anel furânico (McCALLA, 1983; LAU et al., 1992; KOBIERSKA-SZELIGA et al., 1994; MECCA et al., 2002; HIRAKU, 2004).

O esquema apresentado na figura 15 mostra os mecanismos, propostos na literatura, de toxicidade e mutagenicidade dos nitrofurânicos (McCALLA, 1983; MECCA et al., 2002; HIRAKU, 2004). Em sistemas bacterianos, o requisito básico para a ação mutagênica de compostos nitrofurânicos é a redução promovida por, no mínimo, três nitrorredutases. Estas reduções resultam em cadeia de reações, que levam à formação de espécies eletrofílicas que podem reagir com o DNA.

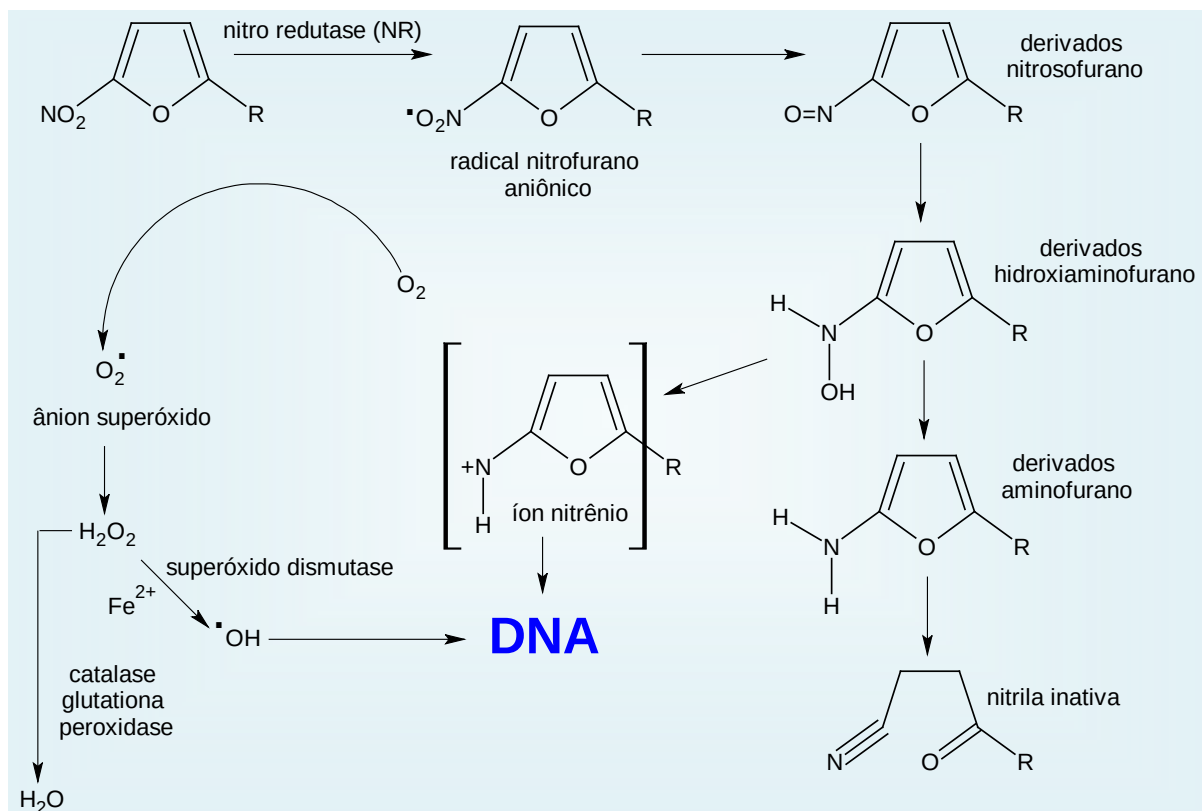


Figura 15. Possíveis mecanismos de mutagenicidade dos nitrofurânicos.
 Fonte: Adaptado de McCALLA, 1983; MECCA et al., 2002; HIRAKU, 2004.

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).

Esses compostos são substâncias que contêm um grupamento nitro na posição 5 do anel do furano (FONSECA, 1999) e exercem atividade através de um mecanismo citotóxico o qual inicialmente envolve uma ou mais reações de redução do grupo nitro, seguindo da inibição de várias enzimas necessárias para a célula do parasita requerer energia (GRINGAUZ, 1997). 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. A figura 16 mostra a redução desses compostos (TOCHER, 1997). O grupo nitro presente na molécula é o responsável pela atividade, sendo considerado como parasitóforo. Apresentam atividade antibacteriana, que se deve à redução enzimática do grupo nitro *in vivo*, produzindo espécies tóxicas que, subseqüentemente, causam danos ao DNA das bactérias, atuando ainda contra alguns protozoários e fungos (FONSECA, 1999; GUERRA, 2005).

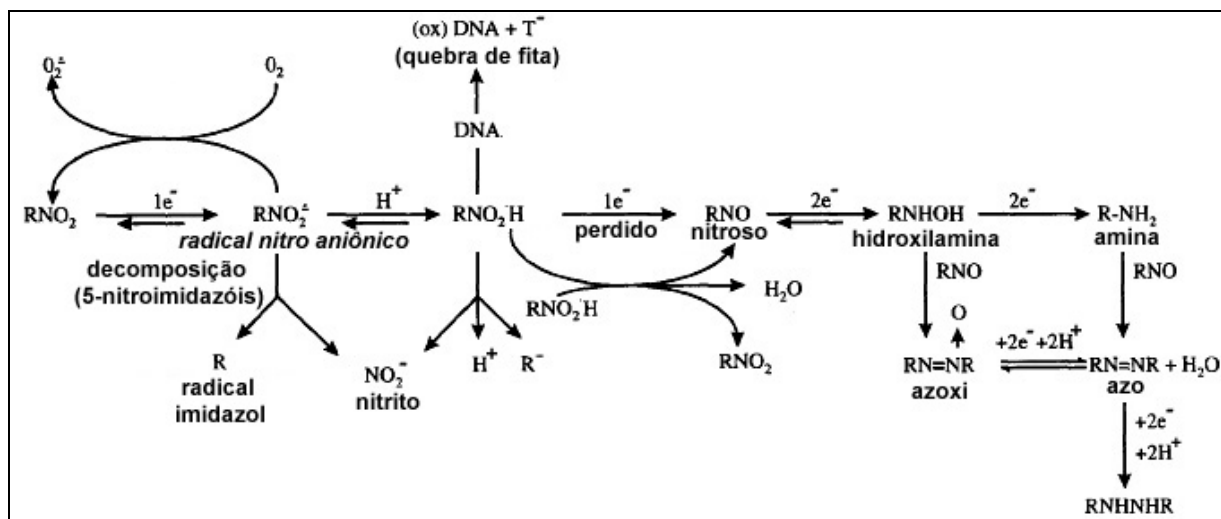


Figura 16. Ativação por redução de compostos Nitroaromáticos (TOCHER, 1997).

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).

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* apresentaram resultados positivos. No entanto, os

ensaios de mutagenicidade realizados *in vivo* são, na sua maioria, negativos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Ensaio realizado 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 redução do grupo nitro. 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 17.

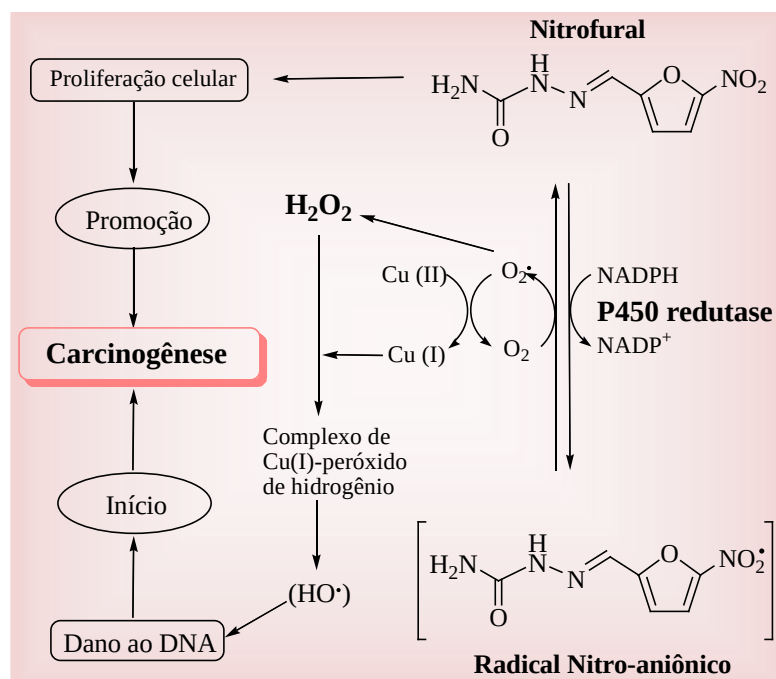


Figura 17. Mecanismo proposto de dano ao DNA e indução de carcinogênese pelo nitrofurais (HIRAKU, 2004).

3.8 Planejamento de novos fármacos

Considerando-se a carência de antichagásicos realmente eficazes e a elevada toxicidade dos fármacos disponíveis, é premente a necessidade de novas alternativas terapêuticas. A modificação molecular está sendo bastante utilizada no desenvolvimento de novos fármacos para a doença de Chagas.

O processo de descoberta de novos fármacos, também uma atribuição da Química Farmacêutica e Medicinal, caracteriza-se por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentar os efeitos farmacológicos desejados, com emprego terapêutico seguro (BARREIRO, 2001). Em análise realizada para entender os caminhos da descoberta dos fármacos foi destacada a estratégia baseada na modificação molecular de fármacos ou protótipos já conhecidos (WERMUTH, 2004).

O planejamento racional de novos fármacos é um processo multietapas e interdisciplinar, onde participam diversos profissionais, e estimativas recentes apontam que seu custo envolva milhões de dólares (DIMASI, HANSEN & GRABOWSKI, 2003).

Diversas estratégias são conhecidas para se introduzir modificações estruturais em um composto-protótipo, objetivando sua otimização, seja farmacocinética ou farmacodinâmica. Dentre elas, a modificação molecular fundamentada no bioisosterismo tem permitido a identificação de novos derivados terapeuticamente úteis. O bioisosterismo consiste em uma estratégia de modificação molecular de substância protótipo (SP), como um processo especial de modificação molecular. A SP deve apresentar uma estrutura química bem definida, quanto aos aspectos estereoquímicos, em níveis configuracional e conformacional, com mecanismo de ação conhecido, se possível ao nível de topografia de sua interação com o biorreceptor, incluindo todos os grupamentos farmacofóricos relevantes, assim como os principais fatores estruturais determinantes das propriedades físico-químicas que regulam sua biodisponibilidade e seus efeitos colaterais, diretos ou não, devem ser conhecidos. O sucesso do emprego desta estratégia no desenvolvimento de novas substâncias farmacoterapeuticamente atraentes tem observado significativo crescimento em distintas classes terapêuticas (BARREIRO, 2001).

O termo bioisosterismo surgiu da aplicação do princípio do isosterismo, desenvolvido por Langmuir (1919), em moléculas bioativas, que defendia que átomos ou grupos de átomos com estrutura eletrônica e propriedades físico-químicas similares apresentavam o mesmo comportamento no sistema biológico. Nessa definição foram consideradas as moléculas que continham o mesmo número de átomos, a mesma disposição e número de elétrons e as mesmas características físico-químicas (JORGE, 2007)

Em 1951, Friedman introduziu o termo bioisosterismo para descrever fenômeno observado entre substâncias estruturalmente relacionadas que apresentavam propriedades biológicas similares ou antagônicas em um mesmo sítio receptor (BARREIRO, 2008).

Em 1970, Burger classificou e subdividiu os bioisósteros em duas grandes classes (sendo elas formadas pelos bioisósteros clássicos e não clássicos), tabela 03.

Tabela 03. Bioisósteros clássicos e bioisósteros não clássicos

Grupos e átomos bioisósteros clássicos						
Monovalentes		Divalentes		Trivalentes	Tetravalentes	
F, OH, NH2, CH3, OR, Cl,		-CH2-		=CH-	=C=	
SH, PH2, SiH3, SR		-O-		=N-	=Si=	
Br		-S-		=P-	=N ⁺ =	
I		-Se-		=As-	=P ⁺ =	
		-Te		=Sb-	=As ⁺ =	
					=Sb ⁺ =	
Bioisósteros não-clássicos						
-CO-	-COOH	-SO2NH2	-H	-CONH-	-COOR-	-
-CO2-	-SO3H	-	-F	-NHCO-	-ROCO-	CONH2
-SO-	Tetrazol	PO(OH)NH2				-
-SO2NR-	-SO2NHR		-OH		Catecol	CSNH2
-CON-			-CH2OH		-	
-CH(CN)-					benzimidazol	
R-S-R´	=N-	-NHCONH2				
(R-O-R´)	-C(CN)=	-NH-CS-				-C5H4N
R-N(CN)-	-	NH2				-C4H4N
R´	halogênio					
	-CF3					
	-CN					

Fonte: Barreiro, Fraga, 2001

O emprego do bioisosterismo como estratégia de desenvolvimento de novos agentes bioativos permite, que se antecipe uma comparável afinidade intrínseca entre duas substâncias bioisostéricas e, conseqüentemente, um potencial de atividade biológica similar. Entretanto, quando as substituições bioisostéricas são efetuadas em grupamentos funcionais envolvidos na subunidade farmacofórica de uma determinada substância, alterações envolvendo os processos de biotransformações podem ser de tal ordem, que modifiquem substancialmente a

farmacocinética relativa dos bioisósteros, sem que se possa deduzir índices de comparação (BARREIRO, 2001).

Um exemplo da aplicação fundamentada no bioisosterismo é o cloranfenicol, um antibiótico de amplo espectro com atividade elevada (KOROLKOVAS, 1988). A presença do grupamento nitro aromático confere à substância propriedades tóxicas, podendo então ser substituído, sem perda significativa de atividade, por grupos de igual força de atração sobre elétrons. Essa substituição resultou, por exemplo, no tianfenicol, um fármaco que não se mostrou melhor que o composto matriz, no entanto, é empregado como seu substituto devido à menor toxicidade (BARREIRO, 2001; KOROLKOVAS, 1988).

3.9 A importância da avaliação da genotoxicidade dos fármacos

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é o material genético de todos os seres vivos e de muitos vírus, sendo a sequência de bases nitrogenadas a forma na qual a informação genética é armazenada (LEWIN, 2001). Por apresentar essa função fundamental, o DNA é bastante protegido, sendo a única molécula biológica que apresenta um mecanismo próprio para prevenção e reparo de falhas em seu metabolismo (LEHNINGER et al., 1995). Entretanto, ainda assim está sujeito a mutações que são alterações súbitas e herdáveis na estrutura do material genético e como tal, é uma fonte extremamente importante de variabilidade genética nas populações de seres vivos (BURNS e BOTTINO, 1991). Estas alterações podem ser decorrentes de processos celulares normais (mutações espontâneas) ou devidas à exposição do organismo a agentes químicos ou físicos (mutações induzidas) (LEWIN, 2001).

Os agentes mutagênicos invadem a célula e se dirigem ao núcleo causando alterações no material genético podendo desregular o ciclo celular, fazendo com que a célula se reproduza descontroladamente invadindo tecidos adjacentes, dando início à formação de tumores (NETO et al., 2005).

Muitas das substâncias químicas existentes são agentes causadores de mutações gênicas e de alterações cromossômicas. Algumas destas substâncias são chamadas de aneugênicas, pois atuam provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante o processo de divisão celular dando origem às aneuploidias. Outras são chamadas de clastogênicas e induzem quebras e alterações na estrutura dos cromossomos. Em qualquer dos

casos é possível, através de testes citogenéticos, avaliar os efeitos mutagênicos de um determinado composto, o que torna estes tipos de testes imprescindíveis nestas avaliações (RABELLO-GAY et al., 1991).

O estudo da genotoxicidade consiste na caracterização e descrição da ação daqueles agentes que, a nível subtóxico, provocam algum tipo de modificação no material genético. A ação dos agentes genotóxicos pode dar lugar a indução de troca na sequência de DNA provocando a aparição de mutações pontuais, ou mais em grande escala, de aberrações cromossômicas visíveis. As modificações na cadeia polinucleotídica produzem alteração ou eliminação na função gênica (LAGE et al., 2004).

Com o objetivo de avaliar a genotoxicidade de todos os agentes mutagênicos relevantes, hoje em dia se recorre à realização de uma bateria de testes tanto *in vitro* como *in vivo*, e que parece claro que nenhum único ensaio é capaz de detectar todos os possíveis agentes mutagênicos (LAGE et al., 2004).

A avaliação da genotoxicidade pode ser realizada nos diferentes passos de interação do agente mutagênico com o DNA ou de seus efeitos. A capacidade do composto se ligar ao material genético pode ser avaliada pela observação de aductos no DNA; a capacidade de quebrar o DNA pode ser estimada por eluição alcalina ou pelo teste de Cometa e as mutações cromossômicas e/ou genômicas podem ser quantificadas pelo testes do micronúcleo ou aberrações cromossômicas (VAN GOETHEM et al., 1997).

A função primária dos testes de toxicologia genética é investigar, usando células ou organismos, o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas ou que possam ser transmitidas às futuras gerações (DA SILVA et al., 2003).

Na citogenética clássica, cromossomos são estudados diretamente por observação e contagem de aberrações cromossômicas na metáfase. Este estudo produz uma análise mais detalhada, mas a complexidade de enumerar aberrações cromossômicas na metáfase e a possível perda de cromossomos durante a preparação da metáfase, estimulou o desenvolvimento de um sistema mais simples de mensuração de danos cromossômicos (FENECH, 2000).

Entre os testes desenvolvidos para investigar genotoxicidade, o teste de micronúcleo tem se provado um sensível indicador de danos cromossômicos e tem sido usado com sucesso em tecidos hematopoiéticos e epiteliais de muitos organismos (DE LA SIENRAA et al., 2003).

3.10 Teste de micronúcleo

O estudo de danos ao DNA induzido por substâncias de origem natural ou sintética é uma área essencial da toxicologia genética uma vez que mutação em cromossomos é um evento importante na carcinogênese (FENECH et al., 2005).

Micronúcleos têm sido estudados há muitos anos e freqüentemente usados para quantificar a exposição a agentes químicos ou à radiação (TUCKER e PRESTON, 1996).

Os micronúcleos foram primeiramente descritos por Howell em 1891 com inclusões citoplasmáticas em células vermelhas do sangue de gatos anêmicos e foram chamados de “fragmentos do material nuclear”. Jolly observou essas mesmas estruturas em 1901 em seus estudos com eritrócitos de embriões de ratos e foram chamados de “corpúsculos intraglobulares” (SLESINSKI e GUZZIE, 1988). Segundo Heddle et al. (1983) diferentes mecanismos podem estar envolvidos na formação dos micronúcleos, incluindo quebras cromossômicas (clastogênese) e rompimento das fibras do fuso mitótico (aneuploidiogênese). Isso ocasiona a formação de um “pequeno núcleo” envolto por membrana (micronúcleo) isolado do núcleo principal mais corado similarmente a este devido ao seu conteúdo de DNA (SLESINSKI e GUZZIE, 1988).

Os micronúcleos (MN) aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula. Os MN podem, também ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo (RIBEIRO et al., 2003).

Quando um eritroblasto da medula se desenvolve para dar origem a um eritrócito policromático (reticulócito), o núcleo principal é expulso; qualquer micronúcleo que tenha sido formado pode “ficar para trás” (lagging), no citoplasma, onde não deveria existir qualquer material nuclear (BRASIL, 2001).

A visualização dos micronúcleos é facilitada nestas células, uma vez que não existe um núcleo principal (figura 18). Um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos, micronucleados, nos animais expostos à substância em estudo representa uma indicação de danos cromossômicos induzidos (BRASIL, 2001).



Figura 18. Reticulócito micronucleado (coloração: Acridine Orange; 1000 x)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e solventes

Acetato de sódio anidro (Mallinckodt)

Ácido acético glacial p.a. (Synth)

Água destilada

5-bromo-2-furaldeído (Sigma Chemical Co.)

Carbonato de potássio (Synth)

Carboximetilcelulose (CMC)

Ciclofosfamida (Sigma Chemical Co.)

Cloridrato de semicarbazida (Fluka)

Clorofórmio (Merck)

Dimetilsulfóxido p.a. (Vetec)

Éter etílico (Quemis)

Formaldeído p.a. (Merck)

Furfural (Fluka)

Hidroximetilfurfural (Fluka)

Metanol p.a. (Synth)

Metanosulfonato de sódio (Sigma Chemical Co.)

Nitrofural p.a. (Sigma Chemical Co.)

Tween 80 (Sigma Chemical Co.)

4.2 Metodologia de síntese

O presente trabalho é baseado no conceito de bioisosterismo com ênfase no estudo em relação à substituição do grupo nitro da molécula de NF por grupamentos que apresentem as características semelhantes, no entanto, de toxicidade reduzida e principalmente diminuição

da atividade mutagênica, problema encontrado até o presente em todos os derivados nitrofuranos utilizados na terapêutica da doença de Chagas.

Para a síntese dos compostos isósteros de NF utilizou-se a metodologia baseada na obtenção de Bases de Schiff, por meio de um composto carbonílico e uma amina.

O método de obtenção das Bases de Schiff a partir de amidas correspondentes envolve a reação de adição nucleofílica, figura 19. Em decorrência do pH ácido do meio reacional, ocorre a protonação do oxigênio carbonílico do grupamento aldeídico tornando-o suscetível ao ataque do nucleófilo (JORGE, 2007).

Para tanto, o meio reacional deve estar suficientemente ácido para que ocorra a protonação do composto carbonílico, sem permitir decréscimo da concentração de composto nitrogenado livre. Dessa forma, nota-se que a basicidade da amina e a reatividade da substância carbonílica são as principais condições envolvidas na determinação desta reação (JORGE, 2007).

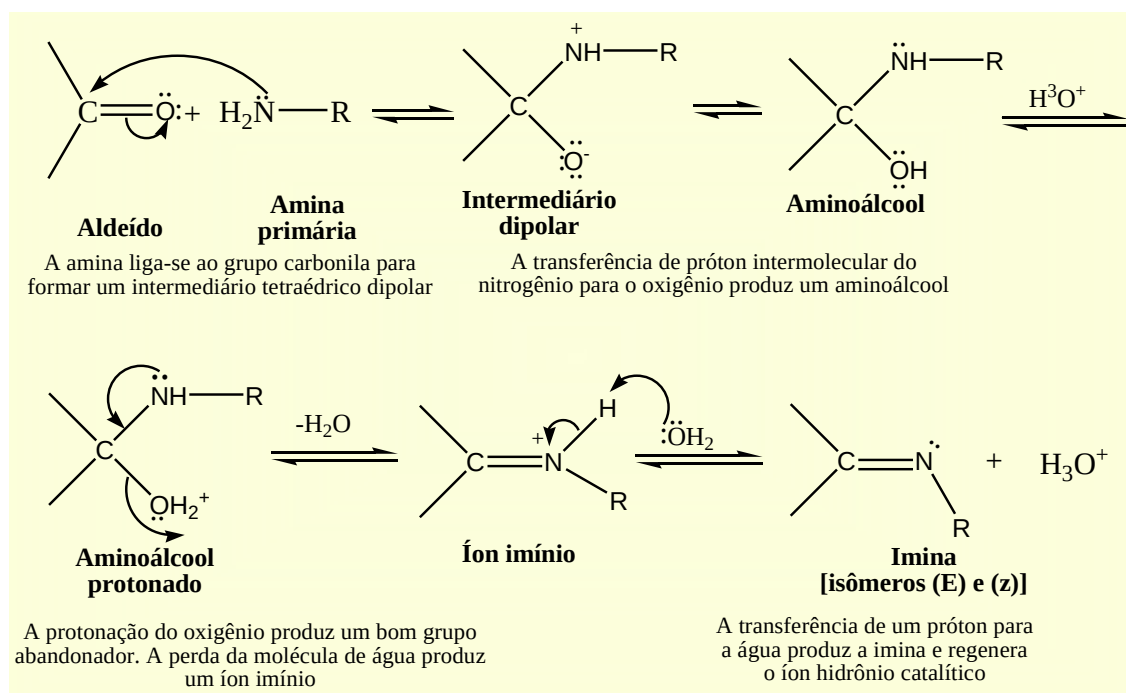


Figura 19. Mecanismo de reação da formação de iminas (SOLLOMONS, 2006)

4.3 Métodos Analíticos

4.3.1 Análise cromatográfica em camada delgada

As análises foram realizadas em cromatofolhas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60 F254 Merck®, para o acompanhamento das reações, avaliação e purificação dos produtos sintetizados. As fases móveis empregadas foram: CHCl₃/MeOH/AcOH (85:10:5, v/v/v), sistema solvente 1; CHCl₃/MeOH/AcOH (95:5:3, v/v/v), sistema solvente 2. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365 nm).

4.3.2 Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão (ou decomposição) foram determinadas em aparelho capilar Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific®, disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

4.3.3 Análise de espectrofotometria de absorção no infravermelho (I.V.)

Os espectros de absorção no infravermelho na região de 4.000 a 400 cm⁻¹, foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro de infravermelho FTIR-8300 da SHIMADZU Corporation, disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

4.3.4 Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono 13 (RMN ^{13}C)

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias sintetizadas foram obtidos no espectrômetro Bruker DPX-300 (300 MHz), da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando como solvente DMSO- d_6 e como padrão interno DMSO.

4.4 Ensaios biológicos

4.4.1 Avaliação da atividade antichagásica dos compostos sintetizados

A avaliação da atividade antichagásica das substâncias sintetizadas foi realizada no laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Departamento de Ciências Biológicas, com a colaboração da Prof. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli.

A forma epimastigota de *T. cruzi* foi escolhida para se realizar este experimento por ser uma forma não infectante e de fácil manutenção em cultura.

4.4.2 Teste de micronúcleo para avaliação da atividade clastogênica e aneugênica

Hayashi et al. (1990) descreveram uma técnica para a análise de células micronucleadas do sangue periférico de camundongos com a utilização de lâminas pré-coradas com o corante fluorescente laranja de acridina (acridine orange), que proporciona coloração amarela ao DNA e vermelha ao RNA (figura 20). Essas propriedades permitem a identificação dos reticulócitos, eritrócitos jovens ricos em RNA em nível de citoplasma, que

se coram em vermelho pela presença deste ácido nucléico. Os micronúcleos por seu conteúdo de DNA se coram em amarelo e se tornam muito evidentes nestas células.



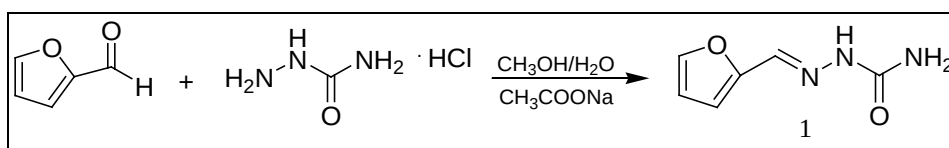
Figura 20. Reticulócito micronucleado (coloração: Acridine Orange; 1000 x)

Segundo Kichi et al. (1992), em estudos comparativos entre a técnica convencional de coloração por Giemsa de células da medula óssea dos camundongos e a técnica de coloração descrita por Hayashi et al. (1990) esta última se mostrou tão sensível quanto a primeira. Ainda segundo esse mesmo autor, esse método que utiliza lâminas pré-coradas com laranja de acridina é de realização ainda mais fácil e rápida, por não ser necessário processamento do material biológico antes do preparo das lâminas e nem a fixação prévia à coloração. A facilidade por análise é também um ponto destacado por Kichi et al. (1992).

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Procedimentos de síntese

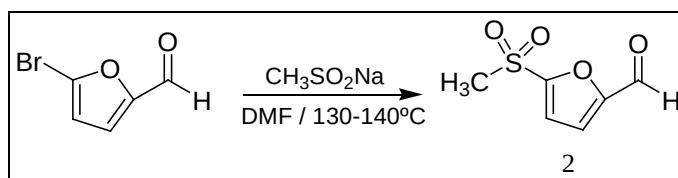
5.1.1 Síntese do 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (GUERRA et al., 2006)



Esquema 01. Síntese do 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (1)

A uma solução de cloridrato de semicarbazida (1 g) e acetato de sódio (1,5 g) em água e metanol, adicionou-se sob agitação magnética, o reagente 2-furanocarboxaldeído (0,59 g). Imediatamente observou-se a formação de um sólido levemente amarelado (composto 1), que foi filtrado e lavado com éter etílico. O produto obtido foi analisado por CCD utilizando-se como sistema solvente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (95:5:3/v:v:v).

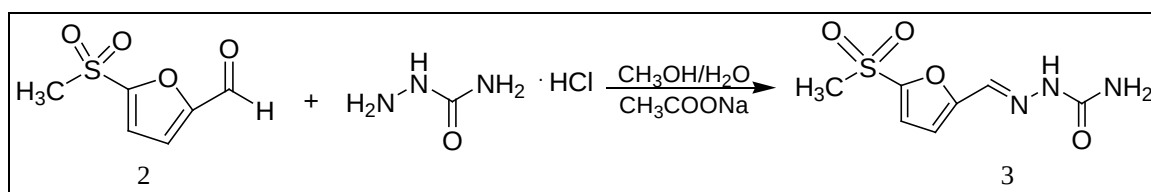
5.1.2 Síntese do [5-(metilsulfonil)furano-2-carbaldeído]



Esquema 02. Síntese do [5-(metilsulfonil)furano-2-carbaldeído] (2)

Metanosulfonato de sódio ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Na}$, 1,02g) e 5-bromo-2-furfural (1,75g) foram adicionados em 30 mL de dimetilformamida (DMF) e esta mistura foi aquecida até 130-140° e mantida sob agitação magnética por um período de 4h (esquema 02). Após este período, o sistema foi resfriado e adicionou-se água destilada seguido de extrações com clorofórmio. Adicionou-se sulfato de sódio anidro. O sistema foi filtrado e evaporou-se o clorofórmio sob pressão reduzida até obtenção de um óleo. O produto apresentou aspecto oleoso, de coloração marrom e o mesmo foi analisado por CCD utilizando como sistema solvente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (95:5:3/v:v:v).

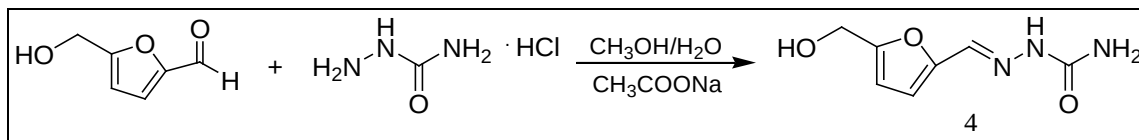
5.1.3 Síntese do 1-[{5-(metilsulfonil)furan-2-il}metileno]semicarbazida



Esquema 03. Síntese do 1-[{5-(metilsulfonil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (3)

A uma solução de cloridrato de semicarbazida (1 g) e acetato de sódio (1,5 g) em água e metanol, adicionou-se sob agitação magnética, [5-(metilsulfonil)furano-2-carbaldeído] (2, 0,45g). A reação permaneceu por um período de 48h. Após este período foi realizada extrações com acetato de etila e as fases aquosa e orgânica foram separadas e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. As fases aquosa e orgânica foram mantidas em geladeira e houve precipitação do produto na fase orgânica. O produto obtido desta reação foi analisado por CCD utilizando-se como sistema solvente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (95:5:3/v:v:v).

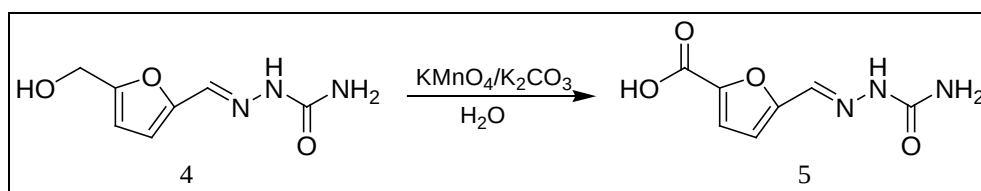
5.1.4 Síntese do 1-[[5-(hidroximetil)furan-2-il]metileno]semicarbazida



Esquema 04. Síntese do 1-[[5-(hidroximetil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (4)

A uma solução de cloridrato de semicarbazida (1 g) e acetato de sódio (1,5 g) em água e metanol, adicionou-se sob agitação magnética, o reagente hidroximetilfurfural (0,56g). Imediatamente observou-se a formação de um sólido branco amarelado (composto 4), que foi filtrado e lavado com éter etílico. A cristalização foi realizada em água destilada. O produto obtido foi analisado por CCD utilizando-se como sistema solvente $\text{CHCl}_3\text{:MeOH:CH}_3\text{COOH}$ (85:10:5/v:v:v).

5.1.5 Síntese do 1-[[5-(carboxil)furan-2-il]metileno]semicarbazida

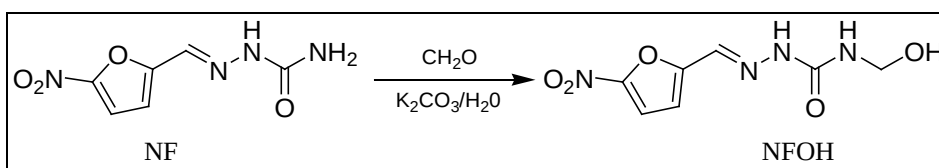


Esquema 05. Síntese do 1-[[5-(carboxil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (5)

Em um balão com 60 mL de água destilada e 0,25g do composto 4, adicionou-se sob agitação magnética, carbonato de potássio pouco a pouco. Posteriormente foi adicionado o permanganato de potássio, gota a gota, previamente dissolvido em água. A reação, iniciada em banho de gelo, permaneceu por 21h. Após este período, o produto foi filtrado, seguido de extrações com acetato de etila. O acetato de etila presente na fase aquosa foi evaporado sob

pressão reduzida e a mesma foi liofilizada, obtendo um rendimento de 82%. O produto obtido foi analisado por CCD utilizando como sistema solvente apenas o metanol.

5.1.6 Preparação do hidroximetilnitrofural (NFOH)



Esquema 06. Síntese do NFOH.

O pró-fármaco NFOH foi preparado à temperatura ambiente, sob agitação durante 48 horas, pela reação de 1,08 g de nitrofural com 18 ml de formaldeído em presença de 0,7g de K₂CO₃ e 10 ml de H₂O. Após completar a reação, a suspensão foi filtrada e o produto obtido foi recristalizado com metanol/água e analisado por CCD utilizando-se como sistema solvente CHCl₃:MeOH:CH₃COOH (95:5:3/v:v:v), conforme procedimento descrito por CHUNG (1996).

5.2 Avaliação da atividade antichagásica dos compostos sintetizados

5.2.1 Cultivo de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Os parasitas foram cultivados em meio LIT - Liver Infusion Tryptose (FERNANDES & CASTELLANI, 1966) a 28 °C, com repiques a cada 15 dias para a manutenção da cultura no laboratório. A cepa Y (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) é considerada uma cepa padrão do tipo I segundo Briones et al., (1999), que classifica como tipo I, linhagens isoladas de seres humanos e tipo II, linhagens que foram isoladas de vetores; a cepa NCS (cepa tipo I) foi

isolada de paciente chagásico da região de Araraquara pelo Dr. Arnaldo Buainain do Departamento de Análises Clínicas da FCF-UNESP, e gentilmente cedida ao laboratório de Imunologia da FCF – UNESP desde 1987; a cepa Bolívia foi isolada de triatomíneo em Vitichi – Bolívia por Funayama e Prado Júnior (1974), sendo predominantemente de forma larga, membrana ondulante com poucas ondulações e flagelo relativamente curto (ZINGALES et al., 1998).

5.2.2 Padronização do método colorimétrico utilizando MTT

O teste colorimétrico utilizando MTT foi descrito por Muelas-Serrano et al. (2000), utilizando formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y).

Para a padronização dessa reação no laboratório de Imunologia FCF-UNESP, foi utilizada a fração acetato do extrato da folha da planta *Piper tuberculatum* da Família Piperaceae, uma vez que, em prévias contagens, essa substância se mostrou com alta atividade tripanomicida.

Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno com 96 poços estéreis e com tampa, na câmara de fluxo laminar.

Para o teste foram colocados 3 µL da substância em cada concentração desejada (concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1µg/mL, respectivamente), não ultrapassando o limite de 3% de DMSO, uma vez que porcentagens superiores mostram-se tóxicas para o parasita.

A seguir, foram adicionados 97 µl de meio LIT contendo as formas epimastigotas de *T. cruzi* (fase log) na concentração desejada nos poços para teste e 97 µl de meio LIT nos poços controles. Foram realizados dois controles, um na ausência do parasita para cada poço teste, mas na presença da substância e outro na ausência dessa, mas contendo parasitas.

Inicialmente, preparou-se uma placa com diferentes concentrações de parasitas na fase log de crescimento (cultura de 7 dias) – 5×10^6 parasitas/mL, 8×10^6 parasitas/mL, 1×10^7 parasitas/mL – na presença das diferentes concentrações da substância, para escolha da concentração ideal de parasitas capaz de ser detectada por esta metodologia.

A placa foi incubada em câmara úmida a 28°C (BOD) por 72 horas. A seguir,

adicionou-se 10µL de solução MTT/PMS (2,5 mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS) em todos os poços e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 75 minutos a 28° C.

Colocou-se então 100 µL da solução 10% SDS-0,01N HCl, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz.

A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA – BioRad) a 595 nm e os resultados foram obtidos em absorbância. A porcentagem de parasitas mortos em porcentagem de citotoxicidade (%C) foi calculada segundo a equação abaixo (MUELAS-SERRANO et al., 2000).

$$\% C = [(G_c - G_p)/G_c] \times 100$$

$$G_c = A_c - A_m$$

$$G_p = A_p - A_{pm}$$

Sendo que, G_c representa o número de parasitas/mL nos poços controles e G_p , o número de parasitas/mL detectados em diferentes concentrações da substância. A_c corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência de substância) com parasitas; A_m representa ao valor da absorbância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasita; A_p , o valor da absorbância nos testes e A_{pm} , o valor da absorbância das diferentes concentrações de substância na ausência do parasita.

5.3 Ensaio de mutagenicidade do BNZ, NF e NFOH através do teste de micronúcleo

Para a avaliação da mutagenicidade *in vivo* dos fármacos nitrofurais (NF), hidroximetilnitrofurais (NFOH) e benznidazol (BNZ) foi empregado o teste de micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino) com aproximadamente 30g de peso corpóreo, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – Unesp. Os animais foram mantidos em gaiolas durante o período de tratamento, com água e alimento *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23± 2 °C.

O projeto de pesquisa para o desenvolvimento desse trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, sendo toda a metodologia de experimentação com animais aprovada.

Para os tratamentos os animais foram divididos em grupos de 10, sendo 5 machos e 5 fêmeas. Cada um deles recebeu as diferentes doses dos fármacos (NF, NFOH e BNZ) via gavagem.

Foi estabelecido um grupo controle positivo, no qual os animais foram tratados via intraperitoneal com ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.). O grupo controle negativo recebeu via gavagem 0,3 ml da suspensão de carboximetilcelulose (CMC) 1% e tween 0,2% e o grupo controle branco foi tratado apenas com água.

- Grupos de animais tratados com Nitrofurantoina (NF)

Grupo I: Controle negativo – CMC (1%) / Tween (0,2%)

Grupo II: Controle positivo – ciclofosfamida (50 mg/kg)

Grupo III: Controle branco – água

Grupo IV: NF – 50 mg/kg

Grupo V: NF – 100 mg/kg

Grupo VI: NF – 250 mg/kg

Grupo VII: NF – 500 mg/kg

- Grupos de animais tratados com Hidroximetilnitrofurantoina (NFOH)

Grupo I: Controle negativo – CMC (1%) / Tween (0,2%)

Grupo II: Controle positivo – ciclofosfamida (50 mg/kg)

Grupo III: Controle branco – água

Grupo IV: NFOH – 50 mg/kg

Grupo V: NFOH – 100 mg/kg

Grupo VI: NFOH – 250 mg/kg

Grupo VII: NFOH – 500 mg/kg

- Grupos de animais tratados com Benznidazol (BNZ)

Grupo I: Controle negativo – CMC (1%) / Tween (0,2%)

Grupo II: Controle positivo – ciclofosfamida (50 mg/kg)

Grupo III: Controle branco – água

Grupo III: BNZ – 50 mg/kg

Grupo IV: BNZ – 100 mg/kg

Grupo V: BNZ – 250 mg/kg

Grupo VI: BNZ – 500 mg/kg

O protocolo adotado para a realização deste trabalho foi o descrito por Hayashi et al. (1990), no qual se empregam lâminas pré-coradas por laranja de acridina (acridine orange).

5.3.1 Preparo das lâminas com laranja de acridina (acridine orange)

As lâminas (bem limpas) foram aquecidas em uma placa aquecedora a aproximadamente 70°C. Com as lâminas quentes, colocou-se 10µL de solução de laranja de acridina (1 mg/ml) sobre a lâmina e fez-se o espalhamento utilizando a extremidade de outra lâmina bem limpa. As lâminas foram secas ao ar e guardadas em caixa apropriada, a temperatura ambiente, em local escuro, por pelo menos 24h.

5.3.2 Obtenção do sangue e preparo das células

Com o auxílio de uma agulha, perfurou-se a cauda do animal, coletando-se 5µL de sangue (uma gota) e depositando-o no centro da lâmina previamente preparada com laranja de acridina, cobrindo-a com lamínula. As lâminas com o material biológico foram mantidas a – 20°C e no escuro por no mínimo 24 horas antes da análise citológica, propiciando uma melhor ação do corante.

A análise citológica das lâminas contendo o sangue periférico dos animais foi efetuada o mais rápido possível, para evitar a deterioração do material. Esta análise deve ser realizada em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488 nm) e filtro amarelo. Foram contados 1000 reticulócitos por animal e anotadas as frequências de células micronucleadas.

5.3.3 Análise estatística dos resultados

Após a análise citológica das lâminas contendo amostras do sangue periférico dos camundongos tratados com os fármacos, foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas, bem como os desvios padrão para cada um dos grupos de tratamento. A partir destes resultados foi aplicado um teste de Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que $P < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados com o software estatístico PRISMA.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em vista que o objetivo deste trabalho foi comprovar a importância da presença do grupo nitro na atividade antichagásica do fármaco nitrofural e sua influência na toxicidade (mutagenicidade), os compostos bioisósteros derivados de NF foram obtidos.

6.1 Síntese dos compostos 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (1), 1-[(5-(metilsulfonil)furan-2-il)metileno]semicarbazida (3) e 1-[(5-(hidroximetil)furan-2-il)metileno]semicarbazida (4)

O mecanismo de reação dos compostos 1, 3 e 4 está demonstrado na figura 21, o qual envolve a formação de imina. Os aldeídos reagem com aminas primárias para formar iminas. A formação de imina é catalisada por ácido, e o produto pode se formar como uma mistura de isômeros (*E*) e (*Z*).

A formação de imina geralmente ocorre mais rapidamente entre pH 4 e 5, e é lenta em pH muito baixo ou muito alto. A etapa importante para a formação de imina é aquela na qual o aminoálcool protonado perde uma molécula de água para tornar-se um íon imínio. Através da protonação do grupo álcool, o ácido converte um grupo abandonador ruim (um grupo –OH) em um bom grupo abandonador (um grupo –OH₂⁺) (SOLOMONS, 2006).

Um dos reagentes utilizado para a síntese dos compostos 1, 3 e 4 foi o cloridrato de semicarbazida (CH₅N₃O.HCl), portanto ao invés de ser adicionado ácido no meio reacional, adicionou-se acetato de sódio, pois sem a adição da base o meio reacional apresentava pH 2, e neste pH a reação segue mais lentamente, pois a concentração de íon hidrônio é muito alta, e a protonação da própria amina ocorre até uma extensão considerável; isso tem o efeito de diminuir a concentração do nucleófilo necessário na primeira etapa (SOLOMONS, 2006). Utilizando a base a reação ocorreu em pH entre 4 e 5, ideal para a formação de imina. Vale ressaltar que se a concentração de íon hidrônio é muito baixa, a reação torna-se muito mais lenta porque a concentração do aminoálcool protonado torna-se mais baixa (SOLOMONS, 2006).

A figura 21 apresenta o mecanismo de formação de imina, onde R= H (1); CH₃SO₂ (3); CH₂OH (4).

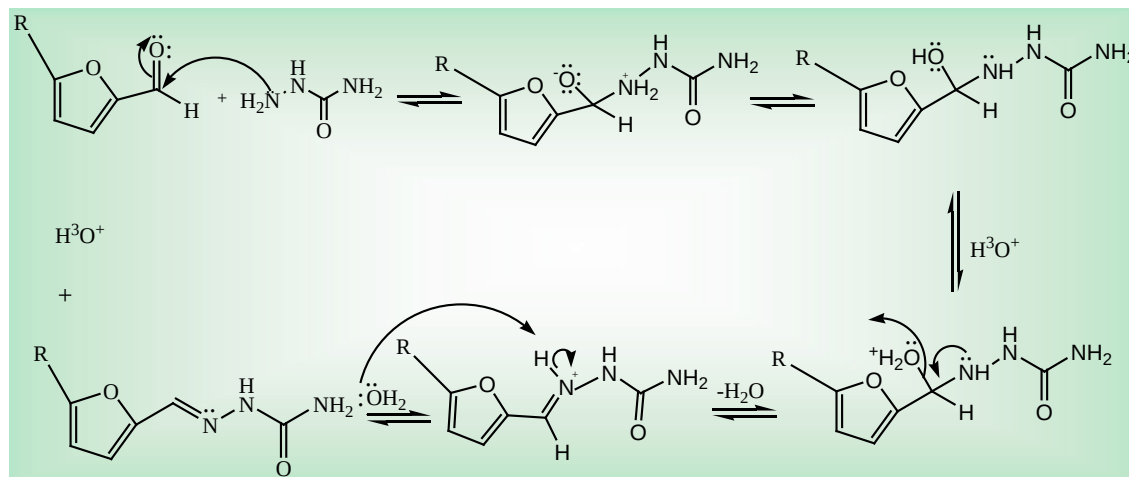


Figura 21. Mecanismo de reação de formação dos compostos 1, 3 e 4, onde R= H (1); CH₃SO₂ (3); CH₂OH (4).

6.1.1 Síntese do 1-((furan-2-il)metileno)semicarbazida (1)

O mecanismo de reação deste composto está representado na figura 21, onde R= H. Os reagentes utilizados para a síntese deste composto foram o furfural e o cloridrato de semicarbazida, sendo que suas estruturas foram comprovadas por espectrofotometria de absorção no infravermelho e RMN ¹H demonstrados nos espectros 01 (infravermelho) e 04 (RMN ¹H) para o furfural, e 02 (infravermelho) e 05 (RMN ¹H) para o cloridrato de semicarbazida. O composto obtido apresentou-se como um sólido perolado levemente amarelo, com faixa de fusão de 187,8 – 192,3°C, R_f = 0,85 e o rendimento da reação foi de 83%. A estrutura do composto foi comprovada por espectrofotometria de absorção no infravermelho (espectro 03, tabela 04) e espectrometria de RMN ¹H e ¹³C (espectros 06 e 07, respectivamente, tabela 05).

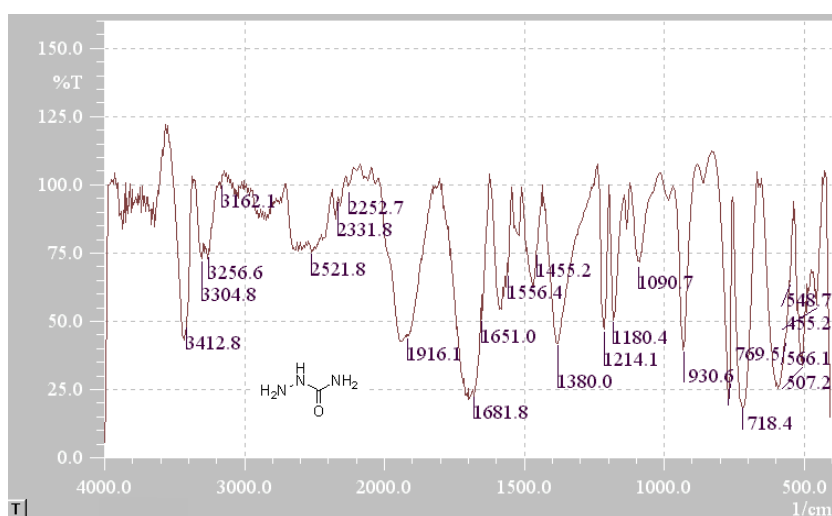
6.1.1.1 Espectrofotometria no infravermelho

Infravermelho (KBr) do reagente furfural (espectro 01, tabela 04): ν C=O (aldeído) = 1681 cm^{-1} ; ν C=C (anel furânico) = entre 1404 e 1558 cm^{-1} .



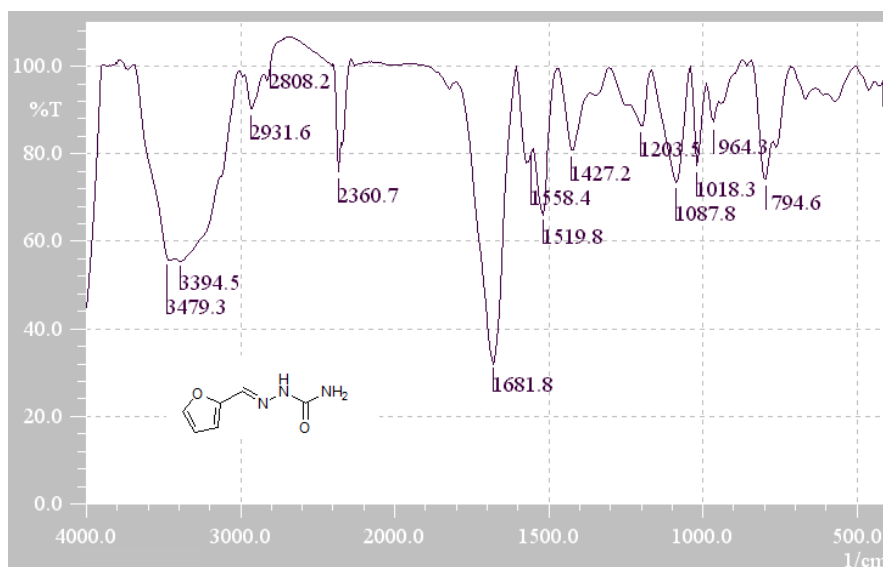
Espectro 01. Espectro no infravermelho do reagente furfural

Infravermelho (KBr) do reagente cloridrato de semicarbazida (espectro 02, tabela 04): ν N-H = 3256 cm^{-1} (simétrico) e 3304 cm^{-1} (assimétrico); ν C=O = 1681 cm^{-1} ; ν C-N = 1455 cm^{-1} .



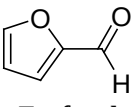
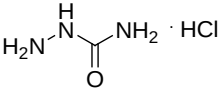
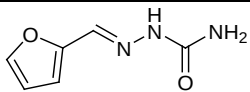
Espectro 02. Espectro no infravermelho do reagente cloridrato de semicarbazida

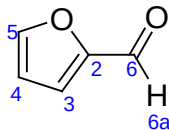
Infravermelho (KBr) do composto 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (espectro 03, tabela 04): ν N–H = 3394 cm^{-1} (simétrico) e 3479 cm^{-1} (assimétrico); ν C=O = 1681 cm^{-1} ; ν C=C (anel furânico) = entre 1519 e 1558 cm^{-1} ; ν C–N = 1427 cm^{-1} ; ν C–H simétricas e assimétricas = 2808 - 2931 cm^{-1} ; ν C–O = 1203 cm^{-1} .



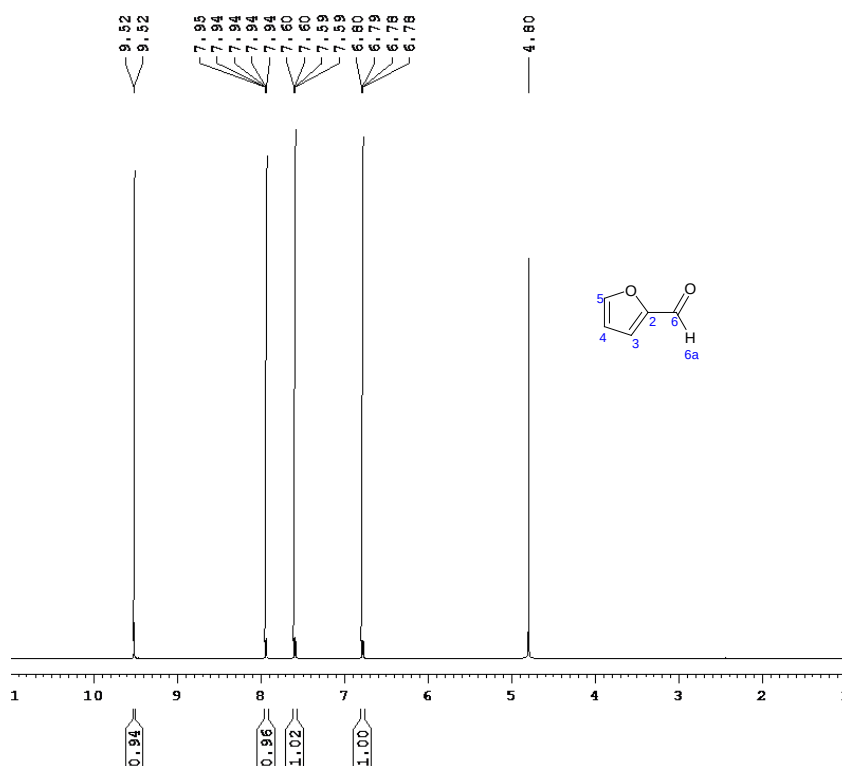
Espectro 03. Espectro no infravermelho do 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (1)

Tabela 04. Valores de absorção no infravermelho para os reagentes furfural e cloridrato de semicarbazida, e para o composto 1

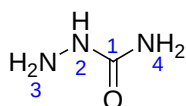
Compostos	Grupo funcional e número de onda (cm^{-1})					
	N–H (simétrica)	N–H (assimétrica)	C=O	C–N	C=C	C–O
 Furfural	—	—	1681	—	entre 1404 e 1558	—
 Cloridrato de Semicarbazida	3256	3304	1681	1455	—	—
 Composto 1	3394	3479	1681	1427	entre 1519 e 1558	1203

6.1.1.2 Espectrometria de RMN ^1H e RMN ^{13}C 

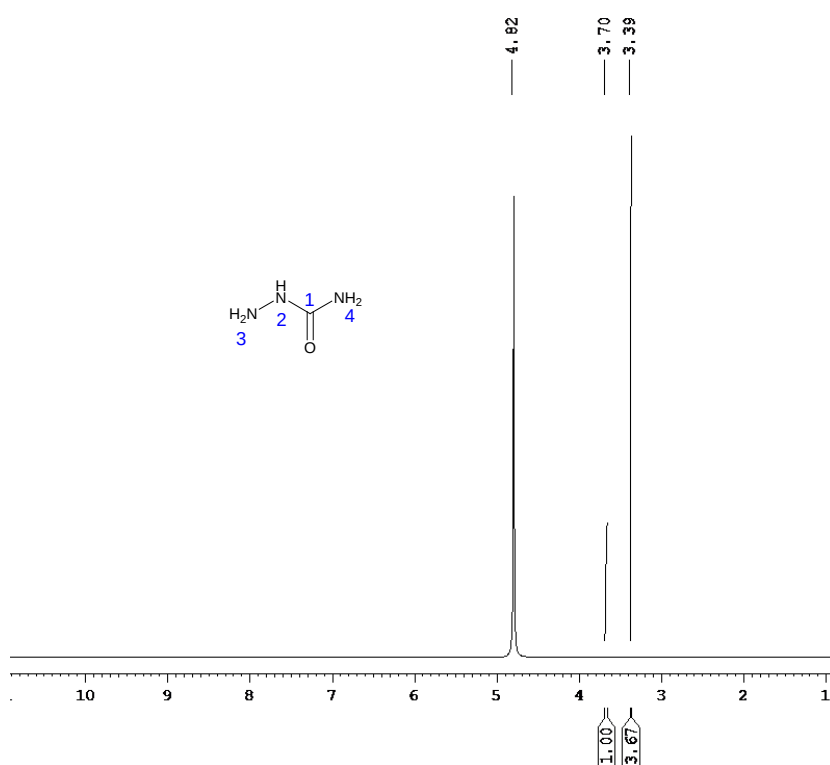
O espectro de RMN ^1H do reagente furfural (espectro 04) mostrou sinais de deslocamentos químicos em δ 7,95 referente ao hidrogênio 5 (multiplete, $J = 3,3$ Hz). Observa-se ainda um singlete em δ 9,52 que foi atribuído ao hidrogênio 6a, um dubleto em δ 6,79 ($J = 3,7$ Hz) referente ao hidrogênio 3; e um duplo dubleto ($J = 0,7$ Hz e $J = 3,7$ Hz) em δ 7,23 referente ao hidrogênio 4.



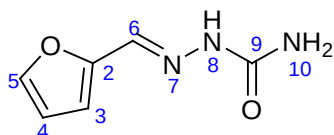
Espectro 04. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do reagente furfural



O espectro de RMN ^1H do reagente cloridrato de semicarbazida (espectro 05) mostrou sinais de deslocamentos químicos em δ 3,39, δ 3,70 e δ 4,82 referentes aos hidrogênios 4, 2 e 3, respectivamente.



Espectro 05. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do reagente cloridrato de semicarbazida

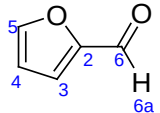
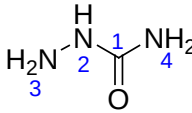
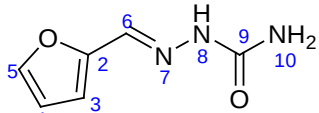


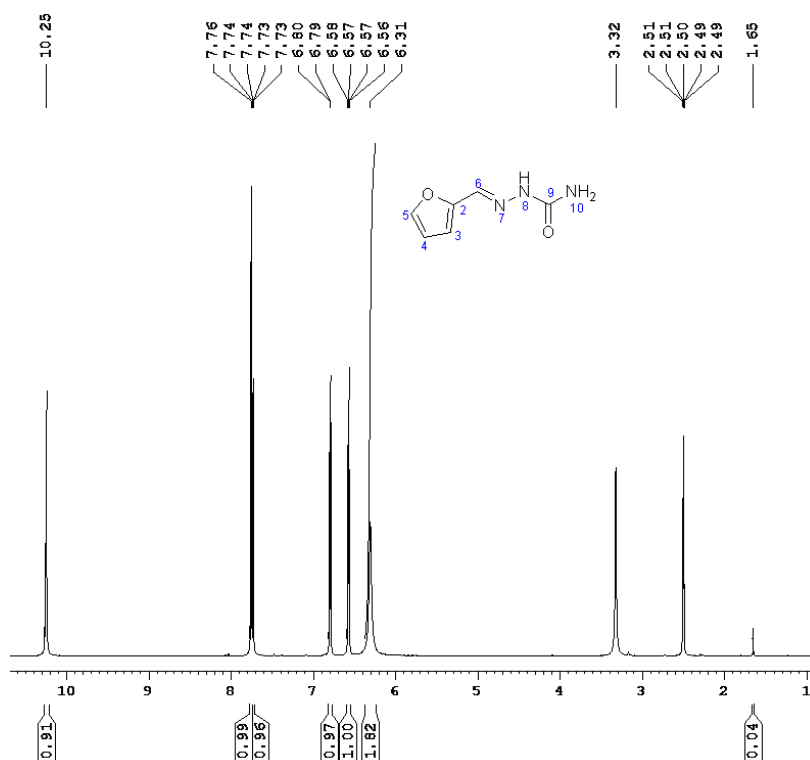
O espectro de RMN ^1H do composto 1 (espectro 06) mostrou sinais de deslocamentos químicos em δ 6,80 (dubleto, $J = 3,2$) e δ 7,74 (duplo dubleto, $J = 0,7$ e $3,2$) referentes aos

hidrogênios 3 e 4, respectivamente. Observa-se ainda três singletos em δ 7,76, δ 10,25 e δ 6,31 que foram atribuídos aos hidrogênios 6, 8 e 10 respectivamente, e um multiplete em δ 6,58 referente ao hidrogênio 5.

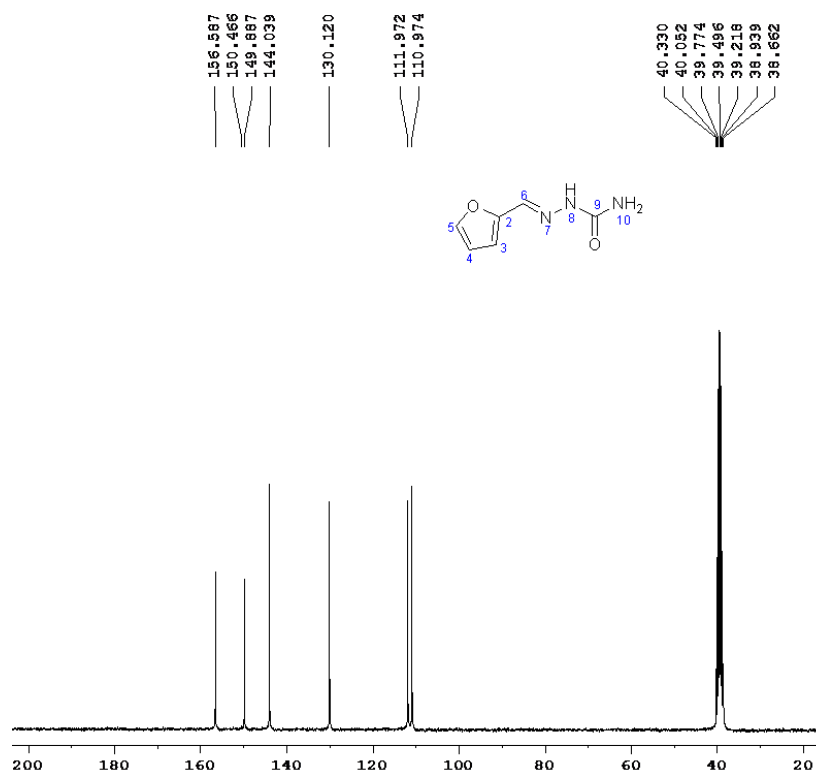
O espectro de RMN¹³C do composto 1 (espectro 07) apresentou sinais de 6 carbonos, sendo o carbono do grupo carbonila observado em δ 156,5 (carbono 9). A tabela 05 mostra os deslocamentos químicos de RMN ¹H dos reagentes furfural e cloridrato de semicarbazida, e do composto 1; e RMN ¹³C do composto 1.

Tabela 05. Deslocamentos químicos de RMN ¹H do furfural, cloridrato de semicarbazida e composto 1, e RMN ¹³C do composto 1 (DMSO_{d6}, 300 MHz para ¹H e 400 MHz para ¹³C).

Posição				
	¹ H Furfural	¹ H Semicarbazida	¹ H Composto 1	¹³ C Composto 1
2	—	3,70	—	150,4
3	6,79 (d, $J = 3,7$ Hz)	4,82	6,80 (d, $J = 3,2$ Hz)	110,9
4	7,23 (dd, $J = 0,7$ e 3,7 Hz)	3,39	7,74 (dd, $J = 0,7$ e 3,2 Hz)	111,9
5	7,95 (m, $J = 3,3$ Hz)	—	6,58 (m)	144,0
6	9,52 (s)	—	7,76 (s)	130,1
8	—	—	10,25 (s)	—
9	—	—	—	156,5
10	—	—	6,31 (s)	—



Espectro 06. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (1)



Espectro 07. Espectro de RMN ¹³C (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (1)

6.1.2 Síntese do 1-[[5-(metilsulfonil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (3)

Síntese do [5-(metilsulfonil)furano-2-carbaldeído] (2)

A obtenção do aldeído planejado consistiu em reação de substituição nucleofílica SN_2 , figura 22, do reagente 5-bromo-2-furfural e o sal metanosulfinato de sódio.

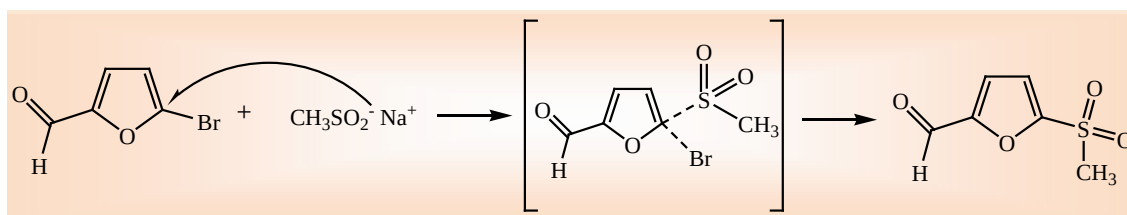


Figura 22. Mecanismo de reação de substituição nucleofílica SN_2 (MARCH, 2001)

Esta reação se caracteriza pelo encontro de um nucleófilo e um haleto de arila, onde o nucleófilo ataca diretamente o carbono deslocando o íon haleto. O ataque do nucleófilo sempre é ao longo do eixo de ligação C-X, o caminho de menor energia para a reação. Uma das principais características da reação SN_2 é que o processo provoca uma inversão da configuração do átomo de carbono ligado ao grupo de saída (inversão de Walden). Outro detalhe importante nesta reação é que não se observa a formação de intermediário iônico (MARCH, 2001).

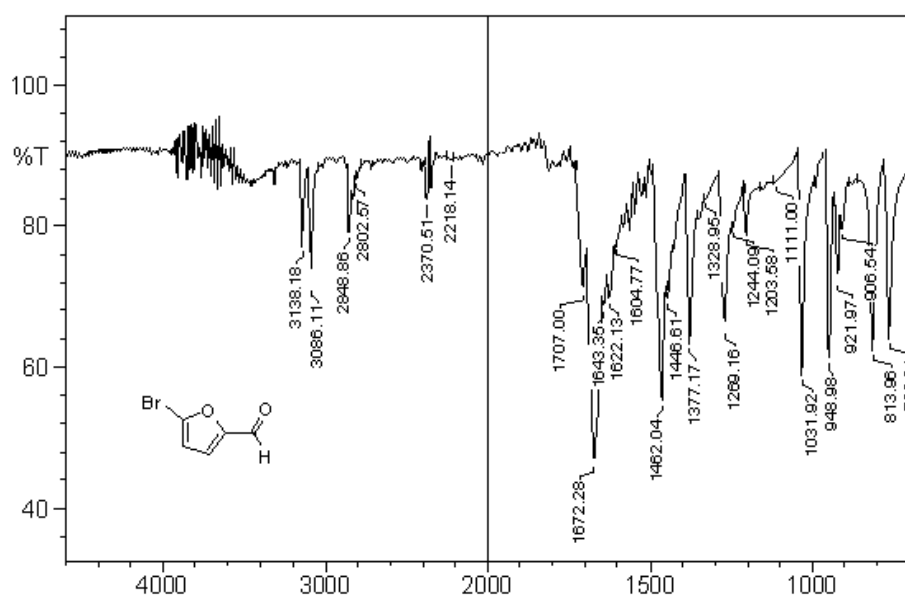
Os reagentes utilizados para a síntese deste composto foram o 5-bromo-2-furfural e o sal metanosulfinato de sódio, sendo que a estrutura do 5-bromo-2-furfural foi comprovada por espectrofotometria de absorção no infravermelho e espectrometria de RMN 1H demonstrados nos espectros 08 (infravermelho) e 11 (RMN 1H). O produto apresentou aspecto oleoso, de coloração marrom e $R_f = 0,85$. O composto 2 foi avaliado por espectrofotometria de absorção no infravermelho e espectrometria de RMN 1H , e os resultados estão demonstrados nos espectros 09 (infravermelho) e 12 (RMN 1H).

Posteriormente reagiu-se o composto [5-(metilsulfonil)furano-2-carbaldeído] com o cloridrato de semicarbazida para a possível formação do produto 1-[[5-(metilsulfonil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (3).

O mecanismo de reação do composto 3 está representado na figura 21, onde $R=CH_3SO_2$. O produto apresentou-se como um sólido levemente marrom, com faixa de fusão de 210, 4 – 216,8 °C, $R_f = 0,37$ e o rendimento desta reação foi muito baixo (13%) após a cristalização. O composto 3 foi avaliado por espectrofotometria de absorção no infravermelho e espectrometria de RMN 1H e ^{13}C , sendo que os resultados estão demonstrados nos espectros 10 (infravermelho, tabela 06), 13 e 14 (RMN 1H e ^{13}C , respectivamente, tabela 07). Diante dos resultados obtidos nos espectros de infravermelho e de RMN 1H e ^{13}C do composto 3, não foi possível confirmar a estrutura do produto obtido. Novas rotas sintéticas deverão ser utilizadas para posterior obtenção do composto 3.

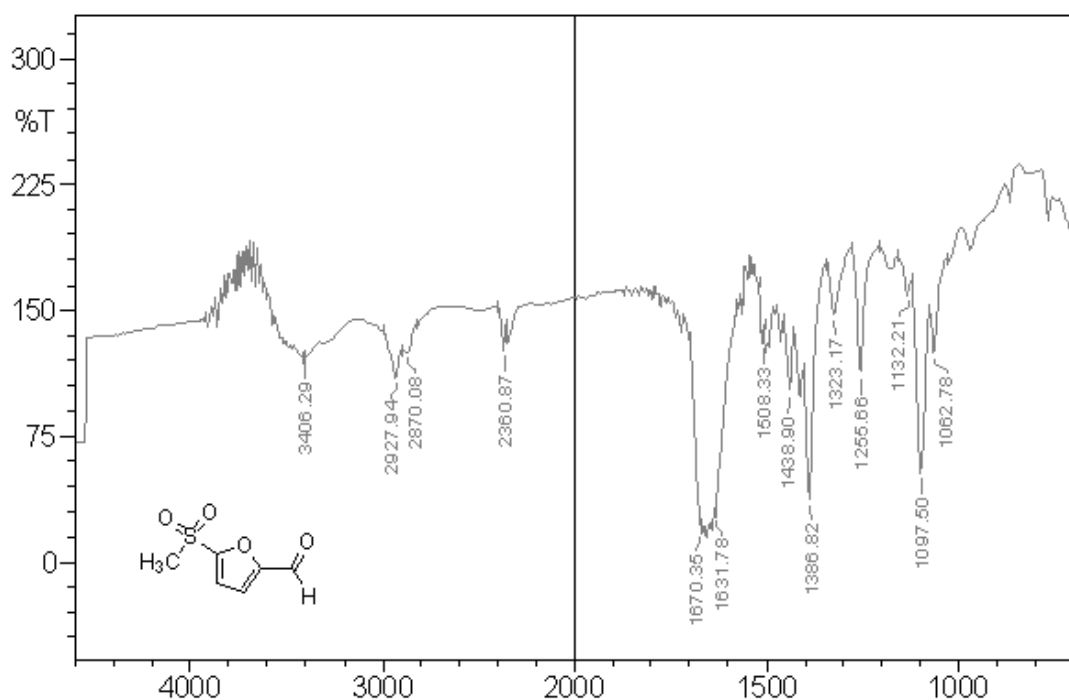
6.1.2.1 Espectrofotometria no infravermelho

Infravermelho (KBr) do reagente 5-bromo-2-furfural (espectro 08, tabela 06): ν C=O (aldeído) = 1672 cm^{-1} ; ν C-Br = 763 cm^{-1} ; ν C=C (anel furânico) = 1446, 1462 e 1604 cm^{-1} ; ν C-O = 1269 cm^{-1} .



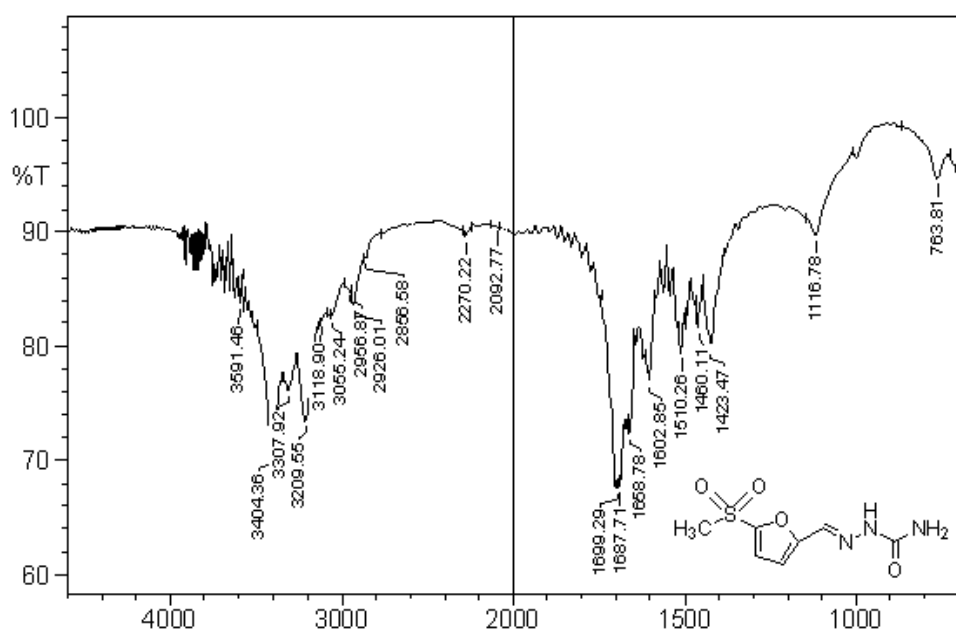
Espectro 08. Espectro no infravermelho do reagente 5-bromo-2-furfural

Infravermelho (KBr) do composto 5-(metilsulfonil)furano-2-carbaldeído (espectro 09, tabela 06): ν SO₂ = 1323-1386 cm⁻¹ (assimétrica) e 1097-1132 cm⁻¹ (simétrica); ν C=O = 1670 cm⁻¹; ν C=C (anel furânico) = entre 1438 e 1508 cm⁻¹; ν C-O = 1255 cm⁻¹.



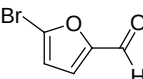
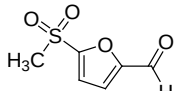
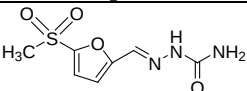
Espectro 09. Espectro no infravermelho do [5-(metilsulfonil)furano-2-carbaldeído] (2)

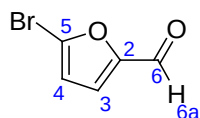
Infravermelho (KBr) do composto 1-[(5-(metilsulfonil)furan-2-il)metileno]semicarbazida (espectro 10, tabela 06): ν SO simétrico = 1116 cm^{-1} ; ν C=O = 1689 cm^{-1} ; ν C=C (anel furânico) = entre 1423 e 1602 cm^{-1} ; ν C-H = 2926 cm^{-1} ; ν N-H simétrica e assimétrica = 3307 cm^{-1} e 3404 cm^{-1} .



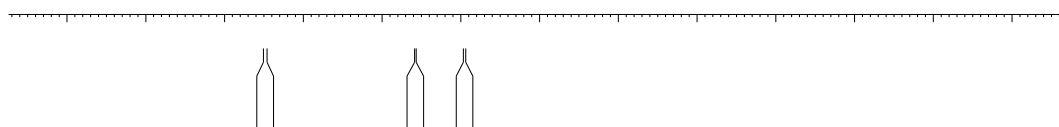
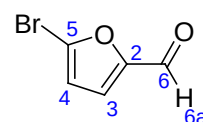
Espectro 10. Espectro no infravermelho do 1-[(5-(metilsulfonil)furan-2-il)metileno]semicarbazida (3)

Tabela 06. Valores de absorção no infravermelho para o reagente 5-bromo-2-furfural e para os compostos 2 e 3

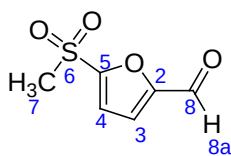
Compostos	Grupamentos e número de onda (cm^{-1})					
	N-H (simétrica)	N-H (assimétrica)	C=O	SO ₂	C=C	C-O
 5-bromo-2-furfural	—	—	1689	—	entre 1446 e 1694	1269
 Composto 2	—	—	1670	entre 1323 e 1386	entre 1438 e 1508	1255
 Composto 3	3307	3404	1689	1116	entre 1423 e 1602	1203

6.1.2.2 Espectrometria de RMN ^1H e RMN ^{13}C 

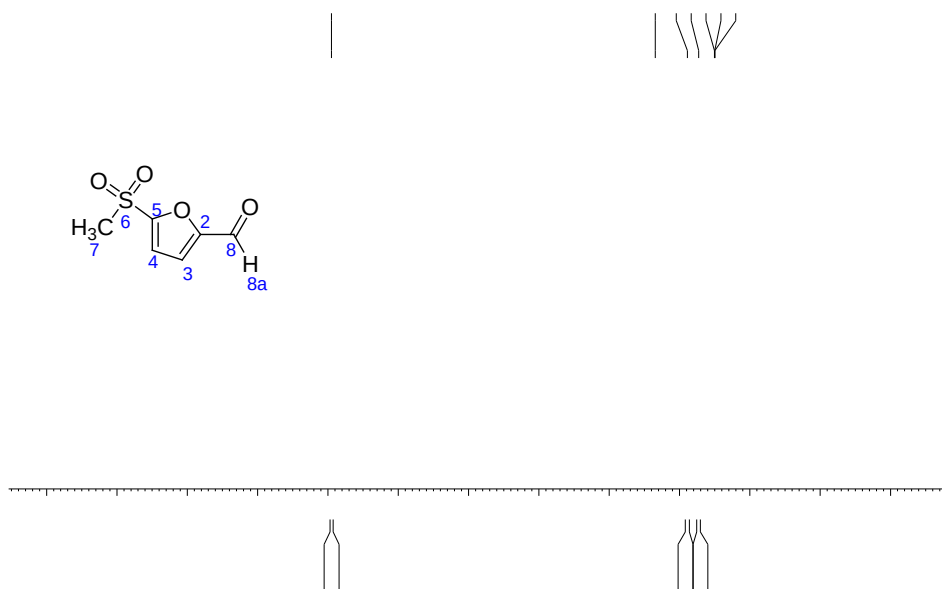
O espectro de RMN ^1H do reagente 5-bromo2-furfural (espectro 11) mostrou sinais de deslocamentos químicos em δ 7,57 e δ 6,95, referente aos hidrogênio 3 e 4, respectivamente e ambos os sinais aparecem como dubletos ($J = 3,4$ Hz). Observa-se ainda um singlete em δ 9,47 que foi atribuído ao hidrogênio 6a.



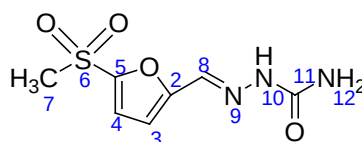
Espectro 11. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 5-bromo-2-furfural



O espectro de RMN ^1H do [5-(metilsulfonil)furano-2-carbaldeído] (espectro 12) mostrou apenas dois sinais de deslocamentos químicos, um singlete em δ 7,95, o qual sugere-se à atribuição ao hidrogênio 8a, e um outro singlete em δ 2,88 referente ao hidrogênio 7. Neste espectro, não foi possível observar os deslocamentos químicos dos hidrogênios 3 e 4.



Espectro 12. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do [5-(metilsulfonil)furano-2-carbaldeído] (2)



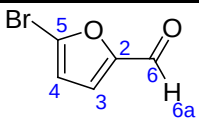
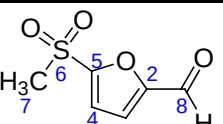
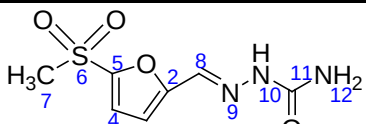
O espectro de RMN ^1H do composto 3 (espectro 13) mostrou sinais de deslocamento químico em δ 2,08 o qual sugere-se à atribuição ao hidrogênio 7 (singlete). Observa-se ainda

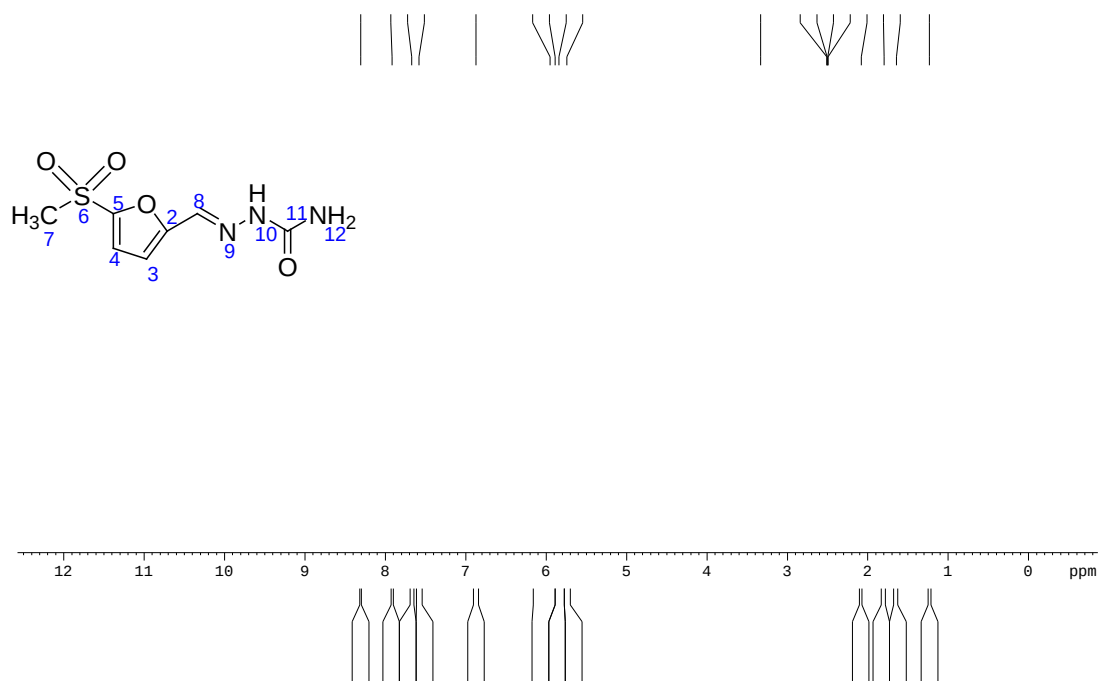
cinco singletos, em δ 7,58, δ 6,87, δ 7,67, δ 8,30 e δ 5,94 os quais sugerem-se às atribuições aos hidrogênios 3, 4, 8, 10 e 12, respectivamente.

O espectro de RMN¹³C do composto 3 (espectro 14) apresentou sinais de apenas 5 carbonos, sendo o carbono 5 observado em δ 206,5 possivelmente devido à deslocalização de carga pelo anel furano ou pela ligação ao grupo sulfona que torna o carbono menos deficiente de elétrons (SILVERSTEIN, 2000). Não foi possível a visualização dos carbonos 3 e 4 do composto 3.

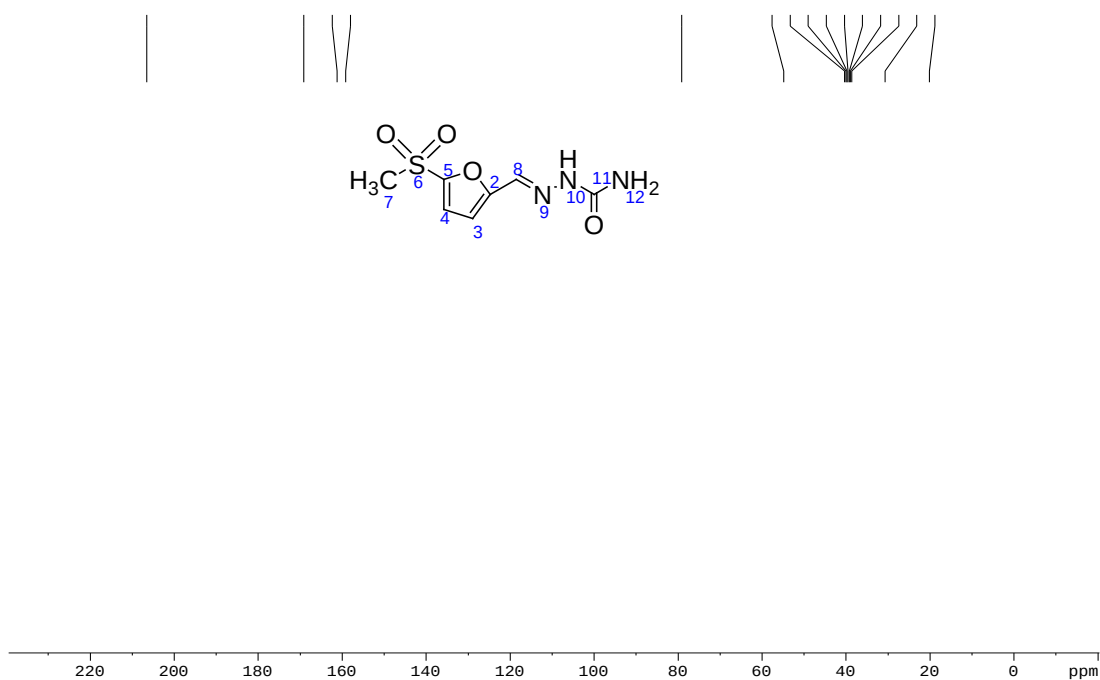
Diante dos dados obtidos nos espectros de RMN ¹H e ¹³C não se pode afirmar que o composto 3 foi obtido com sucesso. A tabela 07 mostra os deslocamentos químicos de RMN ¹H do reagente 5-bromo-2-furfural e dos compostos 2 e 3; e RMN ¹³C do composto 3.

Tabela 07. Deslocamentos químicos de RMN ¹H do reagente 5-bromo-2-furfural, dos compostos 2 e 3, e RMN ¹³C do composto 3 (DMSO_{d6}, 300 MHz para ¹H e 400 MHz para ¹³C).

Posição	 ¹ H 5-bromo-2-furfural	 ¹ H Composto 2	 ¹ H Composto 3	¹³ C Composto 3
2	—	—	—	159,2
3	7,57 (d, $J = 3,4$ Hz)	—	7,58 (s)	—
4	6,95 (d, $J = 3,4$ Hz)	—	6,87 (s)	—
5	—	—	—	206,5
6	9,47 (s)	—	—	—
7	—	2,88 (s)	2,08 (s)	54,8
8	—	—	7,67 (s)	161,1
9	—	7,95 (s)	—	169,1
10	—	—	8,30 (s)	—
12	—	—	5,94 (s)	—



Espectro 13. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(5-(metilsulfonyl)furan-2-il)metileno]semicarbazida (3)



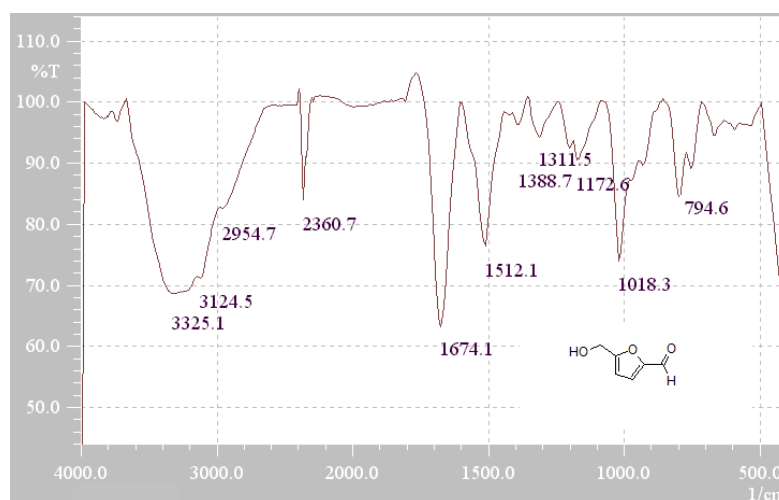
Espectro 14. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(5-(metilsulfonyl)furan-2-il)metileno]semicarbazida (3)

6.1.3 Síntese do 1-[(5-hidroximetil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (4)

O mecanismo de reação deste composto está representado na figura 21, onde $R=CH_2OH$. Os reagentes utilizados para a síntese deste composto foram o hidroximetilfurfural e o cloridrato de semicarbazida, sendo que suas estruturas foram comprovadas por espectrofotometria de absorção no infravermelho e espectrometria de RMN 1H , demonstrados nos espectros 15 (infravermelho) e 17 (RMN 1H) para o hidroximetilfurfural, e 02 (infravermelho) e 05 (RMN 1H) para o cloridrato de semicarbazida. O produto obtido apresentou-se como um sólido branco amarelado, com faixa de fusão de 196 – 199,6 °C, $R_f = 0,4$ e o rendimento da reação foi de 59% após a cristalização. A estrutura do composto foi comprovada por espectrofotometria de absorção no infravermelho (espectro 16, tabela 08) e espectrometria de RMN 1H e ^{13}C (espectros 18 e 19, respectivamente, tabela 09).

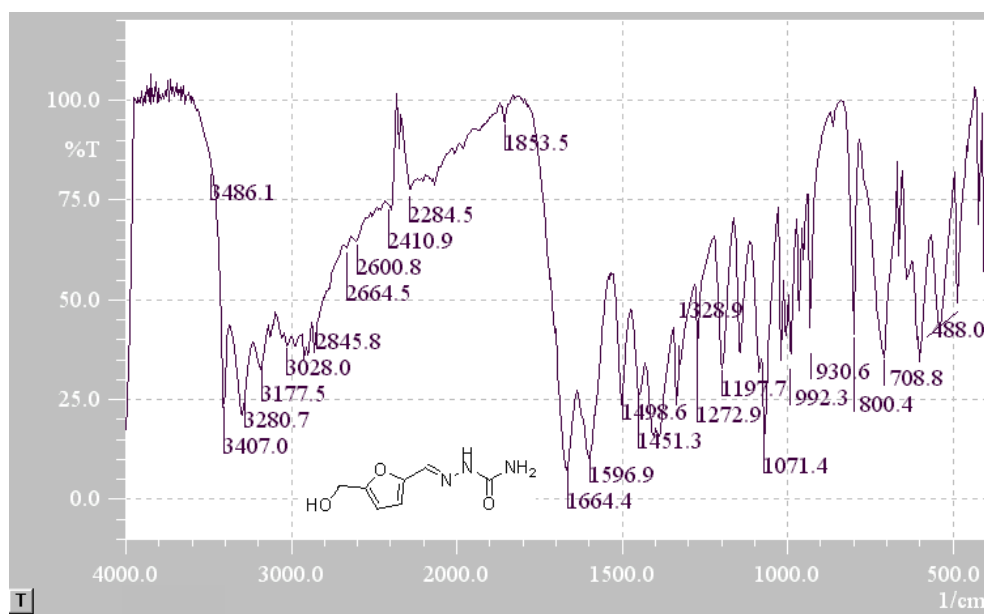
6.1.3.1 Espectrofotometria no infravermelho

Infravermelho (KBr) do reagente hidroximetilfurfural (espectro 15, tabela 08): $\nu C=O = 1674\text{ cm}^{-1}$; $\nu C=C$ (anel furânico) = 1512 cm^{-1} ; $\nu C-H$ simétricas e assimétricas = 2954 cm^{-1} ; $\nu O-H = 3325\text{ cm}^{-1}$.



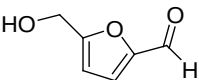
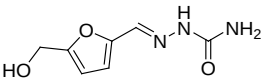
Espectro 15. Espectro no infravermelho do reagente hidroximetilfurfural

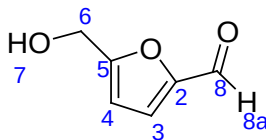
Infravermelho (KBr) do composto 1-[(5-hidroximetil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (espectro 16, tabela 08): ν N-H simétrica e assimétrica = 3177 e 3280 cm^{-1} ; ν O-H = sobreposição entre 3407 e 3486 cm^{-1} ; ν C=O = 1664 cm^{-1} ; ν C-O = 1272 cm^{-1} ; ν C-N = 1451 cm^{-1} ; ν C=C (anel furânico) = sobreposição entre 1451 e 1596 cm^{-1} ; ν C-H simétricas e assimétricas = 2284-2845 cm^{-1} .



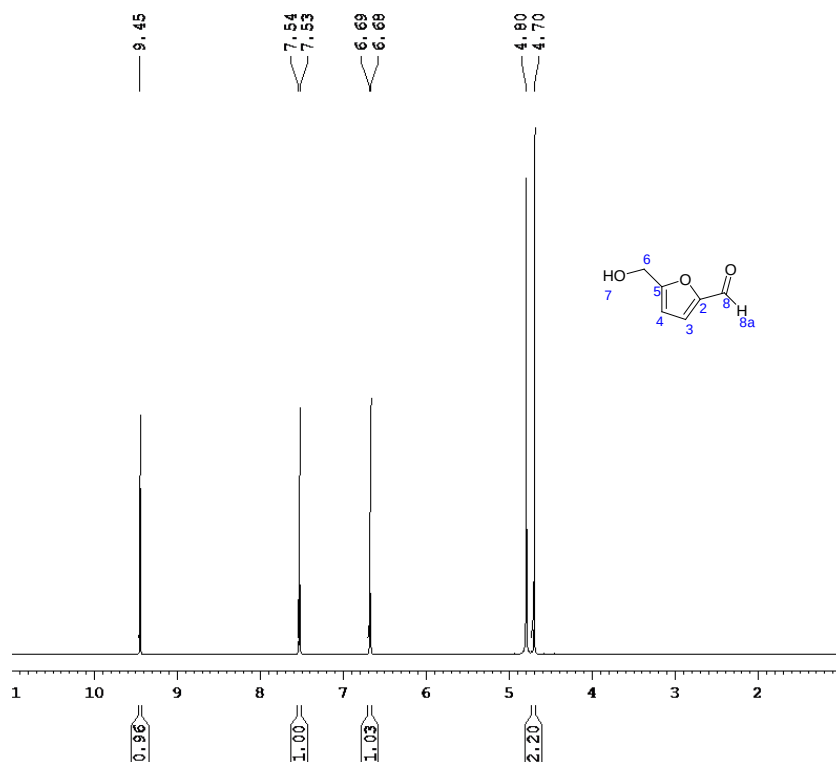
Espectro 16. Espectro no infravermelho do 1-[(5-hidroximetil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (4)

Tabela 08. Valores de absorção no infravermelho para o reagente hidroximetilfurfural e para o composto 4

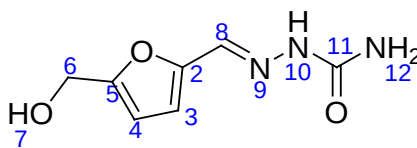
Compostos	Grupamentos e número de onda (cm^{-1})					
	N-H (simétrica)	N-H (assimétrica)	C=O	O-H	C=C	C-O
 Hidroximetilfurfural	—	—	1674	3325	1512	—
 Composto 4	3177	3280	1664	entre 3407 e 3486	entre 1451 e 1596	1272

6.1.3.2 Espectrometria de RMN ^1H e RMN ^{13}C 

O espectro de RMN ^1H do reagente hidroximetilfurfural (espectro 17) mostrou sinais de deslocamentos químicos em δ 4,80 referente ao hidrogênio 6 (singleto). Observa-se ainda um singleto em δ 9,61 que foi atribuído ao hidrogênio 8a; e dois dubletos, um em δ 7,54 ($J=3,2$ Hz) referente ao hidrogênio 3 e outro em δ 6,68 ($J=3,5$ Hz) referente ao hidrogênio 4.



Espectro 17. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do reagente hidroximetilfurfural

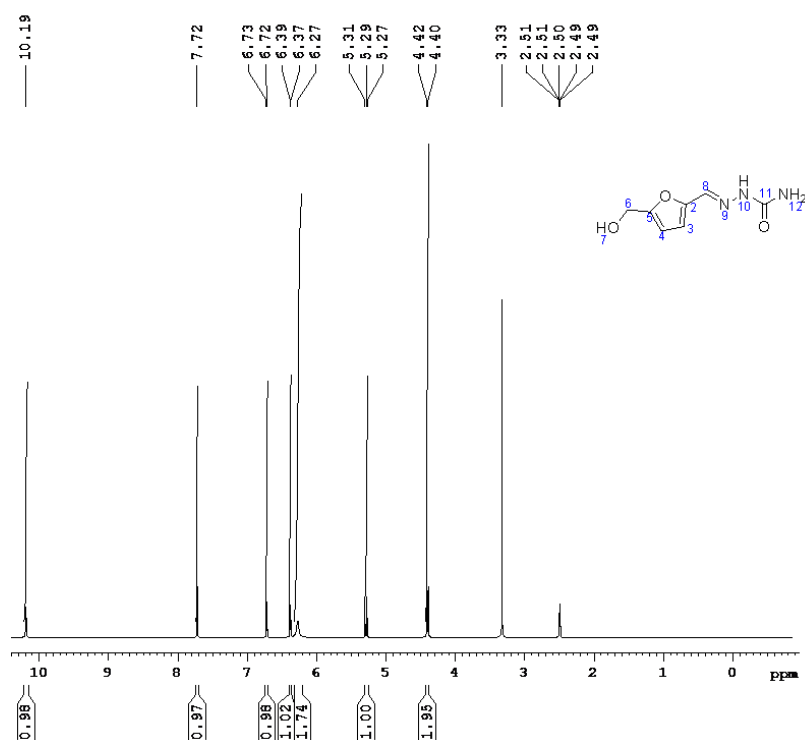


O espectro de RMN ^1H do composto 4 (espectro 18) mostrou sinais de deslocamento químico em δ 5,31 referente ao hidrogênio 7 (triplete). Observa-se ainda três singletos em δ 7,72, δ 10,19 e δ 6,27 que foram atribuídos aos hidrogênios 8, 10 e 12, respectivamente; e três dubletos, em δ 6,73 ($J = 3,3$ Hz), δ 6,39 ($J = 3,2$ Hz) e δ 4,44 ($J = 5,8$ Hz) referentes aos hidrogênios 3, 4 e 6, respectivamente.

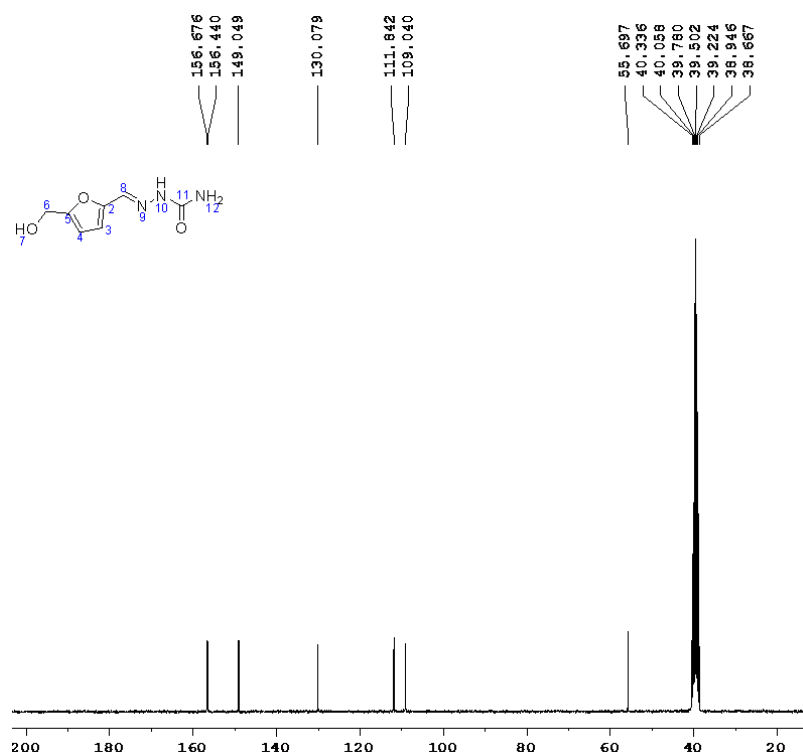
O espectro de RMN ^{13}C do composto 4 (espectro 19) apresentou sinais de 7 carbonos, sendo o carbono do grupo carbonila observado em δ 156,67 (carbono 11) e o carbono carbinólico observado em δ 55,7. A tabela 09 mostra os deslocamentos químicos de RMN ^1H do reagente hidroximetilfurfural e do composto 4; e RMN ^{13}C do composto 4.

Tabela 09. Deslocamentos químicos de RMN ^1H do hidroximetilfurfural e composto 4, e RMN ^{13}C do composto 4 (DMSO- d_6 , 300 MHz para ^1H e 400 MHz para ^{13}C).

Posição	 ^1H Hidroximetilfurfural	 ^1H Composto 4	^{13}C Composto 4
2	—	—	149,0
3	7,54 (d, $J = 3,2$ Hz)	6,73 (d, $J = 3,3$ Hz)	109,0
4	6,68 (d, $J = 3,5$ Hz)	6,39 (d, $J = 3,2$ Hz)	111,8
5	—	—	156,4
6	4,8 (s)	4,4 (d, $J = 5,8$ Hz)	55,7
7	—	5,31 (t)	—
8	9,61 (s)	7,72 (s)	130,0
9	—	—	—
10	—	10,19 (s)	—
11	—	—	156,6
12	—	6,27 (s)	—



Espectro 18. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do 1-[(5-hidroximetil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (4)



Espectro 19. Espectro de RMN ¹³C (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do 1-[(5-hidroximetil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (4)

6.2 Síntese do 1-[{5-(carboxil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (5)

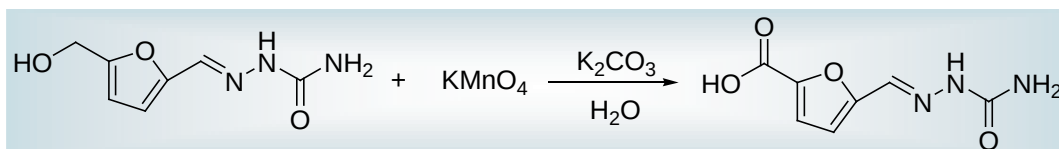
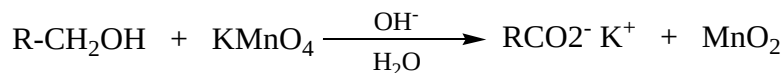


Figura 23. Mecanismo de reação do 1-[{5-(carboxil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (5)

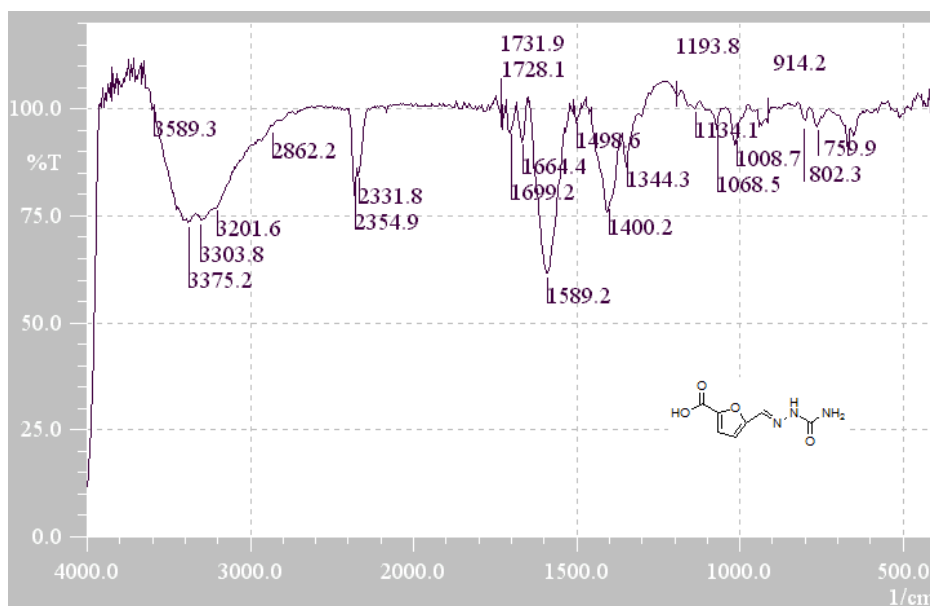
A síntese do 1-[{5-(carboxil)furan-2-il}metileno]semicarbazida foi baseada na oxidação de alcoóis primários em ácidos carboxílicos. Os alcoóis primários podem ser oxidados à ácidos carboxílicos pelo permanganato de potássio. A reação é normalmente realizada em solução aquosa básica, a partir da qual o MnO_2 precipita-se à medida que a oxidação ocorre. Após a oxidação estar completa, a filtração permite a remoção do MnO_2 e acidificação do filtrado fornece o ácido carboxílico (SOLOMONS, 2006).

Para a síntese do composto 1-[{5-(carboxil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (5) reagiu-se o composto 4 com permanganato de potássio em meio básico, promovendo a oxidação da hidroxila, gerando um ácido carboxílico. O composto obtido apresentou-se como um sólido amarelado, faixa de fusão de 175,6 – 188,7, $R_f = 0,4$ e o rendimento da reação foi de 82%. A estrutura do composto foi comprovada por espectrofotometria de absorção no infravermelho (espectro 20, tabela 10) e espectrometria de RMN ^1H e ^{13}C (espectros 21 e 22, respectivamente, tabela 11).

6.2.1 Espectrofotometria no infravermelho

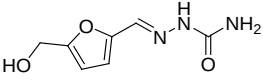
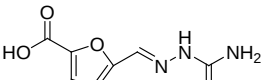
Infravermelho (KBr) do composto 1-[{5-(carboxil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (espectro 20, tabela 10): ν N–H simétrica e assimétrica = 3201 e 3375 cm^{-1} ; ν O–H (ácido carboxílico) = 3303 cm^{-1} . Vale ressaltar que os dímeros de ácido carboxílico produzem uma

absorção de deformação axial de O-H intensa e larga na região de $3300 - 2500 \text{ cm}^{-1}$, sendo que a banda é usualmente centrada em 3.300 cm^{-1} (SILVERSTEIN, 1994); $\nu \text{ C=O} = 1589 \text{ cm}^{-1}$; $\nu \text{ C=O}$ (ácido carboxílico) = 1731 cm^{-1} ; $\nu \text{ C-N} = 1344 \text{ cm}^{-1}$; $\nu \text{ C=C}$ (anel furânico) = sobreposição entre 1400 e 1589 cm^{-1} .

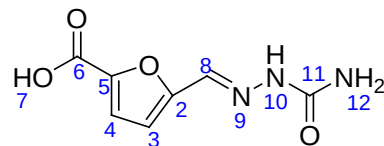


Espectro 20. Espectro no infravermelho do 1-[(5-(carboxil)furan-2-il)metileno]semicarbazida (5)

Tabela 10. Valores de absorção no infravermelho para os compostos 4 e 5

Compostos	Grupamentos e número de onda (cm^{-1})					
	N-H (simétrica)	N-H (assimétrica)	C=O	O-H	C=C	C-O
 Composto 4	3177	3280	1664	entre 3407 e 3486	entre 1451 e 1596	1272
 Composto 5	3201	3375	1731	3303	entre 1400 e 1589	—

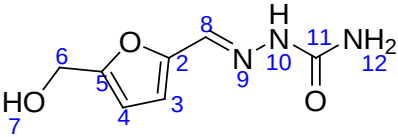
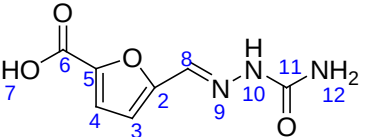
6.2.2 Espectrometria de RMN ^1H e RMN ^{13}C

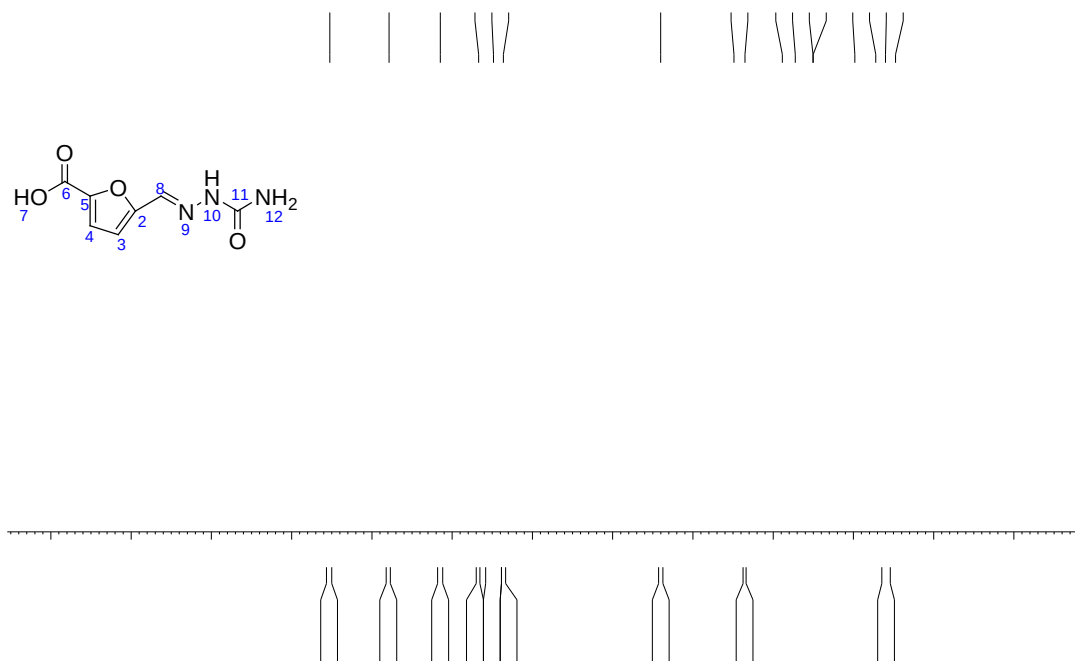


O espectro de RMN ^1H do composto 5 (espectro 21) mostrou sinais de deslocamento químico em δ 6,67 referente ao hidrogênio 3 (singlete), em δ 6,36 o qual foi atribuído ao hidrogênio 4 (dubleto, $J = 3,2$ Hz). Observa-se ainda quatro singletos em δ 8,52, δ 7,78, δ 7,14 e δ 6,48 que foram atribuídos aos hidrogênios 7, 8, 10 e 12, respectivamente.

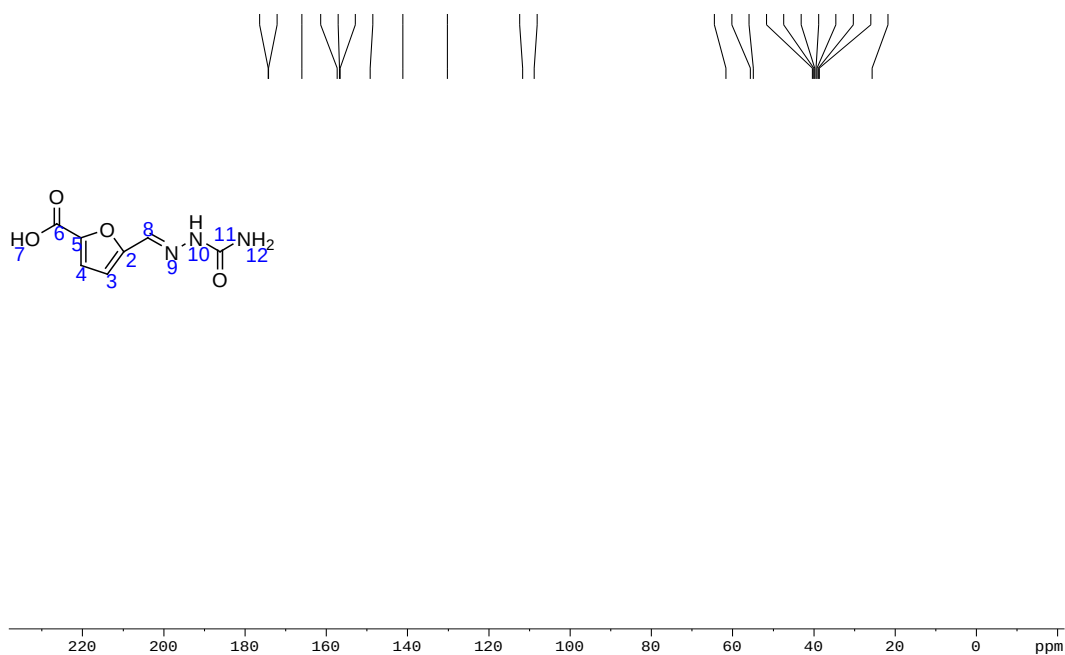
O espectro de RMN ^{13}C do composto 5 (espectro 22) apresentou sinais de 7 carbonos, sendo o carbono do grupo carbonila observado em δ 157,4 (carbono 11), e o carbono do grupo ácido carboxílico observado em δ 166,0 (carbono 6). A tabela 11 mostra os deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos 4 e 5.

Tabela 11. Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos 4 e 5 (DMSO-d_6 , 300 MHz para ^1H e 400 MHz para ^{13}C).

Posição	 ^1H Composto 4 ^{13}C Composto 4		 ^1H Composto 5 ^{13}C Composto 5	
2	—	149,0	—	149,2
3	6,73 (d, $J = 3,3$ Hz)	109,0	6,67 (s)	108,6
4	6,39 (d, $J = 3,2$ Hz)	111,8	6,36 (d, $J = 3,2$ Hz)	111,6
5	—	156,4	—	156,6
6	4,4 (d, $J = 5,8\text{Hz}$)	55,7	—	166,0
7	5,31 (t)	—	8,52 (s)	—
8	7,72 (s)	130,0	7,78 (s)	130,1
9	—	—	—	—
10	10,19 (s)	—	7,14 (s)	—
11	—	156,6	—	157,4
12	6,27 (s)	—	6,48 (s)	—



Espectro 21. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(5-(carboxil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (5)



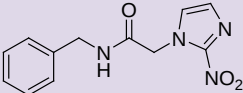
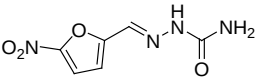
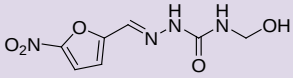
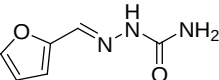
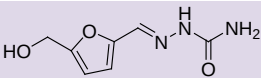
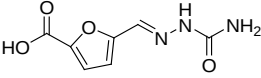
Espectro 22. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-[(5-(carboxil)furan-2-il]metileno]semicarbazida (5)

6.3 Avaliação da atividade antichagásica dos compostos sintetizados

Os compostos sintetizados, exceto o composto 3 que não teve sua estrutura confirmada, foram avaliados em relação à atividade antichagásica sendo que os resultados foram comparados com os fármacos benznidazol (substância padrão) e nitrofural (NF), e com o candidato a fármaco hidroximetilnitrofural (NFOH).

Os resultados da avaliação da atividade antichagásica dos compostos 1-[(furan-2-il)metileno]semicarbazida (1), 1-[{5-(hidroximetil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (4) e 1-[{5-(carboxil)furan-2-il}metileno]semicarbazida (5), estão demonstrados na tabela 12.

Tabela 12. Resultados da atividade antichagásica dos compostos isómeros de NF

Substância	Concentrações							IC 50
	(µg/mL)							(µg/mL)
	100	50	25	10	5,0	2,5	1,0	
Resultados								
 Benznidazol*								9,01
 Nitrofural	100%	100%	100%	71%	61%	2%	0	4,63
 Hidroximetilnitrofural	100%	100%	61%	26%	0	0	0	20,71
 Composto 1	0	0	0	0	0	0	0	SA
 Composto 4	0	0	0	0	0	0	0	SA
 Composto 5	43%	10%	7%	7%	5%	0	0	SA

SA = sem atividade

*benznidazol (substância padrão, IC 50 = 9,01 µg/mL)

O emprego do bioisosterismo como estratégia de modificação molecular para a descoberta de novos agentes bioativos permite que se antecipe uma comparável afinidade entre duas substâncias bioisostéricas por um dado sítio receptor e, conseqüentemente, um potencial de atividade biológica similar. Entretanto quando as substituições bioisostéricas são efetuadas em grupamentos funcionais considerados farmacofóricos, presentes na estrutura de um determinado fármaco ou de um composto protótipo, as alterações físico-químicas introduzidas podem ser suficientes para modificarem drasticamente, atenuando ou abolindo, as respostas farmacodinâmicas deste composto (BARREIRO, 2008).

Embora os grupamentos envolvidos na modificação molecular pretendida possam ser considerados isostéricos, a atividade relativa dos compostos resultantes modificou-se drasticamente, ou seja, de acordo com os resultados é possível observar que os compostos sintetizados isósteros de NF não apresentaram atividade antichagásica nas formas epimastigotas em nenhuma das concentrações utilizadas devido à substituição do grupo nitro.

Diante dos dados obtidos, os resultados demonstraram ser desnecessária a hidroximetilação dos compostos obtidos isósteros de NF, uma vez que o grupo nitro demonstrou ser essencial para a atividade antichagásica do NF e, assim sendo, também do NFOH.

Os resultados obtidos no teste de avaliação antichagásica demonstram a necessidade da presença do grupo nitro na molécula de NF, entretanto, uma vez que literatura demonstra a toxicidade de compostos nitrofurânicos em decorrência do grupo nitro, a segunda parte deste trabalho destina-se ao estudo da mutagenicidade do candidato a fármaco NFOH, comparando-o ao NF e ao BNZ. Para tanto, preparou-se o NFOH conforme o procedimento descrito por Chung (1996).

6.4 Síntese do hidroximetilnitrofural

Para a preparação do NFOH partiu-se da matéria-prima NF, a qual apresentou faixa de fusão de 222-232°C. A figura 24 mostra o mecanismo da reação de formação do derivado hidroximetilado (NFOH). A preparação do NFOH a partir do NF foi realizada por adição nucleofílica à carbonila de aldeído, reproduzindo o método descrito por Chung (1996).

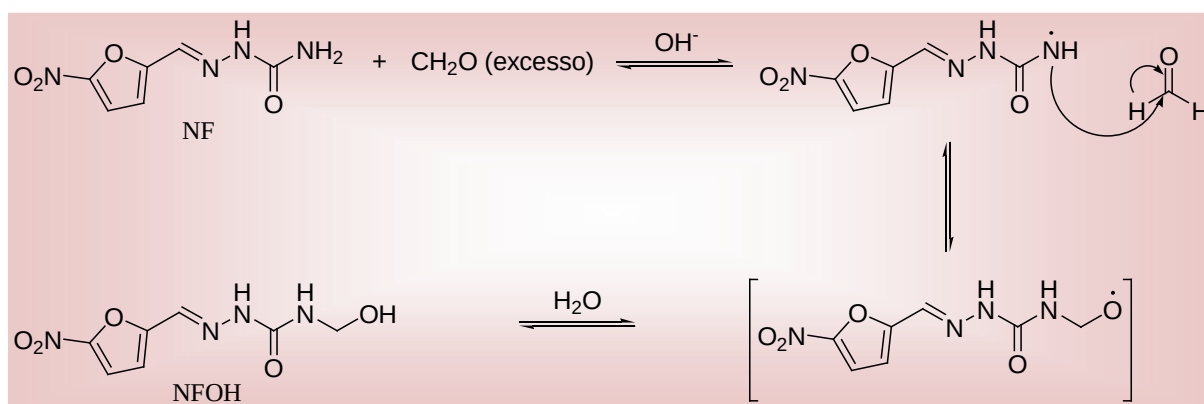


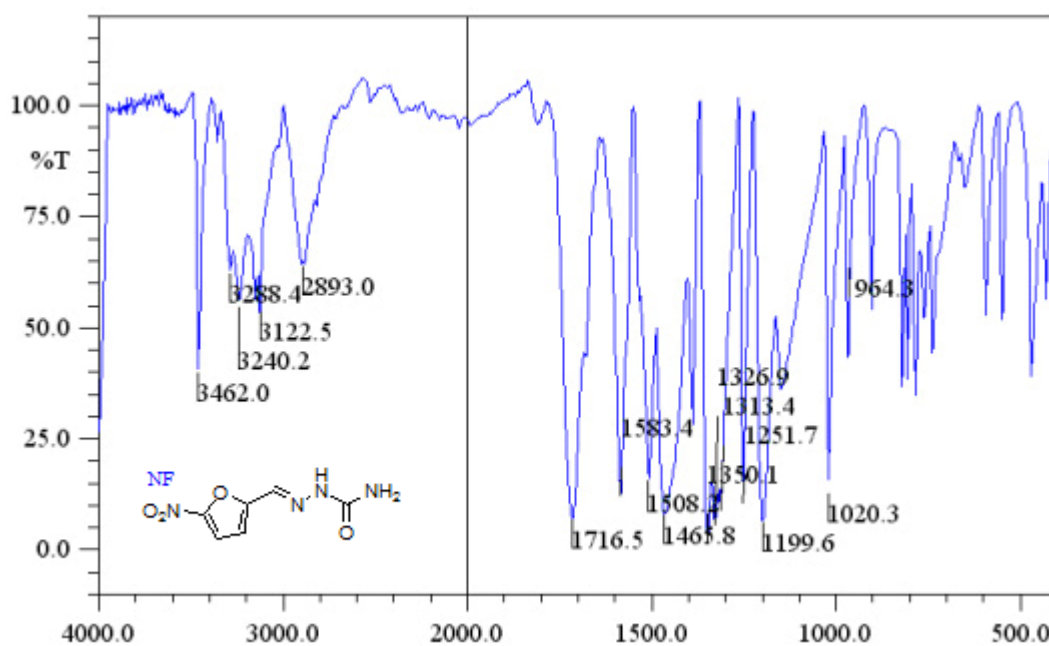
Figura 24. Mecanismo da reação de formação do NFOH em meio básico

O NFOH foi obtido e apresentou-se como um pó amarelo-castanho com faixa de fusão de 172-183 °C, $R_f = 0,63$ e o rendimento da reação foi de 65% após cristalização.

O NF e o NFOH foram avaliados por espectrofotometria de absorção no infravermelho e espectrometria de RMN (¹H e ¹³C). Os espectros foram comparados com trabalhos anteriores (CHUNG, 1996; CONTENTE, 2006; MELO, 2006; SERAFIM, 2008), nos quais também realizou-se a preparação do NFOH a partir do NF e as respectivas análises, sendo que os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes.

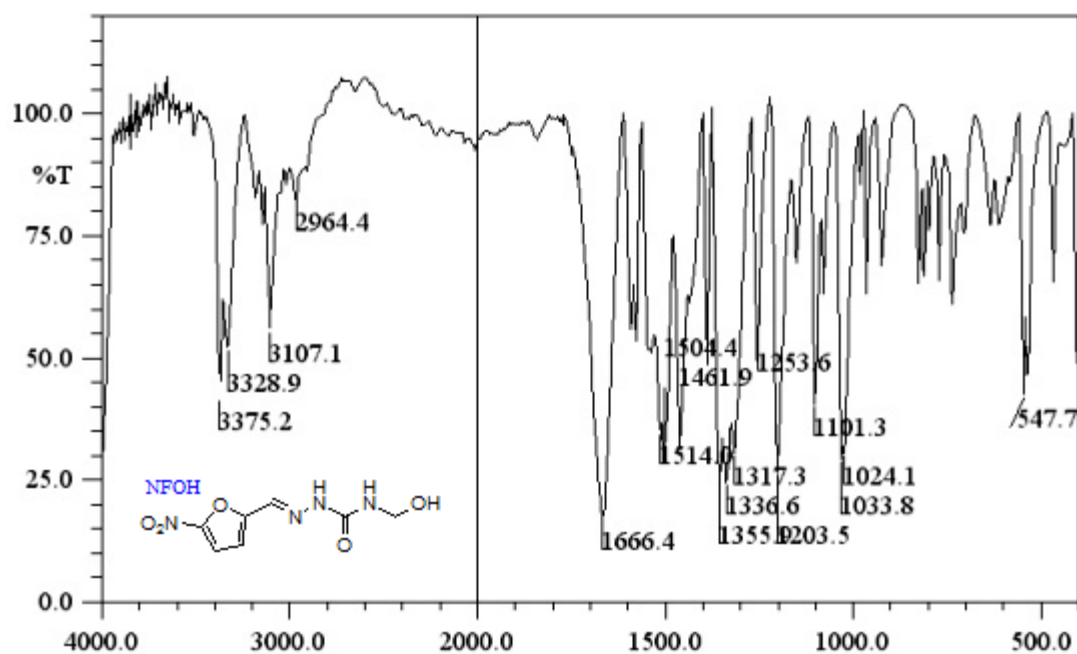
6.4.1 Espectrofotometria no infravermelho

Infravermelho (KBr) do NF (espectro 23, tabela 13): ν N–H simétrica e assimétrica = 3122 e 3288 cm^{-1} ; ν C=O = 1716 cm^{-1} ; ν C–N = 1465 cm^{-1} ; ν NO₂ simétricas e assimétricas = 1350 e 1583 cm^{-1} ; ν C–H simétricas e assimétricas = 2893-2964 cm^{-1} .



Espectro 23. Espectro no infravermelho do nitrofural (NF)

Infravermelho (KBr) do NFOH (espectro 24, tabela 13): ν C=O = 1666 cm^{-1} ; ν C–N = 1461 cm^{-1} ; ν O–H = 3328 e 3375 cm^{-1} .

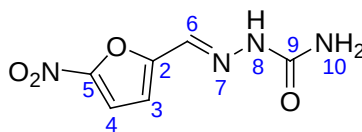


Espectro 24. Espectro no infravermelho do hidroximetilnitrofural (NFOH)

Tabela 13. Valores de absorção no infravermelho para o NF e NFOH

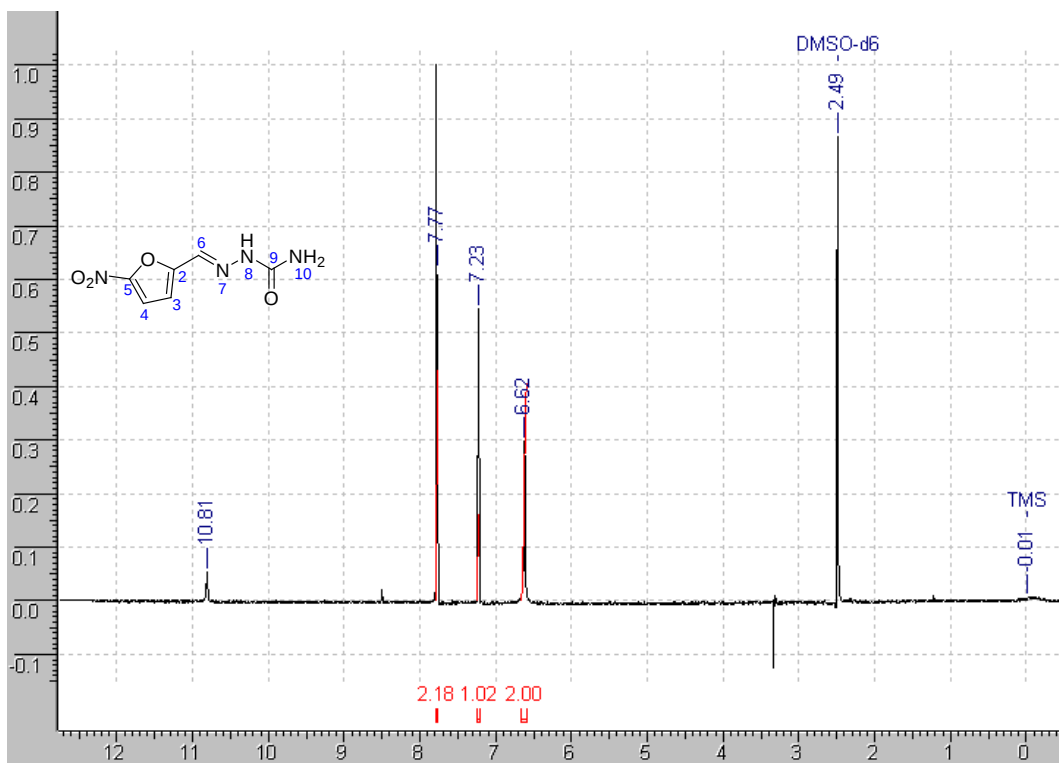
Compostos	Grupamentos e número de onda (cm^{-1})					
	N–H (simétrica)	N–H (assimétrica)	C=O	O–H	NO ₂	C–N
<chem>O=[N+]([O-])c1cc(C=NNC(=O)N)oc1</chem> NF	3122	3288	1716	—	3122 e 3288	1465
<chem>O=[N+]([O-])c1cc(C=NNC(=O)NCO)oc1</chem> NFOH	3201	3375	1666	entre 3328 e 3375	—	1461

6.4.2 Espectrometria de RMN ^1H e RMN ^{13}C

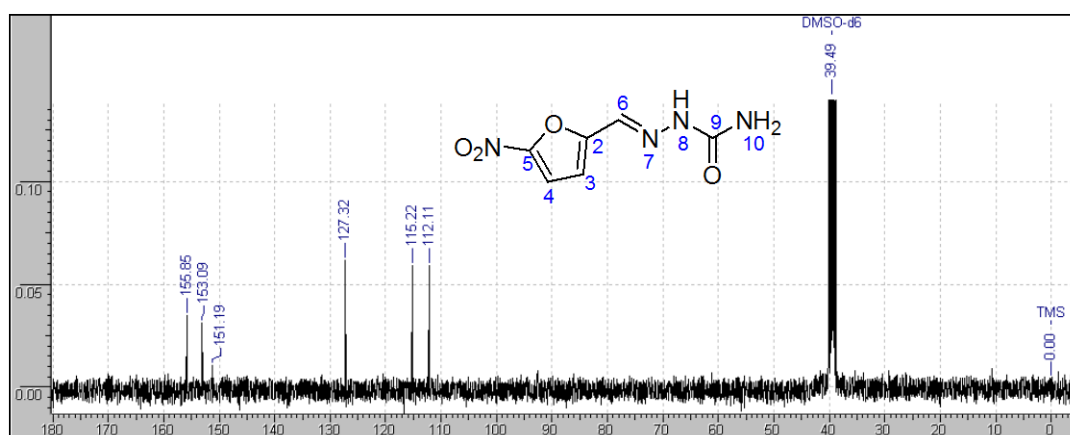


O espectro de RMN ^1H do NF (espectro 25, tabela 14) mostrou sinais de deslocamentos químicos em δ 10,81 referentes aos hidrogênios 8 e 10. Observa-se ainda um singlete em δ 7,77 que foi atribuído ao hidrogênio 6 e dois dubletos, ($J = 3,9$) um em δ 6,62 e outro em δ 7,23 referentes aos hidrogênios 3 e 4 respectivamente.

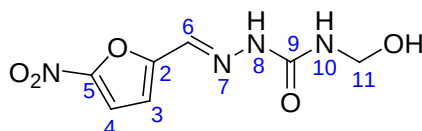
O espectro de RMN ^{13}C do NF (espectro 26) apresentou sinais de 6 carbonos, sendo o carbono do grupo carbonila observado em δ 155,8. A tabela 14 apresenta os deslocamentos químicos de todos os carbonos, que foram comparados com os valores da literatura (MILLS e ROBERSON, 1987).



Espectro 25. Espectro de RMN ^1H ampliado (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do fármaco nitrofurazone

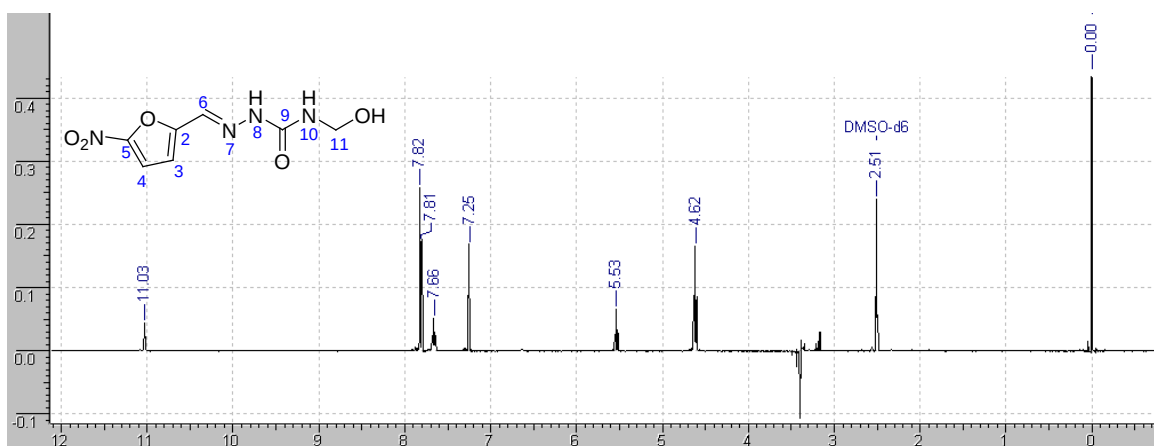


Espectro 26. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do fármaco nitrofural

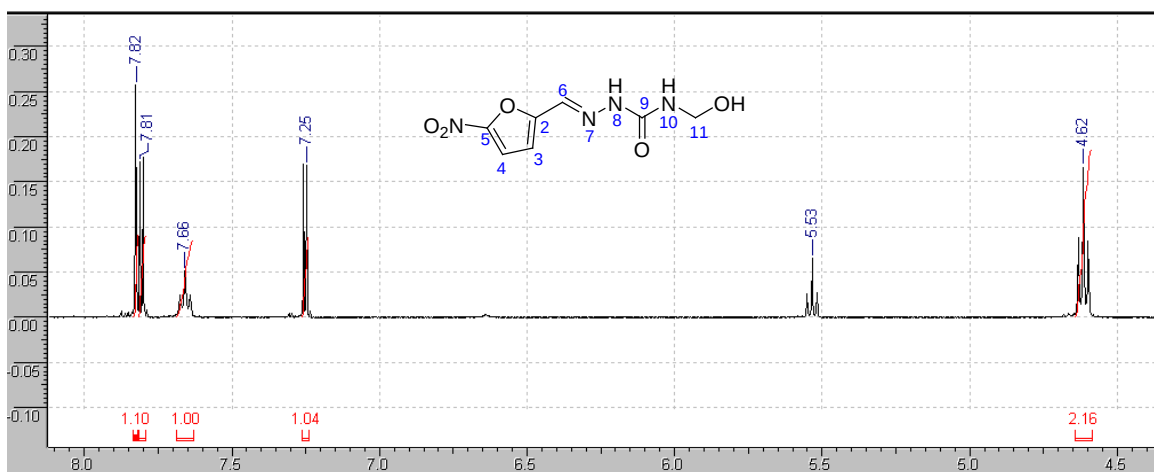


O espectro de RMN ^1H do NFOH (espectro 27 e 27a, tabela 14) apresentou sinais de deslocamentos químicos em δ 7,66 referente ao hidrogênio 8 e em δ 5,53 referente ao hidrogênio 10. Observa-se ainda um singlete em δ 7,82 que foi atribuído ao hidrogênio 6 e dois dubletos ($J = 3,9$), um em δ 7,81 e outro em δ 7,25 referentes aos hidrogênios 3 e 4 respectivamente. Observa-se ainda um tripleto em δ 4,62 referente a hidrogênios (CH_2), ligado a oxigênio. O espectro de RMN de ^1H apresentou ainda um singlete em δ 11,03 que foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila.

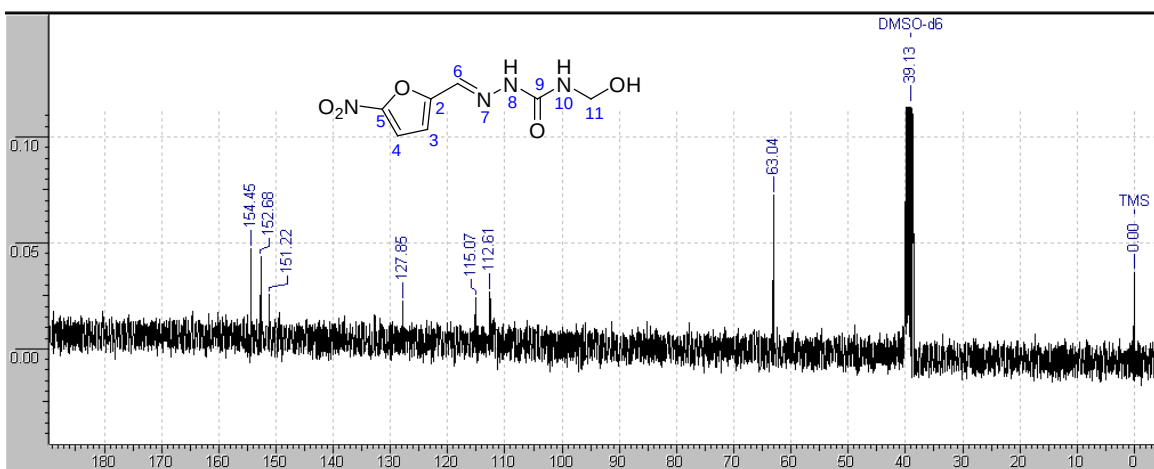
O espectro de RMN ^{13}C do NFOH (espectro 28, tabela 14) apresentou sinais de 7 carbonos, sendo o carbono do grupo carbonila observado em δ 154,4 (uma diferença de 1,4 ppm), quando comparado com deslocamento químico do carbono da carbonila do NF. Observou-se ainda um carbono carbinólico em δ 63,0.



Espectro 27. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do hidroximetilnitrofur

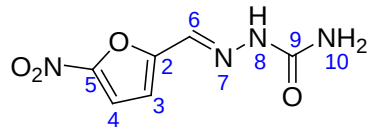
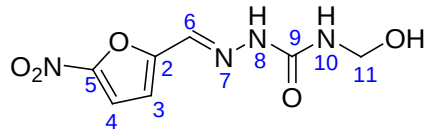


Espectro 27a. Espectro de RMN ¹H ampliado (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do hidroximetilnitrofur



Espectro 28. Espectro de RMN ¹³C (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do hidroximetilnitrofur

Tabela 14. Deslocamentos químicos de RMN ^1H e de ^{13}C do NF e NFOH (DMSO-d_6 , 300 MHz para ^1H e 400 MHz para ^{13}C).

Posição	 ¹ H NF ¹³ C NF	 ¹ H NFOH ¹³ C NFOH		
2	—	153,1	—	152,7
3	6,62 (d, <i>J</i> = 3,9 Hz)	112,1	7,81 (d, <i>J</i> = 3,9 Hz)	112,6
4	7,23 (d, <i>J</i> = 3,9 Hz)	115,2	7,25 (d, <i>J</i> = 3,9 Hz)	115,0
5	—	151,2	—	151,2
6	7,77 (s)	127,3	7,62 (s)	127,6
8	10,81 (s)	—	7,65 (t)	—
9 (C=O)	—	155,8	—	154,4
10	10,81 (s)	—	5,53 (t)	—
11	—	—	4,62 (t)	63,0
OH	—	—	11,0 (s)	—

6.5 Avaliação da mutagenicidade do NF, NFOH e BNZ através do teste de micronúcleo

Muitos compostos capazes de causar mutações gênicas também causam mutações cromossômicas, no entanto algumas substâncias mutagênicas atuam apenas em nível cromossômico, sendo imprescindível à utilização dos testes citogenéticos na avaliação do potencial mutagênico de um composto (RABELLO-GAY et al., 1991).

A indução de dano genético por agentes genotóxicos é um processo que se realiza em várias etapas. Durante o processo, o agente químico ingressa no organismo, é absorvido, distribuído e atravessa as membranas. Uma vez dentro da célula, o agente químico pode ser reativo por si só (ação direta), ou pode ser ativado pelas enzimas metabólicas (ação indireta), sendo chamado de agente promutagênico. Desta forma, ocorre a interação com o DNA; esta alteração pode ser reparada eficientemente ou não. Em caso negativo, o dano genético inicial pode se fixar, expressando-se nos diferentes tipos celulares e, caso atinja as células germinativas, será passado às gerações seguintes (ARNAIZ, 1997).

Os agentes químicos e físicos que causam mutações são identificados através de testes de mutagenicidade ou de genotoxicidade.

O ensaio cometa, um teste de genotoxicidade, vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas (RIBEIRO et al., 2003). Através desta técnica, o potencial para causar danos ao DNA, pode ser avaliado rapidamente, pois há uma rápida detecção dos danos imediatamente após a injúria ao DNA, sem qualquer necessidade de se esperar pela progressão das mitoses (ZUCCHI et al., 2004).

Testes de mutagenicidade, incluindo monitoramento citogenético em populações humanas e animais, são de máxima importância para o conhecimento e redução de riscos genotóxicos para ambos (HOEBEE & STOPPELAAR, 1996; ZUCCHI et al., 2004).

Dentre os testes de avaliação de mutagenicidade preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, o teste de micronúcleo em sangue periférico de roedores *in vivo* é amplamente aceito e recomendado para a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001; RIBEIRO et al., 2003).

O teste de micronúcleo permite identificar um aumento na frequência de mutação em células, que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos. Já o teste do cometa não é um ensaio utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo ensaio cometa são passíveis de correção (RIBEIRO et al., 2003). Como o teste de micronúcleo é capaz de detectar tanto efeitos aneugênicos como clastogênicos, a genotoxicidade de uma grande variedade de compostos pode ser testada através dessa técnica (HEDDLE et al., 1991).

Segundo Surralles e Natarajan (1997), as principais vantagens da análise de células micronucleadas são a velocidade e a facilidade com que este tipo de estudo pode ser efetuado, especialmente quando é aplicado em roedores em estudos *in vivo*, além de permitir a interferência de processos de aneugênese e clastogênese, como já afirmado anteriormente.

O potencial mutagênico dos fármacos NF, NFOH e BNZ foi avaliado através do teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos. Após a análise citológica das lâminas, foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas, bem como os desvios padrão para cada um dos grupos de tratamento. A partir destes resultados foi aplicado um

teste de Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que $P < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados com o software estatístico PRISMA. Os resultados podem ser visualizados na tabela 15.

Tabela 15. Número de células micronucleadas por animal, média e desvio padrão (SD)

Tratamentos (mg/Kg p.c.)	Animais										Média	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Controle +	44	31	53	49	22	47	66	68	38	52	47*	14,29
Controle –	2	0	1	2	1	0	1	1	0	0	0,8	0,78
Controle branco	1	0	1	0	2	1	1	0	1	0	0,7	0,67
NFOH												
50	1	2	0	2	1	1	2	0	3	1	1,3	0,94
100	2	3	1	2	3	0	1	0	2	0	1,4	1,17
250	3	2	2	1	2	0	2	0	2	2	1,6	0,96
500	3	2	1	0	0	5	1	3	2	5	2,2	1,81
NF												
50	5	6	2	4	3	0	6	4	4	6	4,0	1,94
100	4	5	9	3	5	3	5	2	4	3	4,3	1,95
250	8	11	5	6	4	5	3	4	8	10	6,4	2,71
500	4	7	6	9	4	12	8	4	13	7	7,4	3,2
BNZ												
50	7	8	5	0	6	1	1	3	2	0	3,3	2,98
100	3	7	4	9	4	6	4	6	1	4	4,8	2,25
250	6	8	9	0	0	6	5	10	4	3	5,1	3,45
500	0	7	6	8	12	4	9	2	5	3	5,6	3,57

Controle + (Controle Positivo): ciclofosfamida 50 mg/kg p.c.; Controle – (Controle Negativo): CMC (1%)/Tween (0,2%); Controle branco: água; * $P \leq 0,001$.

Na figura 25 estão representados os dados obtidos da formação de micronúcleos em animais expostos ao quimioterápico clássico ciclofosfamida. Como já esperado, os resultados corroboram os dados da literatura demonstrando o efeito genotóxico deste fármaco, expresso pelo aumento da incidência de micronúcleos, quando comparado aos grupos controle negativo e controle branco ($P < 0,05$).

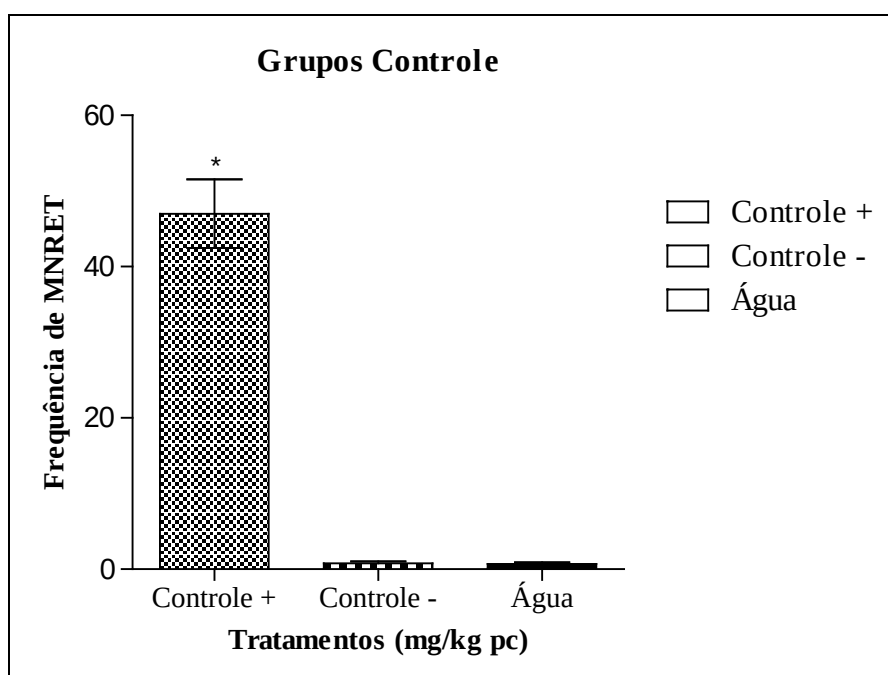


Figura 25. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com ciclofosfamida (controle positivo), CMC/Tween (controle negativo) e água (controle branco).
* $P < 0,05$

Na figura 26 os resultados demonstram que o fármaco nitrofuril, nas diferentes concentrações administradas (50, 100, 250 e 500 mg/kg) induziu um aumento significativo na frequência de micronúcleos nos reticulócitos de camundongos, quando comparado ao controle negativo e controle branco, além disso, foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) nas concentrações de 50 e 100 mg/kg em relação a concentração de 500 mg/kg. Os resultados apresentados não foram significativos quando comparado ao controle positivo.

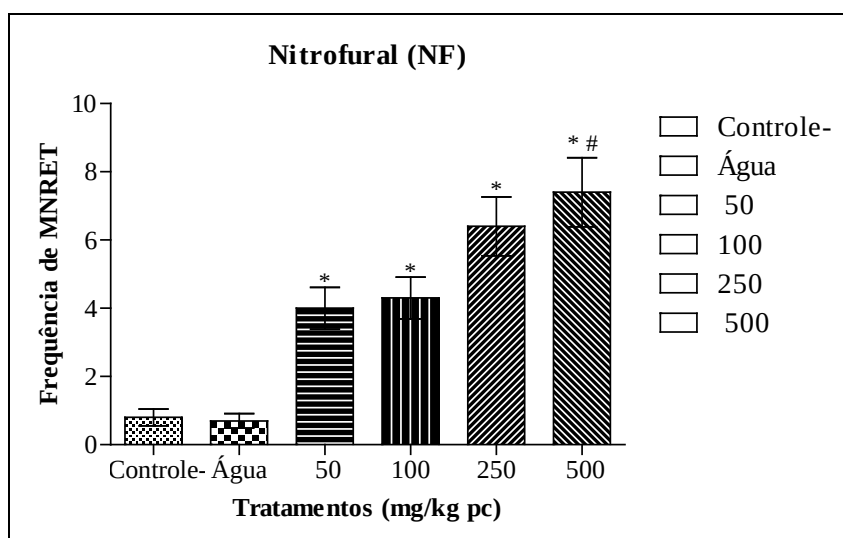


Figura 26. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses de NF.

* $P < 0,05$ (em relação ao controle negativo e branco); # $P < 0,05$ (em relação às doses de 50 e 100 mg/kg)

Conforme mostrado na figura 27, os resultados indicaram que o fármaco hidroximetilnitrofural, nas diferentes concentrações administradas (50, 100, 250 e 500 mg/kg) não apresentou significância estatística quando comparado ao controle negativo e branco, da mesma forma, que nenhuma diferença estatística foi detectada entre as concentrações administradas aos animais.

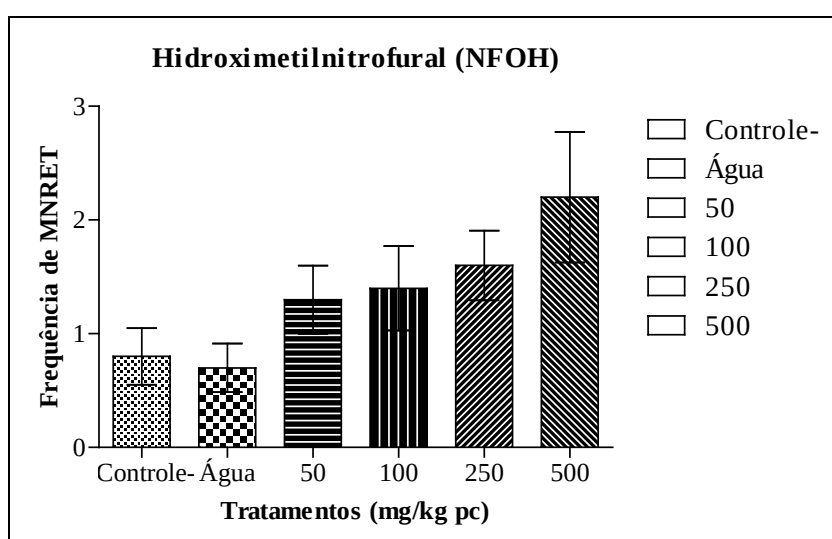


Figura 27. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses de NFOH.

Como pode ser observado na figura 28, os resultados demonstram que o fármaco benznidazol induziu um aumento significativo na frequência de micronúcleos nos reticulócitos de camundongos nas diversas concentrações administradas (50, 100, 250 e 500mg/kg), quando comparado ao controle negativo e controle branco. Os resultados apresentados não foram significativos quando comparado ao controle positivo, assim como não houve diferença estatística entre as doses administradas.

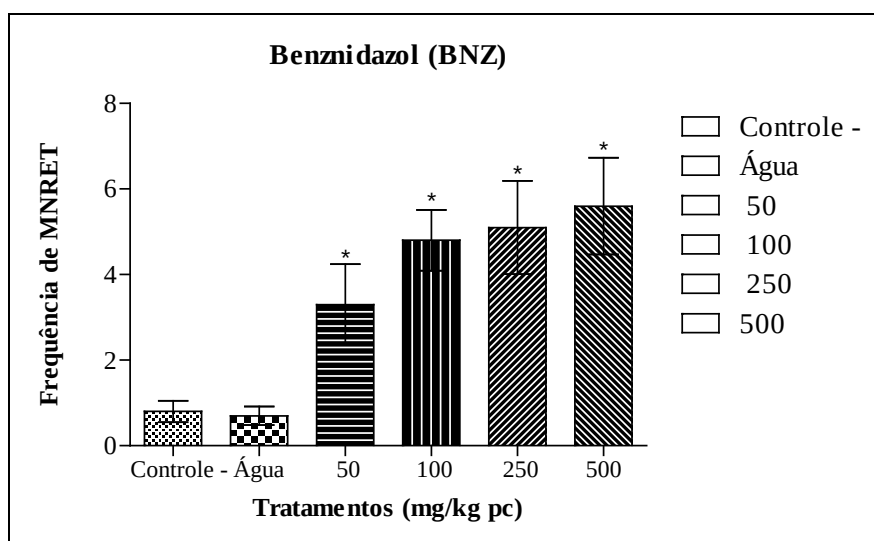


Figura 28. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com o fármaco benznidazol.

* $P \leq 0,05$

Na figura 29, está demonstrado a frequência média de reticulócitos micronucleados dos fármacos NF, NFOH e BNZ na concentração de 50 mg/kg. Diante dos resultados é possível observar que não houve diferença estatística entre o fármaco NFOH e os grupos controle (negativo e branco), no entanto, os fármacos NF e BNZ apresentaram significância estatística (* $P < 0,05$) quando comparados aos grupos controle. Quando compara-se o BNZ com o NF e NFOH nota-se que os resultados não foram estatisticamente significantes nesta concentração, entretanto, houve diferença estatística quando o NF foi comparado ao NFOH. (# $P < 0,05$).

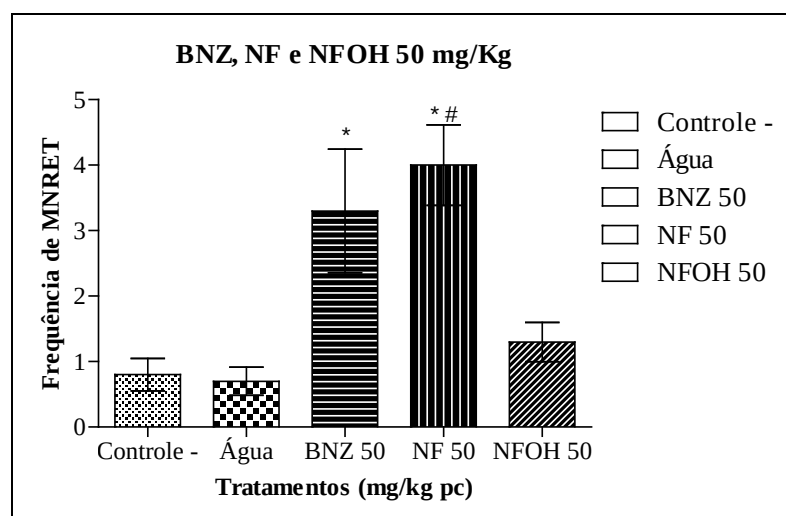


Figura 29. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 50 mg/kg de BNZ, NF e NFOH.

*P<0,05 (em relação ao controle negativo e branco); #P<0,05 (em relação ao NFOH)

Os resultados que apresentam a frequência média de reticulócitos micronucleados dos fármacos NF, NFOH e BNZ na concentração de 100 mg/kg, estão demonstrados na figura 30. Observa-se que não houve diferença estatística entre o fármaco NFOH e os grupos controle (negativo e branco), já em relação aos fármacos NF e BNZ nota-se que esta diferença foi significativa quando ambos os fármacos foram comparados aos grupos controle (*P < 0,05) e ao NFOH (#P < 0,05).

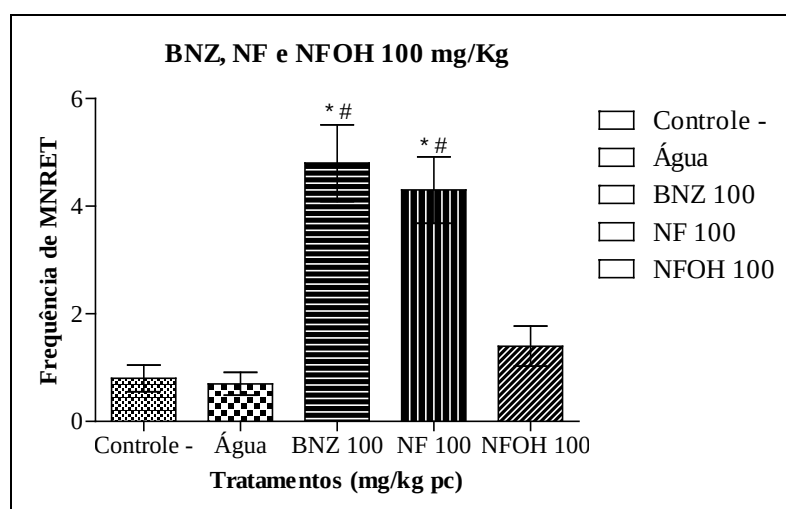


Figura 30. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 100 mg/kg de BNZ, NF e NFOH.

*P<0,05 (em relação ao controle negativo e branco); #P<0,05 (em relação ao NFOH)

Conforme mostrado na figura 31, os resultados indicaram que os fármacos NF e BNZ na concentração de 250 mg/kg, induziram de forma significativa um aumento na incidência de micronúcleos, quando comparado aos grupos controle (negativo e branco) e ao fármaco NFOH (*P < 0,05 e #P < 0,05, respectivamente), no entanto, os fármacos NF e BNZ não apresentaram diferença estatística entre si.

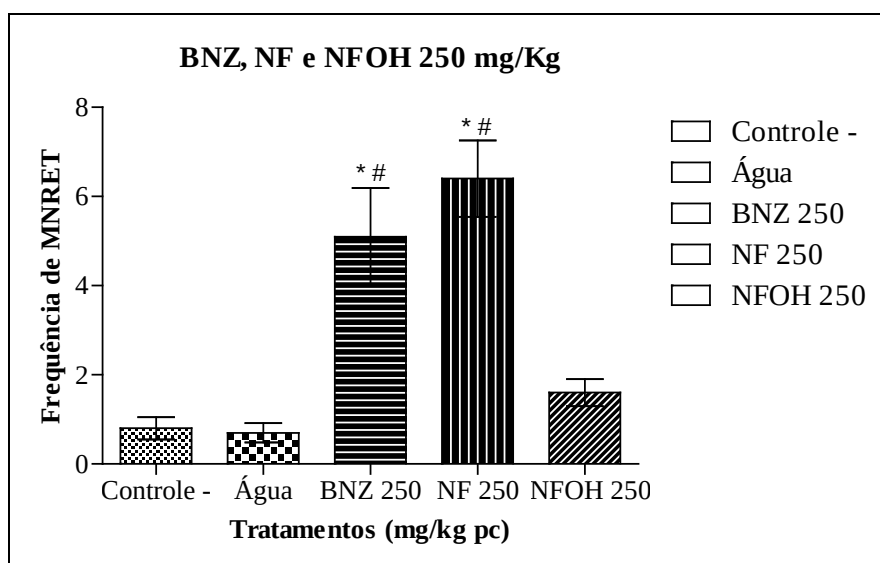


Figura 31. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 250 mg/kg de BNZ, NF e NFOH.

*P<0,05 (em relação ao controle negativo e branco); #P<0,05 (em relação ao NFOH)

Na figura 32, os resultados demonstram que a frequência média de reticulócitos micronucleados dos fármacos NF e BNZ foi significativa na concentração de 500 mg/kg, quando comparada aos grupos controle (negativo e branco) e ao fármaco NFOH (*P < 0,05 e #P < 0,05, respectivamente), entretanto, os fármacos NF e BNZ não apresentaram diferença estatística entre si.

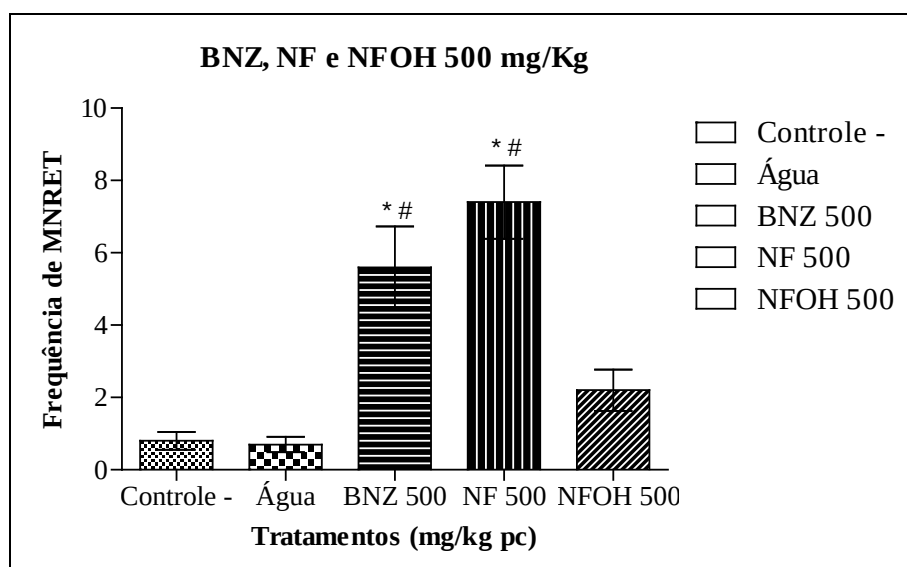


Figura 32. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 500 mg/kg de BNZ, NF e NFOH.

* $P < 0,05$ (em relação ao controle negativo e branco); # $P < 0,05$ (em relação ao NFOH)

O ensaio do micronúcleo é um método utilizado para avaliar a capacidade de substâncias para induzir danos cromossômicos em células em estágio de divisão (FENECH, 2005). Desta forma, como já era esperado, os resultados demonstraram que a frequência de micronúcleos nos grupos de camundongos que foram expostos à ação do agente genotóxico ciclofosfamida é significativamente maior em comparação aos grupos controle (controle negativo e controle branco), o que corrobora dados da literatura. Além disso, verifica-se ainda que a exposição de animais normais às diferentes concentrações (50, 100, 250 e 500mg/kg) dos fármacos NF, NFOH e BNZ não induziu de forma significativa um aumento na incidência de micronúcleos, quando comparado ao grupo de animais tratados com ciclofosfamida (controle positivo).

Estes resultados sugerem que os fármacos, nas condições experimentais avaliadas, não possuem um potencial significativo para induzir danos ao DNA quando comparado ao grupo controle positivo, no entanto, quando são comparados aos grupos controle negativo e controle branco, apresentam aumento na incidência de micronúcleos em reticulócitos do sangue periférico de camundongos, exceto o NFOH, que não apresentou significância estatística em nenhuma das concentrações utilizadas quando comparado aos grupos controle e aos fármacos NF e BNZ. Os fármacos NF e BNZ não apresentaram diferença estatística entre si em

nenhuma das concentrações utilizadas, mais ambos foram diferentes significativamente em relação ao NFOH, como já mencionado anteriormente.

7. CONCLUSÃO

- ✓ Os compostos isósteros de NF foram obtidos, entretanto, não apresentaram atividade antichagásica nas formas epimastigotas em nenhuma das concentrações utilizadas, demonstrando que a presença do grupo nitro é essencial para a atividade antichagásica do fármaco NF;
- ✓ Os resultados positivos com teste de micronúcleo fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada. Sob condições experimentais apropriadas, os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é genotóxica. Diante dos dados obtidos, os resultados com o teste de micronúcleo indicaram que os fármacos NF e BNZ, e o candidato a fármaco NFOH nas condições experimentais avaliadas, não possuem um potencial significativo para induzir danos ao DNA quando comparado ao grupo controle positivo;
- ✓ Os resultados indicaram que os fármacos NF e BNZ induziram de forma significativa um aumento na incidência de micronúcleos em reticulócitos do sangue periférico de camundongos, quando comparado aos grupos controle (negativo e água) e ao NFOH;
- ✓ O candidato a fármaco NFOH não apresentou diferença estatística significativa, nas diferentes concentrações administradas, quando comparado ao controle negativo e água;
- ✓ A frequência de células micronucleadas nos animais tratados com NFOH foi, aproximadamente, quatro vezes menor que nos animais tratados com NF e BNZ, confirmando o teste de mutagenicidade *in vitro* (teste de Ames) obtido por Guido et al., 2001, demonstrando através dos resultados deste teste e de outros realizados anteriormente que o NFOH é um forte candidato a fármaco antichagásico.

8. PERSPECTIVAS

Constituem perspectivas deste trabalho:

Dar continuidade na pesquisa pré-clínica do candidato a fármaco NFOH em segundo modelo animal realizando:

- a) Estudo farmacocinético;
- b) Estudo de toxicidade aguda e subcrônica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Z. A.; BRENNER, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeídos semicarbazona) sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 11, n. 3, p. 222-228, 1969.

ANANDAN, J. V. Parasitic disease. In: DIPIRO, J. T. (Ed.). **Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach**. 3rd ed. London: Appleton & Lange, 1997. p. 2161-2172.
ANVISA. **Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe técnico, n. 35, 2008.

ARNAIZ, R.R. **Las Toxinas Ambientales e Sus Efectos Genéticos**. 2ª edição. México: IEPSA, 1997, 95 p.

ATLAS DE MACROSCOPIA. Disponível em
<<http://www.uftm.edu.br/instpub/fmtm/patge/imagen/mac0220.jpg>>. Acesso em 05/02/2008.

ATLAS DE PARASITOLOGIA. Disponível em < www.ucm.es/info/parasito/aTLAS.htm>. Acesso em: 20/06/2008.

BATISTA, R.; HUMBERTO, J. L.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B. Synthesis and trypanocidal activity of *ent*-kaurane glycosides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 381-391, jan. 2007.

BARBOSA, C. F.; OKUDA, É. S.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; CICARELLI, R. M. B.; BARBOSA, C. F. Rapid test for the evaluation of the activity of the prodrug hydroxymethylnitrofurazone in the processing of *Trypanosoma cruzi* messenger RNAs. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 40, n. 1, p. 33-39, jan. 2007.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 121, 164.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008

BLACK, J.G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 657.

BRASIL. MINISTÉRIO DO AMBIENTE E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO.
Decreto-Lei n.º 222/2001 de 8 de Agosto

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

BRIONES, M. R.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and implications to pathogenicity and host specificity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 104, n. 2, p. 219-232, 1999.

BOIANI, L.; DAVIES, C.; ARREDONDO, C.; PORCALI, W.; MERLINO, A.; GERPE, A.; BOIANI, M.; PACHECO, J.P.; BASOMBRÍO, M. A.; CERECETTO, H.; GONZÁLES, M. In vivo studies of 5-arylethenylbenzofuroxans in acute murine models of Chagas' disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2229-2237, 2008.

BOIANI, M.; BOIANI, L.; DENICOLA, A.; ORTIZ, S. T.; SERNA, E.; BILBAO, N. V.; SANABRIA, L.; YALUFF, G.; NAKAYAMA, H.; ARIAS, A. R.; VEJA, C.; ROLAN, M.; GÓMEZ-BARRIO, A.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. 2H-Benzimidazole 1,3-Dioxide Derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3215-3224, 2006.

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

BURNS, G. W., e BOTTINO, P. J. **Genética**. Editora Guanabara Koogan. 6ª edição. Rio de Janeiro (RJ): 1991.

CANÇADO, J. R. Terapêutica específica. In: DIAS, J. C. P.; COURA (Org.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. p. 323-352.

CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 1143-1156, 2001.

CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; RISSO, M.; SAENZ, P.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; OLEA-AZAR, C. 1,2,5-Oxadiazole *N*-Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure-Activity Relationships. **J. Med. Chem.** v 42. pp 1941-1950, 1999.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment (Choy, W. N.ed.), Marcel Dekker, Inc, New York,, 2001.

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

CHUNG, M.C.; SILVA, A. T. A.; CASTRO, L.F.; GÜIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol.41 São Paulo, 2005.

CHUNG, M.C.; MARTINELLI, T.F.; GONÇALVES, M.T.; GÜIDO, R.V.C.;VARANDA, E.A.; POLLI, M.C.; BOTELHO, K.C.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E.I. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic hydroxymethilnitrofurazone (NFOH-121): A new nitrofurazone prodrug. **Bioorg. Med. Chem.**, v.11, p.4779-4780, 2003.

CONTENTE, T.C. Planejamento e estudo da viabilidade de obtenção do pró- fármaco recíproco nitrofural-alendronato potencialmente antichagásico. **Araraquara, 2006. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.**

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, jan. 2002.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental, 167-178. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

DE LA SIENRAA, E.; ARMIENTAB, M.A.; GONSEBATT, M.E. Potassium dichromate increases the micronucleus frequency in the crayfish *Procambarus clarkii*. Environmental pollution. v. 126. 2003.

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. Epidemiologia. Em: BRENER, Z., ANDRADE, Z.A., BARRAL, M. NETTO. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 60-65.

DIAS, J.C.P. **Doença de Chagas**. Em: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001. p 81-91.

DIAS, J.C.P.. Conferência Nacional de Saúde On-Line. **O tratamento específico para doença de Chagas**. 1999. Disponível em:
<http://www.datasus.gov.br/cns/temas/tribuna/tratamento.htm> . Acesso em: 22 de janeiro de 2007.

DIMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **J. Health Econ.** v.22, p.151–185, 2003.

DNDi – Drugs for Neglected Disease initiative. "**Desequilíbrio Fatal: A Crise de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos para Doenças Negligenciadas**", 2004.

EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drugs – ction and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 31, n. 1, p. 9-20, 1993.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol Med*;111: 3-32, 2005.

FERNANDES J. F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 18, p. 195-202, 1966.

FONSECA, A. L.; Quimioterápicos na clínica diária. **1ªed. Rio de Janeiro: EPUB,1999.** p 27,28.

FORD, C.E.; HAMERTON, J.L. A colchicines hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. **Stain Technology** **3**. p 247-251, 1956.

GOLDMAUM, M.; AJIMURA, F. Y.; LITVOC, J.; CARVALHO, S. A.; ELUF NETO, J. American trypanosomiasis and electrocardiographic alterations among industrial workers in São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n.6, p. 299-302, 2004.

GONÇALVES, M. T.; CHUNG, M. C.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T. M.; FERREIRA, E. I. Ação da associação da primaquina e nitrofurazona em células LLC-MK2 com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 164, 1994. Suplemento 1.

GUERRA, W.; FONTES, A.P.S.; ALMEIDA, M.V.; SILVA, H. Síntese e caracterização de novos complexos de platina (II) com ligantes derivados do furano e nitrofurano. **Quím. Nova**, vol.28 no.5 , São Paulo Sept./Oct. 2005

GÜIDO, R.V.C., FERREIRA, E.I., NASSUTE, J.C., VARANDA, E.A., CHUNG, M.C. Diminuição da atividade mutagênico pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofural. **Rev. Brás.Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v.22, p 319-333, 2001.

GRINGAUZ, A. **Introduction to Medicinal Chemistry: how drugs act and why**. 1997. p. 273.

HENDERSON, G.B.; ULRICH, P.; FAIRLAMB, A.H.; ROSENBERG, I.; PEREIRA, M.; SELA, M.; CERAMI, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.85, p. 5374-5378, 1988.

HIRAKU, Y.; SEKINE, A.; NABESHI, H.; MODORIKAWA, K.; MURATA, M.; KUMAGAI, Y.; KAWANISHI, S. Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA. **Cancer Letters**, v. 215, n. 2, p. 141-150, 2004.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNDI, T.; ISHIDATE JR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, v. 245, 1990.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, PH.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. *Environment Molecular Mutagenicity*, v. 18, 1991

HOEBEE, B; STOPPELAAR, J. M. The isolation of rat chromossome probes and their application in cytogenetic tests. **Mutation Research**, n. 372, 1996, p.205-210.

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 95-97, jul. 2007. Suplemento I.

JORGE, S.D. Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos e de derivados 5(6)-benzofuroxânicos frente a cepas padrão e multirresistentes de *Staphilococcus aureus*. **São Paulo, 2007. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo**

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

KISHI, M.; HORINGUCHI, Y.; WATANABE, S.; HAYASHI, M. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. **Mutation Research**, v. 278, 1992

KOBIERSKA-SZELIGA, M.; CZECHOT, H. Characterization of the genotoxic properties of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone. **Acta Biochimica Polonica**, v. 41, n.1, p.1-5, 1994.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 49, 94, 95, 593.

LA-SCALEA, M. A.; MAN CHIN, C.; FERREIA, E. I. Geração eletroquímica do nitro radical aniônico a partir do NF utilizando-se eletrodo de carbono vítreo. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, QUÍMICA ANALÍTICA E QUALIDADE DAS ÁGUAS, 10., Santa Maria, 1999. **Livro de Resumos**. Santa Maria: [s.n.], 1999.

LA-SCALEA, M. A.; MENEZES, C. M. S.; JULIAO, M. S. S. Voltammetric behavior of nitrofurazone and its hydroxymethyl prodrug with potential anti-Chagas activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 774-782, july-aug. 2005.

LAGE, B. L.; CADAHÍA, B. P.; FELPETO, J.M. Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno. Departamento de Biología Celular y Molecular Universidade da Coruña. **An. R. Acad. Nac. Farm.**, 2004

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. E.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 1995.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. **Parasitol. Res.**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, 2000.

MCCALLA, D. R. Mutagenicity of nitrofurán derivatives: review. **Environmental Mutagenesis**, v. 5, n. 5, p. 745-765, 1983.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Aspectos Toxicológicos dos Nitrofuranos e Eventuais Risco para a Saúde Humana**. Dir. Geral da Saúde. Lisboa, 2003

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=25>. Acesso em: Maio de 2008.

MECCA, M. M.; DIAZ, E. G.; CASTRO, J. A. Nifurtimox biotransformation to reactive metabolites or nitrite in liver subcellular fractions and model systems. **Toxicology Letters**, v. 136, n. 1, p. 1-8, 2002.

MELO, M.F.F. Preparação e determinação da atividade toxicológica do pró-fármaco hidroximetilnitrofural, potencialmente antichagásico. **Araraquara, 2006. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.**

MILLS, T. III.; ROBERSON, J. C. **Instrumental data for drug analysis**. 2nd ed. New York: Elsevier, 1987. v. 3, p. 1628-1629.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, jul. 2003.

NEVES, C. F. C.; SCHWARTZMAN, M. M. A. M. Técnicas para seleção de variáveis aplicadas à separação de gases. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 327-329, 2002.

NETO, J. X. A.; MEDEIROS, F. P. M.; MELO, A. J. M.; SILVA, J. C.; DANTAS, J.P. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) in vivo. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 5, 2005

OTERO, L.; AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; DENICOLA, A.; RIGOL, C.; OLEA-AZAR, C.; MAYA, J. D.; MORELLO, A.; GONZÁLEZ, M.; GAMBINO, D.; CERECETTO, H. Nitrofurylsemicarbazone rhenium and ruthenium complexes as anti-trypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1231-1239, 2006.

OTERO, L.; VIEITES, M.; BOIANI, L.; DENICOLA, A.; RIGOL, C.; OPAZO, L.; OLEA-AZAR, C.; MAYA, J. D.; MORELLO, A.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E.; GONZÁLEZ, M.; GAMBINO, D.; CERECETTO, H. Novel antitrypanosomal agents based on Palladium Nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potencial therapeutic targets. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3322-3331, 2006.

PÉREZ, M. C.; TROCONIS, M.I.C. Diseño racional de compuestos antibacterianos derivados del 5-nitrofurano usando modelado molecular. **Bol. Soc. Chil. Quím.** v 46, 2001.

PINTO, A.Y.N.; FARIAS, J.R.; MARÇAL, A.S.; GALÚCIO, A.L.; COSTI, R.R.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.S. Doença de chagas aguda grave autóctone da Amazônia brasileira. **Rev. Para. Med.** v. 21. n.2, 2007

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: **Revista Brasileira de Genética**, 1991.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Research**, v. 90, p. S19-S39, 2003. Supplement 1.

RASSI, A.; TRANCHESI, J.; TRANCHESI, B. Doença de Chagas. In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p.665, 667, 675, 678, 680.

REY, L. **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.151, 171.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA, Edição Única, 173-198, 2003.

SALAZAR, J. P. et al. Enfermedad de Chagas crónica en Chile: experiencia de intervención educativa. **Parasitologia Latinoamerica**, v. 61, n.1/2, p. 94-97, 2006.

SDR – Strategic Direction for Research, WHO, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/directions.htm>>. Acesso em: 14 fev. 2008.

SERAFIM, E. O. P. Conversão in vitro e in vivo do pró-fármaco hidroximetilnitrofurais, candidato a fármaco antichagásico. **Araraquara, 2008. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista**.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clín. Biol.**, v. 20, p. 191-208, 1953.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SLESINSKI, R. S.; GUZZIE, P. J. Review of recent advances in the development and application of the micronucleus test. In: BALLANTYNE, B. Perspectives in basic and applied toxicology. London: John Wrieth, 1988.

SOLOMONS, T.W.G & FRYHLE, C.B. Química Orgânica. Rio de Janeiro: LTC Editora. 8ª Ed. , 2006.

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.

SURRALLÉS, J.; NATARAJAN, A. T. Human lymphocytes Micronucleus Assay in Europe. An international survey. **Mutation Research**, v. 392, 1997.

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 of *Trypanosoma cruzi* Proliferation. **J. Med Chem.**, v. 43, p. 1826-1840, 2000.

SZAJNMAN, S.H.; MONTAVELTTI, A.; WANG, Y.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J.B. Bisphosphonates derived from fatty acids are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.13, p.3132-3235, 2003

SZAJNMAN, S. H.; RAVASCHINO, E. L.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J. B. Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1, 1-bisphosphonates derived from fatty acids against *Trypanosoma cruzi* targeting farnesyl pyrophosphate synthase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 21, p. 4685-4690, 2005.

TARTAROTTI, E.; OLIVEIRA, M. T. V. A.; CERON, C. R. Problemática vetorial da doença de Chagas. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 11, n. 1, p. 44-47, 2004.

TEIXEIRA, R. Amebicidas. Tricomonicidas. Giardicidas. Tripanosomicidas. Leishmanicidas. Em: PENILDON, S. **Farmacologia**. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1146

TRACY, J. W.; WEBSTER JR., T. Chemoterapy of parasitic infections. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Ed.). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. New York: McGraw Hill, 2001. p. 1059-1069.

TOCHER, J. H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. **General Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 485-487, 1997.

TRAMONTINI, M. Advances in chemistry of Mannich bases. **Synthesis**, v.12, p. 703-775, 1973.

TRAMONTINI, M.; ANGIOLINI, L. Further advances in the chemistry of Mannich Bases. **Tetrahedron**, v.46, p.1791-1837, 1990.

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

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, 1996

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LIENDO, A.; LAZARDI, K.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; RYLEY, J. F. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using DO 870. **Science**, v. 273, n. 5277, p. 969-971, 2003.

VAN GOETHEM, F.; LISON, D. KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the in vitro Micronucleus Test and the Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis Assay for the detection of DNA damaging agents: Genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutation Research*. v. 391, 1997

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro**, v.16, 2000.

WENDEL, S. Historical aspects. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI. **A Chagas disease (American Trypanosomiasis):** its impact on transfusion and clinical medicine. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992.

WERMUTH, C. G. **Strategies in the Search for New Lead Compounds or Original Working Hypotheses.** In *The Practice of Medicinal Chemistry*; WERMUTH, C. G., Ed.; Academic: London, 1996; p 81.

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.

WERMUTH, C.G. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. **J Med Chem.** v.47, n.6, p.1303-1312, 2004.

WIKIPEDIA. Doença de Chagas. Disponível em:
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Doen%C3%A7a_de_Chagas>. Acesso em: 23 de janeiro de 2008.

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. **Chagas Disease. Strategic direction for research** Disponível em:
<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>. Acesso em: 24 de Janeiro de 2008.

WILLIAMS-BLANGEROS, S.; VANDEBERG, J. L.; BLANGERO, J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Genetic epidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease. **Fronteras en Biotecnologia y Bioingeniería**, v.8, p. 337-345, 2003.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. M.; LISBOA, C. V.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Inst. J. Parasitol.**, v. 28, n. 1, p. 105-120, 1998.

ZUCCHI, T. M. A. D; POLI, P; DE MELLO, M. A; ZUCCHI, T. D; ZUCCHI, F. D; DE CASTRO, V. L. S. S. Biomarcadores: Sentinelas Ambientais. In: Binsfeld, P. C. (organizador). **Biossegurança em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004, 367 p.

ANEXO