

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CONVERSÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***  
**DO PRÓ-FÁRMACO HIDROXIMETILNITROFURAL,**  
**CANDIDATO A FÁRMACO ANTICHAGÁSICO.**

**ELIANA OMETTO PAVAN SERAFIM**

Tese apresentada ao Instituto de Química de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Ribeiro  
Co-orientadora : Profa. Dra. Chung Man Chin

**ARARAQUARA – SP**  
**2008**

À **DEUS** agradeço, por segurar em minhas mãos  
e pelo seu amor.

Por tudo!

A **ELE** todo meu louvor!!

## **Dedico este trabalho**

Ao meu esposo **Ricardo** e às minhas filhas **Mirella e Milena**,  
por todo amor, carinho,  
constante apoio e incentivo  
em todos os momentos.

A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> **Maria Lúcia Ribeiro** e Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> **Chung Man Chin**  
pela orientação, amizade e incentivo  
durante a realização deste trabalho.

## **Agradecimentos**

À **coordenação do Programa de Pós-Graduação** pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço especialmente a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Rosângela Gonçalves Peccinini** do **Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia e vice-coordenadora do Centro de Bioequivalência e Equivalência Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara** pela disponibilidade e contribuição científica, sem a qual seria impossível à realização dos estudos farmacocinéticos.

Ao amigo **Antônio Távora de Albuquerque e Silva**, muito obrigado por tudo! Sem a sua amizade, paciência, ensinamentos de informática e contribuição ao trabalho, tudo seria muito, muito mais difícil.

Aos **integrantes do Grupo Lapdesf, professores e funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos** que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço as **funcionárias da Seção de Pós-Graduação do Instituto de Química de Araraquara** pela atenção, carinho e disponibilidade.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de estudos concedida; minha gratidão a essa Coordenação, que tanto favorece e estimula a pesquisa científica no Brasil.

## Resumo

A doença de Chagas, descoberta por Carlos Chagas há aproximadamente 100 anos, ainda constitui um grave problema de Saúde Pública. É considerada doença extremamente negligenciada, uma vez que afeta exclusivamente as populações dos países em desenvolvimento. Os pacientes dessa doença são, em sua maioria, de baixa renda e, não representando mercado, ficam excluídos do escopo e dos esforços de Pesquisa e Desenvolvimento das Indústrias Farmacêuticas. Estima-se que entre 18 e 20 milhões de indivíduos estejam infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença e de, aproximadamente, 120 milhões, a população em risco de contaminação na América Latina. O tratamento da doença de Chagas continua sendo um desafio, pois apenas dois fármacos nitro-heterocíclicos são comercializados no mundo: nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>, Bayer) e benznidazol (Rochagan<sup>®</sup>, Roche), sendo este último, o único fármaco disponível no mercado brasileiro. Dentre os compostos potencialmente antichagásicos em estudo, o hidroximetilnitrofural (NFOH) mostrou maior atividade tripanomicida e menor mutagenicidade do que o nitrofural (composto matriz) em todos estágios de desenvolvimento de um fármaco. Em 2006, os estudos pré-clínicos de toxicidade mostraram que o NFOH apresentou DL<sub>50</sub> >2000 mg em ratos, dose considerada segura pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e promissor para a continuidade dos ensaios. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar a conversão *in vitro* e *in vivo* do NFOH em NF. Assim, metodologia analítica foi desenvolvida e validada para a determinação de NF e NFOH em matriz de plasma humano e rato e foram realizados estudos de conversão *in vitro* (pH 1,2 e 7,4) e ensaios *in vivo* (farmacocinéticos) em ratos. Os resultados mostraram que o NFOH apresenta estabilidade *in vitro*, é metabolizado em plasma (humano e de ratos) e também, provavelmente, pelo fígado. O NFOH apresentou perfil diferenciado de outros compostos hidroximetilados (altamente instáveis), com C<sub>max</sub> de 0,99 ug/mL, T<sub>máx</sub> de 1,00 h. Os resultados sugerem, também, que o NFOH, após a absorção, é melhor distribuído (cerca de 20 vezes) que o NF. O NFOH através dos estudos realizados aliado à estabilidade química favorecida pela sua estrutura, torna-se candidato a fármaco antichagásico para os estudos clínicos.

**Palavras-chaves:** *Trypanosoma cruzi*, hidroximetilnitrofural, metodologia analítica, conversão *in vitro* e *in vivo*, parâmetros farmacocinéticos.

## Abstract

Chagas disease, discovered by Carlos Chagas about a century ago and also known as American trypanosomiasis, is still a serious Public Health problem. The disease is considered extremely neglected because it afflicts exclusively populations in developing countries. Most Chagas' disease patients fall within the low income bracket and, being economically insignificant, are excluded from the research and development scope and efforts of the Pharmaceutical Industry. It is estimated that 18 and 20 million people in Latin America are infected with *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of the disease, and that approximately 120 million people are at risk of contamination in the continent. Chagas' disease treatment is a challenge because only two nitroheterocyclic drugs are market worldwide, namely nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>, Bayer) and benznidazol (Rochagan<sup>®</sup>, Roche), and the latter is the only drug available in the Brazilian market. Among the potentially anti-Chagas compounds under study, hydroxymethyl nitrofural (NFOH) has shown higher tripanomicide activity and lower mutagenicity than nitrofural (active compound) in all stages of development of the parasite. In 2006, preclinical toxicity studies showed that NFOH presented LD<sub>50</sub> higher than 2000 mg in rats. This value is considered safe by the World Health Organization (WHO) and promising for continuing test. In this context, the purpose of this work was to investigate the *in vivo* stability of NFOH. To this end, an analytical methodology was designed and validated for the determination of NF and NFOH in human and rat blood plasma. Conversion studies were carried out *in vitro* (pH 1.2 and 7.4) and *in vivo* (pharmacokinetic studies) with rats. The results indicated that NFOH presents *in vitro* stability, and is converted in plasma (human and rat) and in the liver. The NFOH displayed a profile different from that of other hydroxymethylated compounds (highly unstable), with a C<sub>max</sub> of 0.99 µg/ml, T<sub>max</sub> of 1.00 h. The studies accomplished with NFOH and its chemical stability suggested that it can be a potential new antichagasic drug for clinical studies.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, hydroxymethyl nitrofural, analytical methodology, *in vitro* and *in vivo* conversion, pharmacokinetic parameters.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Barbeiro ( <i>Triatoma infestans</i> ): inseto transmissor da Doença de Chagas ..	02
<b>Figura 2</b>	Distribuição geográfica da doença de Chagas .....	03
<b>Figura 3</b>	Casas de pau-a-pique que favorecem o crescimento do transmissor .....	03
<b>Figura 4</b>	Mortalidade produzida no Brasil entre 1980-1990 .....	04
<b>Figura 5</b>	Eliminação da transmissão: Incidência de Infecção 1980-2000 .....	05
<b>Figura 6</b>	Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i> .....	06
<b>Figura 7</b>	Edema de pálpebras (Sinal de Romaña) .....	08
<b>Figura 8</b>	Coração de pacientes que desenvolveram doença de Chagas e morreram por: (A) morte súbita (B) megacólon ou mega-esôfago (C) insuficiência cardíaca congestiva (ICC) .....	09
<b>Figura 9</b>	Estrutura química dos compostos benzimidazol (I), nifurtimox (II), furazolidona (III), metronidazol (IV), secnidazol (V), ornidazol (VI) e tinidazol (VII) utilizados como anti-protozoários e antimicrobianos .....	11
<b>Figura 10</b>	Resumo da relação entre a estrutura química e a atividade dos nitrofuranos (CHUNG, M.C., no prelo) .....	12
<b>Figura 11</b>	Estrutura química dos compostos semicarbazona (VIII), heptilcarbazato (XI) e adamantil (X), sintetizados por AGUIRRE et al., 2006 .....	13
<b>Figura 12</b>	Estruturas químicas dos compostos derivados de nitrofurilsemicarbazona com rênio (XI) e rutênio (XII) desenvolvidos por OTERO et al., 2006 .....	13
<b>Figura 13</b>	Estrutura química de complexos de nitrofuriltio semicarbazona com paládio (XIII) .....	14
<b>Figura 14</b>	Estrutura química dos principais derivados de benzimidazóis (XIV) e (XV) com atividade contra <i>T. cruzi</i> (BOIANI et al., 2006) .....	14
<b>Figura 15</b>	Relação de formação de produtos radicalares por ação de nitrofuranos (adaptado de DOCAMPO et al., 1986) .....	15
<b>Figura 16</b>	Estrutura cristalográfica da Tripanotiona Redutase do <i>T. cruzi</i> (à esquerda) (ZHANG, 1996) e da Glutationa Redutase Humana (à direita); (BECKER, 1998) .....	16
<b>Figura 17</b>	Estrutura química da carmustina (XVI) .....	17
<b>Figura 18</b>	Possíveis mecanismos de mutagenicidade dos nitrofurânicos. Fonte: Adaptado de McCALLA, 1983; MECCA et al., 2002; HIRAKU, 2004 .....	18
<b>Figura 19</b>	Ativação por redução de compostos nitroaromáticos (TOCHER, 1997) .....	19
<b>Figura 20</b>	Diferenças entre Fármaco, Pró-fármaco e Análogo. (CHUNG, 2005) .....	22
<b>Figura 21</b>	Estruturas químicas de novos compostos antichagásicos: (XVII) ravuconazol, (XVIII) TAK-187, (XIX) K-777 e (XX) D-0870 (CROFT et al., 2005) .....	25
<b>Figura 22</b>	Estruturas química dos compostos antichagásicos (I) e (II) AGUIRRE et al., 2005) .....	26
<b>Figura 23</b>	Projetos de compostos antichagásicos em desenvolvimento (DNDI, 2006) .....	26
<b>Figura 24</b>	Estrutura química do NF .....	27
<b>Figura 25</b>	Estrutura química do NFOH .....	28



<b>Figura 26</b>	Efeito de 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M de NF e NFOH; 10 $\mu$ M 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> (CHUNG et al., 2003) .....	28
<b>Figura 27</b>	Atividade mutagênica ( <i>S.typhimurium</i> cepa TA98) dos compostos NFOH e NF em ensaios com (+S9) e sem ativação metabólica (S9) (GUIDO et al., 2000) .....	29
<b>Figura 28</b>	Atividade mutagênica ( <i>S.typhimurium</i> cepa TA102) dos compostos NFOH e NF em ensaios com (+S9) e sem ativação metabólica (S9) (GUIDO et al., 2000) .....	30
<b>Figura 29</b>	Hidrólise da fenacetina levando ao metabólito <i>p</i> -fenetidina inativo.....	32
<b>Figura 30</b>	Hidrólise de pró-farmacos derivados da ampicilina .....	34
<b>Figura 31</b>	Hidrólise do enalapril levando a formação do ácido enalaprilato (ativo) .....	35
<b>Figura 32</b>	Hidrólise da lovastatina em seu metabólito ativo derivado hidróxi-ácido .....	35
<b>Figura 33</b>	Hidrólise do derivado 4-amidazolidinona no composto ativo prilocaína .....	36
<b>Figura 34</b>	Mecanismo de conversão alcalina para compostos derivados de <i>N</i> -(hidroximetil) (LARSEN e BUNDGARD, 1994; TESTA e MAYER, 2003) ....	36
<b>Figura 35</b>	Estrutura química do antifúngico fluconazol .....	42
<b>Figura 36</b>	Esquema da reação de preparação de NFOH .....	46
<b>Figura 37</b>	Fluxograma dos parâmetros investigados para análise de NF e NFOH. em plasma humano .....	50
<b>Figura 38</b>	Fluxograma do método proposto para análise de NF e NFOH .....	51
<b>Figura 39</b>	Espectros de absorbância no UV-Vis obtidos para o NFOH e o NF .....	61
<b>Figura 40</b>	Espectro no Infravermelho do NF (FT-IR)-pastilha de KBr .....	62
<b>Figura 41</b>	Espectro no Infravermelho do NFOH (FT-IR)- pastilha de KBr .....	63
<b>Figura 42</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H ampliado (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ ppm) do fármaco NF .....	66
<b>Figura 43</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ ppm) do fármaco NF .....	66
<b>Figura 44</b>	Espectro no RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ ppm) do pró-fármaco NFOH .....	67
<b>Figura 44-A</b>	Espectro no RMN <sup>1</sup> H ampliado (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ ppm) do pró-fármaco NFOH .....	67
<b>Figura 45</b>	Espectro no RMN <sup>13</sup> C (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ ppm) do pró-fármaco NFOH .....	68
<b>Figura 46</b>	Espectro DEPT (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ ppm) do NFOH .....	68
<b>Figura 47</b>	Cromatograma (CLAE-UV) (1) solução NF (2,5 $\mu$ g/mL); (2) solução NFOH (2,5 $\mu$ g/mL).Fase Móvel: tampão acetato de sódio/ácido acético pH 4,6 (79:21/v:v) a 365 nm .....	69
<b>Figura 48</b>	Curva analítica para NF, à $\lambda$ = 365 nm .....	70
<b>Figura 49</b>	Curva analítica para NFOH, à $\lambda$ = 365 nm .....	71
<b>Figura 50</b>	Fluxograma do procedimento analítico proposto .....	74
<b>Figura 51</b>	Curva analítica em plasma humano para NF .....	75

<b>Figura 52</b>	Curva analítica em plasma humano para NFOH .....	76
<b>Figura 53</b>	Curvas de degradação de NFOH e a taxa de formação de NF, em solução tampão acetato de sódio (pH 1,2), à 37 °C .....	81
<b>Figura 54</b>	Curvas de degradação de NFOH e a taxa de formação de NF, em solução tampão acetato de sódio (pH 7,4), à 37 °C .....	82
<b>Figura 55</b>	Esquema do mecanismo de decomposição de NFOH em NF (adaptado de TESTA e MAYER, 2003) .....	83
<b>Figura 56</b>	Estruturas tautoméricas propostas para o NFOH em meio básico .....	84
<b>Figura 57</b>	Curvas de degradação de NFOH e a taxa de formação de NF em plasma (pH 7,4) a 37°C .....	86
<b>Figura 58</b>	Perfil farmacocinético <i>in vivo</i> do NF .....	87
<b>Figura 59</b>	Perfil farmacocinético <i>in vivo</i> do NFOH .....	88
<b>Figura 60</b>	Estudo comparativo das conversões do NFOH em NF, após $C_{m\acute{a}x}$ , em plasma humano e <i>in vivo</i> .....	89
<b>Figura 61</b>	Energia mínima dos conformeros de NF e de NFOH (fase gasosa): A) modelo de tubo; B) MEPs (nível discreto) na faixa de -65 (vermelho intenso) a 30 (azul intenso) kcal/mol (0.002 e/au <sup>3</sup> ); C) distribuição do orbital LUMO (0.032 eV); D) Mapa de LUMO (nível discreto) (0.000 (vermelho) para 0.012 (azul) kcal/mol) . Cor dos átomos: C (cinza), O (vermelho), N (azul) and H (branco). (TROSSINI et al,2006) .....	92

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Infecção humana do <i>T. cruzi</i> e redução da incidência no cone Sul, 1983 – 1999.....	05
<b>Tabela 2</b>	Principais efeitos colaterais observados no tratamento específico da doença de Chagas .....	12
<b>Tabela 3</b>	Valores de referência para determinação de solubilidade .....	47
<b>Tabela 4</b>	Método para a obtenção dos parâmetros farmacocinéticos .....	57
<b>Tabela 5</b>	Propriedades físico-químicas do NF e NFOH .....	59
<b>Tabela 6</b>	Solubilidade do NF e NFOH em diferentes solventes .....	60
<b>Tabela 7</b>	Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de NF e NFOH (DMSO-d <sub>6</sub> , 300 MHz para <sup>1</sup> H e 150 MHz para <sup>13</sup> C) .....	65
<b>Tabela 8</b>	Concentração de NF (µg/mL) x área (triplicata) .....	70
<b>Tabela 9</b>	Concentração de NFOH (µg/mL) x área (triplicata) .....	71
<b>Tabela 10</b>	Tempo de retenção e equações das curvas analíticas e coeficientes de correlação dos fármacos estudados em acetonitrila utilizando como fase móvel acetonitrila: tampão acetato de sódio/ácido acético pH 4,6 (21/79% v/v) (CLAE-UV-vis) .....	71
<b>Tabela 11</b>	Tempo de retenção e equações das curvas analíticas e coeficientes de correlação dos fármacos estudados em plasma utilizando como fase móvel acetonitrila: tampão acetato de sódio/ácido acético pH 4,6 (21/79% v/v) (CLAE-UV-vis) .....	75
<b>Tabela 12</b>	Equações das curvas analíticas, coeficientes de correlação e repetitividade do tempo de retenção (intra e inter dias) dos fármacos .....	76
<b>Tabela 13</b>	Sumário dos resultados de recuperação obtidos nos testes intra e inter-ensaios para os fármacos NF e NFOH no método ELL/CLAE .....	77
<b>Tabela 14</b>	Estudo do tempo de congelamento (1, 2, 3, 8 e 22 dias) das amostras de plasma humano fortificadas com NF e NFOH .....	79
<b>Tabela 15</b>	Valores (µg) obtidos a partir de hidrólise <i>in vitro</i> (pH 1,2) de 15 µg NFOH em 120 horas .....	80
<b>Tabela 16</b>	Ensaio de conversão <i>in vitro</i> do NFOH em pH 7,4 .....	82
<b>Tabela 17</b>	Ensaio de conversão em plasma do NFOH .....	85
<b>Tabela 18</b>	Perfil Farmacocinético <i>in vivo</i> do NF.....	87
<b>Tabela 19</b>	Perfil Farmacocinético <i>in vivo</i> do NFOH e NF obtido da biotransformação do NFOH .....	88
<b>Tabela 20</b>	Valores de % de NFOH (plasma e <i>in vivo</i> ) e tempo (horas) .....	89
<b>Tabela 21</b>	Parâmetros farmacocinéticos após administração de dose única oral de NF e NFOH (200 mg/kg) em ratos Wistar (n=5) .....	90

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDER	Center for Drug Evaluation and Research
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
$Cl_t/F$	Clearance total aparente
$C_{max}$	Concentração plasmática máxima
CV	Coeficiente de variação
DHFR	Diidrofolato redutase
FDA	Food and Drug Administration
IV	Espectrometria no Infravermelho
$K_{el}$	Constante de velocidade de eliminação
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
NF	Nitrofural
NFOH	Hidroximetilnitrofural
QSAR	Relação Estrutura Atividade Quantitativa
$R^2$	Coeficiente de correlação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
$T_{1/2\alpha}$	Meia vida de distribuição
$T_{1/2\beta}$	Meia vida de eliminação
$T_{1/2a}$	Meia vida de absorção
$T_{max}$	Tempo necessário para atingir a $C_{max}$
TR	Tripanotiona redutase
UV-vs	Espectrometria de Ultravioleta visível
$V_d/F$	Volume de distribuição aparente

## SUMÁRIO

Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Doença de Chagas: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	1
1.1.1. Epidemiologia .....	2
1.1.2. Ciclo Evolutivo e Vias de Transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
1.1.3. Manifestações Clínicas.....	8
1.1.4. Compostos nitro-heterocíclicos com atividade na doença de Chagas .....	11
1.1.5 Mecanismo de Ação .....	15
1.1.6 Toxicidade .....	18
1.2 Planejamento de Novos Fármacos .....	21
1.2.1 Nitrofurais.....	27
1.2.2 Hidroximetilnitrofurais.....	28
1.2.3 A importância da hidrólise no planejamento de pró- fármacos.....	32
1.3 Noções gerais sobre parâmetros farmacocinéticos.....	36
2. OBJETIVOS .....	43
2.1. Objetivo Geral .....	43
2.2. Objetivos Específicos .....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	44
3.1. Material.....	44
3.1.1. Equipamentos .....	44
3.1.2. Reagentes e Solventes .....	44
3.1.3. Material Biológico .....	45
3.2. Métodos.....	45
3.2.1. Limpeza da vidraria .....	45
3.2.2. Preparação do pró-fármaco hidroximetilnitrofurais (II) .....	45
3.3. Técnicas Analíticas de Identificação do NFOH .....	46
3.3.1. Determinação da Faixa de Fusão .....	46
3.3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	46
3.3.3. Determinação da solubilidade de NF e NFOH .....	46
3.3.4 Espectrometria no Ultravioleta (UV) .....	47
3.3.5. Espectrometria no Infravermelho (IV).....	47
3.3.6. Espectrometria de RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>13</sup> C.....	47
3.3.7. Equipamento e condições cromatográficas.....	47
3.4. Procedimento Analítico.....	48
3.4.1. Preparação da Solução Tampão Acetato de Sódio/Ácido Acético (pH 4,6) ...	48
3.4.2. Preparação das soluções dos padrões .....	48
3.4.3. Determinação da linearidade de resposta do detector (UV) em acetonitrila....	49
3.4.4. Determinação da linearidade de resposta do detector (UV) em plasma humano .....	49
3.5. Desenvolvimento e validação de método para determinação dos fármacos em plasma humano .....	49
3.5.1. Parâmetros investigados .....	49
3.5.2. Avaliação do método proposto .....	51
3.5.3. Fortificação das amostras .....	52
3.5.4. Exatidão e precisão intra e inter- ensaios.....	52
3.5.5. Determinação do limite de detecção e quantificação do equipamento (CLAE-UV).....	53

3.5.6. Estudo da estabilidade dos fármacos em amostra congelada .....	53
3.6. Conversão <i>in vitro</i> do pró-fármaco NFOH .....	54
3.6.1. Conversão em pH 1,2 e 7,4.....	54
3.6.2. Conversão <i>in vitro</i> em plasma humano .....	54
3.7. Farmacocinética em modelos animais .....	55
3.7.1. Protocolo Experimental .....	55
3.7.2. Análise Farmacocinética .....	57
3.7.3. Análise Estatística .....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1. Preparação e caracterização estrutural.....	58
4.1.1. Determinação da solubilidade de NF e NFOH .....	60
4.1.2. Espectrometria no UV .....	61
4.1.3. Espectrometria no Infravermelho (IV).....	62
4.1.4. Espectrometria de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C .....	64
4.1.5. Condições cromatográficas .....	69
4.1.6. Preparação das curvas analíticas (CLAE) do NF e NFOH em acetonitrila.....	70
4.2. Desenvolvimento e validação de método para determinação dos fármacos em plasma humano.....	72
4.2.1. Otimização das condições de extração de NF e NFOH de plasma usando a técnica de extração líquido /líquido .....	73
4.3. Preparação das curvas analíticas do NF e NFOH em plasma humano .....	75
4.4. Avaliação da eficiência do método proposto: exatidão e precisão .....	77
4.4.1. Exatidão intra-ensaio e precisão intra-ensaio (ou repetibilidade) .....	77
4.4.2. Exatidão inter-ensaio e precisão inter-ensaio (ou precisão intermediária) .....	77
4.4.3. Limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....	79
4.4.4. Estabilidade de NF e NFOH .....	79
4.5. Ensaio de conversão <i>in vitro</i> .....	80
5. CONCLUSÕES .....	93
REFERÊNCIAS .....	95
ANEXO .....	116

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doença de Chagas: *Trypanosoma cruzi*

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, 2007). Em países subdesenvolvidos a incidência das doenças parasitárias é favorecida. Estas infecções estão relacionadas com as baixas condições sócio-econômicas somadas à falta de educação e saúde. Como consequência, ocorre o comprometimento do estado físico do hospedeiro, diminuindo sua resistência (TRACY, 2001; MARTINEZ et al., 2005). Outros fatores incluem a alta densidade populacional, controle inadequado dos vetores e reservatórios responsáveis por estas infecções, aumento da migração populacional, operações militares, principalmente, a falta de fármacos eficazes utilizados na quimioterapia (TRACY, 2001, DRUMOND e MARCOPITO, 2006; IRIBARNE et al., 2007).

Em um relatório histórico, Charles Darwin (1835) descreve o ataque sofrido por um barbeiro (benchuca), o inseto triatomíneo dos Pampas (Argentina), o qual sabe-se agora ser o vetor da doença de Chagas. No momento deste relato histórico o autor não poderia ter previsto o impacto futuro do inseto e da doença por ele transmitida (NITZ et al., 2004).

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. 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 1*), devido ao seu hábito de picar a face das pessoas (URBINA, 2003; WILLIAMS-BLANGERO, 2003; WHO, 2007).



**Figura 1.** Barbeiro (*Triatoma infestans*): inseto transmissor da Doença de Chagas.  
Fonte: <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTinf.html> (acessado em 28/06/2006)

Vianna, em 1911 mostrou que este parasito reproduz intracelularmente em forma amastigota por fissão binária em vários tecidos de hospedeiro mamíferos (NITZ et al., 2004). Mamíferos pertencentes a várias classes, entre as quais, marsupiais, edentados, lagomorfos, roedores, carnívoros, primatas e quirópteros são hospedeiros para *T.cruzi*. A doença de Chagas, juntamente com outras parasitoses (malária, leishmaniose e esquistossomose), é uma das doenças parasitárias mais graves da América Latina, com alto impacto socio econômico (NWAKA e HUDSON, 2006).

### 1.1.1. Epidemiologia

Atualmente, de 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* e cerca de 5 a 6 milhões destas têm desenvolvido complicações crônicas incuráveis, tais como lesões cardíacas, neurológicas e desordens digestivas. A abrangência dessa doença ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, incluindo 21 países latino-americanos, principalmente nas Américas Central e Sul (Figura 2). Dados da Organização Mundial da Saúde indicam 50.000 mortes/ano e cerca de 120 milhões de indivíduos ainda expostos ao risco de infecção (MECCA et al., 2002; NEVES et al, 2002; AGUIRRE et al, 2005; RIGOL et al., 2005; WHO, 2007).





**Figura 2.** Distribuição geográfica da doença de Chagas.  
Fonte: [www.saberweb.com.br](http://www.saberweb.com.br) (acessado em 26/01/2008)

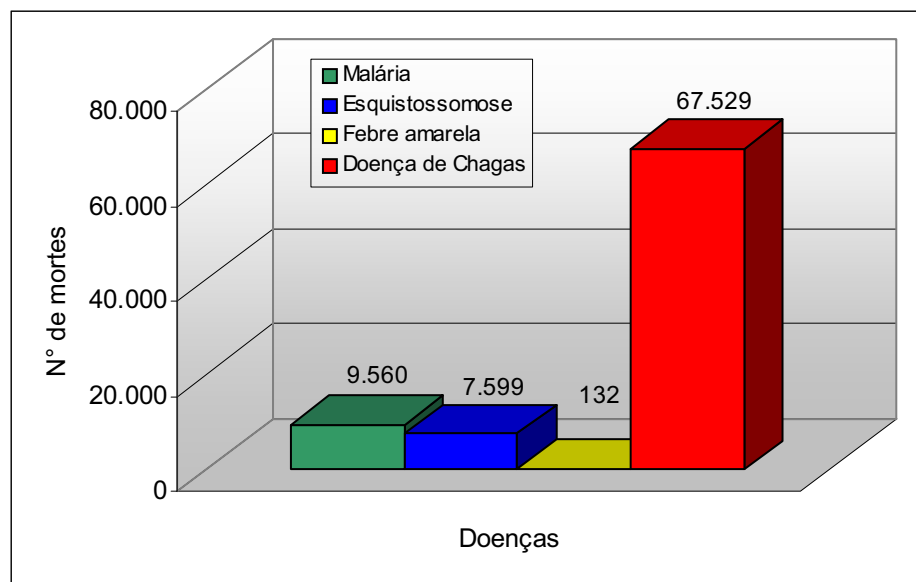
No Brasil, a doença espalha-se por uma área de 3.600.000 de quilômetros quadrados, envolvendo 2.493 municípios e deixando sob risco de infecção 28 milhões de pessoas. A população infectada chega a 4,3% da população, ou seja, 6 a 8 milhões, sendo 60% na área urbana (DIAS, 2000). Estes compreendem, em sua maioria, indivíduos de origem rural e pertencentes aos níveis sócio-econômicos mais baixos, contaminados através de fezes infectadas de triatomíneos (Figura 3). É estimado que, 25 a 30% dos indivíduos infectados terão seus quadros patológicos evoluídos para danos irreversíveis (TDR, 2005).



**Figura 3.** Casas de pau-a-pique que favorecem o crescimento do transmissor.  
Fonte: [http://www.cactos.com.br/br/images/paisagens/400x280\\_casebre.jpg](http://www.cactos.com.br/br/images/paisagens/400x280_casebre.jpg)  
(acessado em 28/06/2006)

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, 2005; SZAJNMAN et al, 2005). Em 1980, a doença de

Chagas foi considerada como causa mais freqüente de morte súbita na cidade de Uberaba (24%), sendo 31% indivíduos assintomáticos. Estudos serológicos realizados pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) entre 1975 e 1980 e por Coura e seus colaboradores entre 1971 e 2000 na Amazônia brasileira revelou a taxa de prevalência entre 2 e 13% (DIAS, 2000; SCHMUÑIS, 2000; TEIXEIRA et al, 2002; AGUILAR et al., 2007). Quando a mortalidade produzida por várias enfermidades foi comparada, no Brasil entre 1980-1990, observou-se que os óbitos por malária, esquistossomose e febre amarela foram de 9.560, 7.599 e 132 respectivamente, enquanto os notificados como provocados pela doença de Chagas foram de 67.529, como mostra a Figura 4. Na última década, observou-se decréscimo nestes números, contudo, a taxa de mortalidade parece manter-se na ordem de 15 e 18 mil pessoas/ano (SCHMUÑIS, 2000; WHO, 2007).



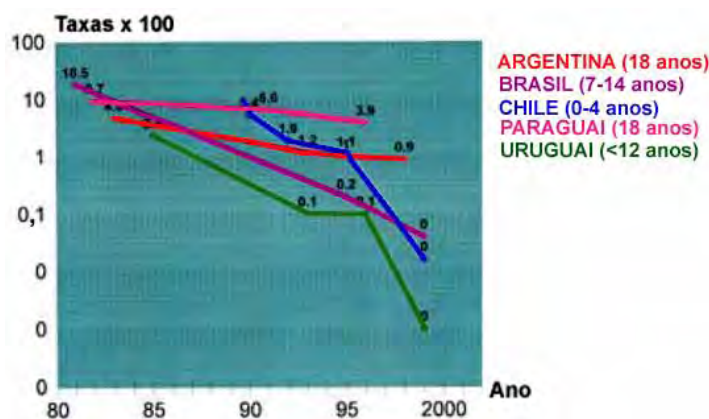
**Figura 4.** Mortalidade produzida no Brasil entre 1980-1990.  
Fonte: SCHMUÑIS, 2000.

Dados epidemiológicos (Figura 5 e Tabela 1) mostram redução na prevalência de casas infestadas por *T. infestans* e na incidência de infecções humanas em crianças e jovens em países pertencentes ao Programa de Iniciativa de Países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), registrando-se decréscimo considerável, especialmente do Brasil, com perspectivas de eliminação dessa forma de transmissão (MONCAYO, 2003).

**Tabela 1.** Infecção humana do *T. cruzi* e redução da incidência no cone Sul, 1983 – 1999.

Países	Idade (anos)	Infecções em 1983 (taxas x 100)	Infecções em 1999 (taxas x 100)	Redução da incidência (%)
Argentina	18	4,5	1,2	85,0
Brasil	7-14	18,5	0,17	96,0
Bolívia	1-4	33,9	ND	ND
Chile	0-10	5,4	0,14	99,0
Paraguai	18	9,3	3,9	60,0
Uruguai	6-12	2,5	0,06	99,0

Fonte: WHO, 2006

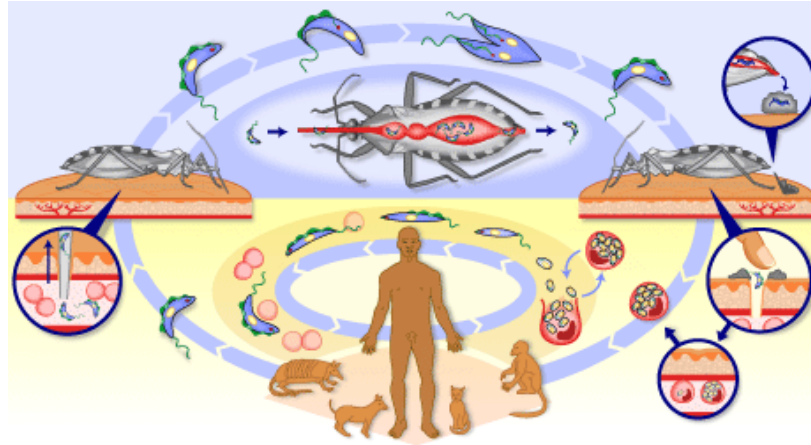
**Figura 5.** Eliminação da transmissão: Incidência de Infecção 1980-2000Fonte: <http://www.who.int/ctd/chagas/epidemiology.htm> (acessado em 28/06/2006).

Estes dados, aparentemente, são favoráveis, demonstrando diminuição na transmissão da doença. Entretanto, apesar deste decréscimo, não se observa diminuição nos quadros de número de indivíduos chagásicos, sugerindo a existência de outras formas de transmissão importantes.

A perda econômica do Continente Americano devido à mortalidade precoce de adultos jovens em idade produtiva alcança 8.156 milhões de dólares, o equivalente a 2,5% da dívida externa de todo o Continente, o que acarreta grave problema econômico social (WHO, 2007).

### 1.1.2. Ciclo Evolutivo e Vias de Transmissão do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* inicia-se pela ingestão, pelo vetor triatomíneo, de sangue infectado contendo as formas tripomastigotas do parasito (Figura 6).



**Figura 6.** Ciclo evolutivo do *T. cruzi*.

Fonte: [http:// www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm) (acessado em 28/06/2006)

Os parasitas ingeridos sofrem diferenciação para a forma epimastigota no lumen intestinal do inseto, local onde ocorre a proliferação parasitária. Os parasitas, ao atingirem a parte posterior do intestino do inseto vetor, modificam-se para formas tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes do parasita. Estas são eliminadas pelas fezes e urina do triatomíneo.

A infecção pelo *T. cruzi* tem início quando os parasitas eliminados pelo inseto entram em contato com uma lesão na pele ou mucosa do vertebrado. A maneira mais comum de transmissão é a vetorial, através da picada do “barbeiro”, que durante a ingestão de sangue, deposita suas fezes próximas ao local da picada. A picada provoca irritações locais, facilitando o acesso do parasita ao interior do organismo. Caso a picada seja próxima dos olhos ou da boca, o parasita pode penetrar pelas mucosas. Dentro do organismo do vertebrado as formas tripomastigotas metacíclicas do parasita passam por transformação para as formas amastigotas, reproduzindo-se por fissão binária. O hospedeiro apresenta hipersensibilidade no local de entrada do parasita com intensa destruição celular. Esta faz com que formas amastigotas se transformem em tripomastigotas, que são liberadas nos vasos periféricos e estarão aptos para infectar novas células em outros pontos do organismo, como músculos lisos e tecido nervoso.

Assim, a transformação de amastigotas para tripomastigotas pode ocorrer em outros pontos do organismo, continuando o ciclo da infecção. 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).

A transmissão de *T. cruzi* para humanos e outros mamíferos ocorre por diferentes mecanismos (DIAS e SCHOFIELD, 1999; COURA e CASTRO, 2002). Do ponto de vista epidemiológico e de importância significativa em Saúde Pública, interessam para a transmissão da doença de Chagas a via vetorial, pela picada do inseto triatomíneo. No início da década de 1990 houve um marco no combate à doença de Chagas na América do Sul. Os países do Cone Sul adotaram uma resolução denominada “Ação para eliminar o *T. infestans*”. Foram empregados milhões de dólares no controle do vetor e em testes nos bancos de sangue. No Brasil, o *T. infestans* praticamente já foi eliminado, preocupação agora é com outras espécies, consideradas vetores secundários, como *T. sordida*, *T. brasiliensis* e em algumas áreas, *Panstrongylus megistus*.

Estudos entomológicos demonstraram que as espécies secundárias de triatomíneos vêm aumentando sua densidade nos domicílios nos últimos anos. 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).

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).

### 1.1.3. 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 7) e consiste no inchaço de ambas as pálpebras do olho infectado (NEVES, 2002).



**Figura 7.** Edema de pálpebras (Sinal de Romanã).

Fonte: <http://www.cpqrr.fiocruz.br>

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; SILVA, 1999; 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 consiste

em infecção sem sintomas. Nesta fase, a infecção pode nunca se evidenciar clinicamente, ou somente se manifestar muitos anos mais tarde (WENDEL et al., 1992; WHO, 2007).

Cerca de um terço dos casos agudos da doença de Chagas evolui para a fase crônica. Esta fase de baixa parasitemia e afebril permanece ao longo da vida do paciente. É representada por diversas formas clínicas, afetando um ou mais órgãos de forma irreversível, destacando-se as alterações cardíacas como as principais (FIGURA 8). 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 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).  
Fonte: <http://www.fmtm.br/instpub/fmtm/patge/mac0220.htm> (acessado em 31/10/2006)

Cerca de 30 a 40% dos pacientes que apresentam sintomas da fase crônica desenvolvem lesões irreversíveis no coração e trato intestinal, como conseqüência de um processo inflamatório associado com a persistência parasitária. Este quadro pode levar à morte súbita e/ou danos digestivos do paciente, principalmente megavisceral e desordens nervosas periféricas (CAZZULO et al., 2001; URBINA et al., 2003).

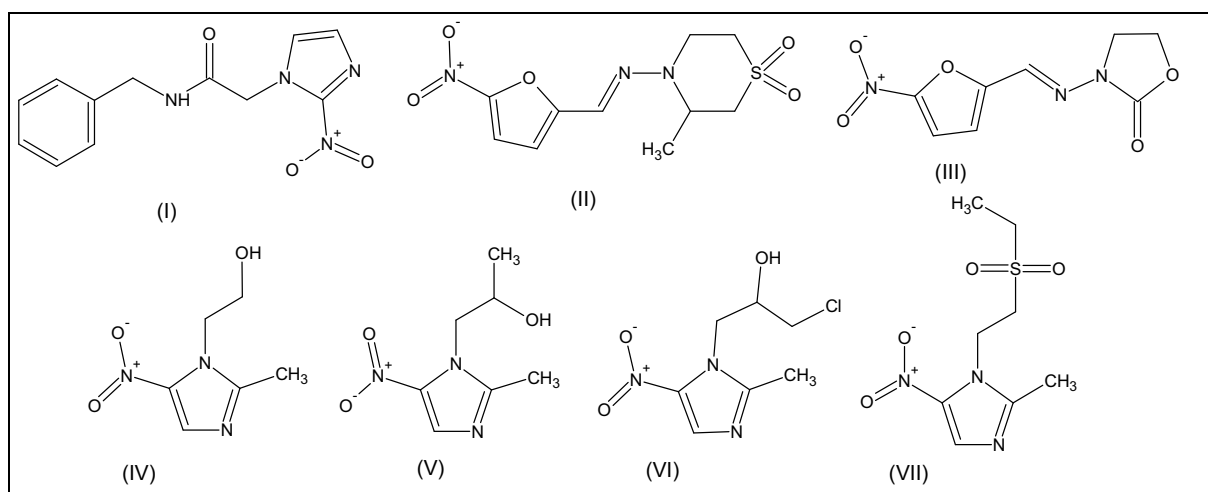
A prevalência das manifestações digestivas ou cardíacas na doença de Chagas depende principalmente da região endêmica. É comum encontrar casos de megaesôfago na região central do Brasil, sendo essa manifestação rara em outras áreas. Atualmente, estima-se que existem no Chile ao redor de 150.000 indivíduos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

A forma cardíaca apresenta como principais sintomas a arritmia (75000 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).



### 1.1.4. 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 9), 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 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.

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 (Lampit<sup>®</sup>, Bayer) e o benznidazol (Radanil<sup>®</sup>, Rochagan<sup>®</sup>, Roche) (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, 2005; 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).

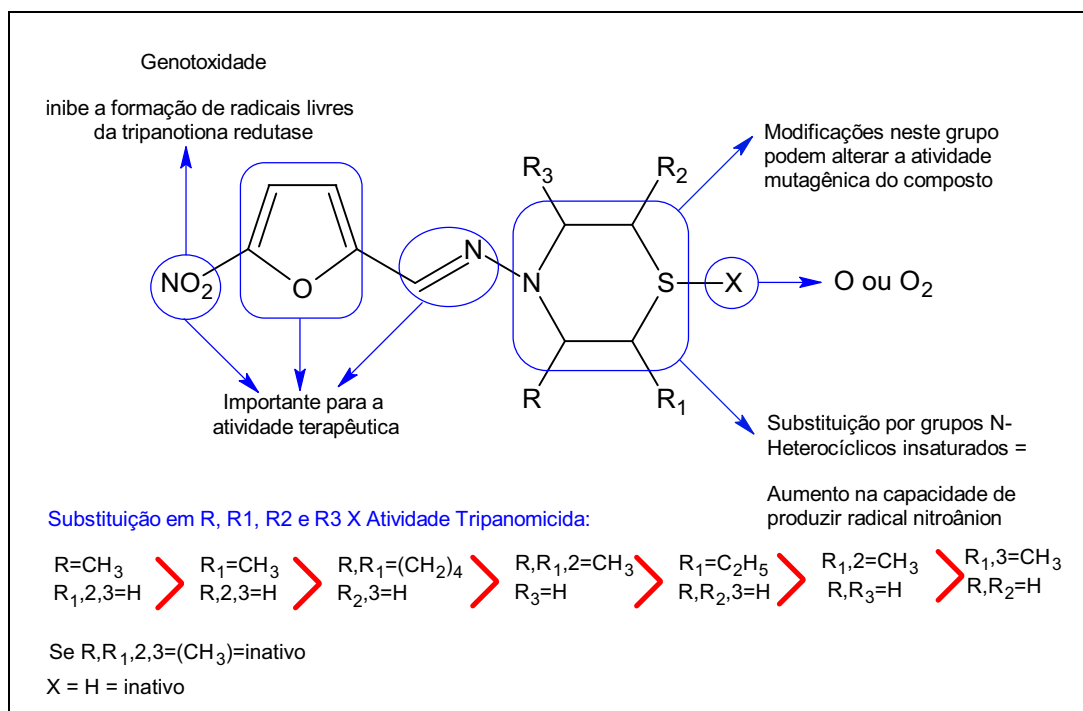
Estes compostos, nifurtimox e benznidazol, apresentam ainda outros inconvenientes (Tabela 2), tais como: (a) graves e freqüentes efeitos colaterais como vômito, anorexia, neuropatia periférica, dermatopatia alérgica, alterações psíquicas, mutagenicidade, entre outras; (b) sensibilidade seletiva para diferentes cepas de *T.cruzi*; (c) tratamentos muito longos (JANNIN e VILLA, 2007; KOROLKOVAS, 2002).

**Tabela 2.** 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	++	+++

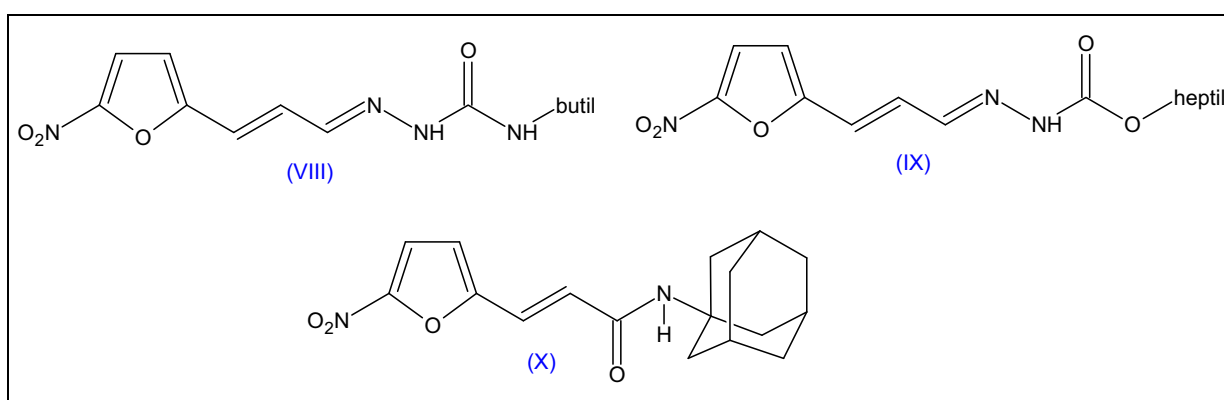
Fonte: CANÇADO, 1997; RASSI et al., 2000.

A relação entre a estrutura química e a atividade de nitrofuranos está resumida na Figura 10.



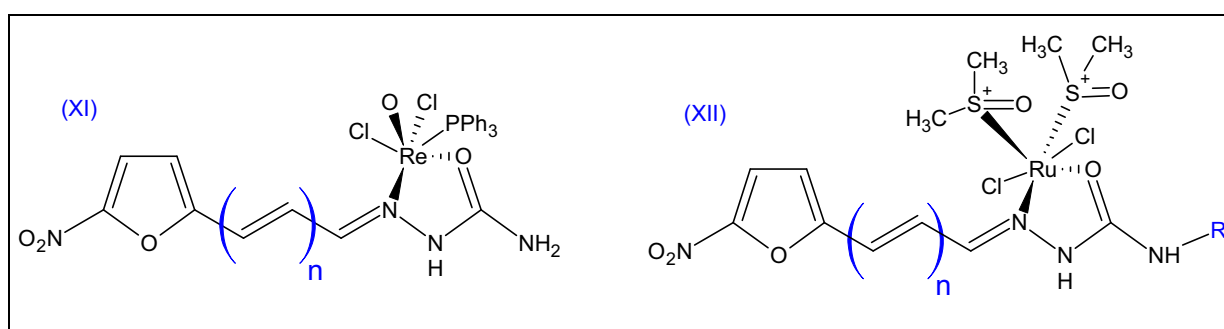
**Figura 10.** Resumo da relação entre a estrutura química e a atividade dos nitrofuranos (CHUNG, M.C., no prelo).

Novos derivados 5-nitrofurânicos, semicarbazonas (VIII), carbazatos (XI), e amidas (X) (Figura 11) mostraram excelente atividade tripanomicida: a presença de cadeias apolares em cada família dos derivados resultou em compostos mais ativos do que aqueles com substituintes menos apolares. Os derivados de carbazatos apresentaram maior atividade que os de semicarbazonas, sendo o heptil carbazato (IX) o composto mais potente (AGUIRRE et al., 2006), enquanto a presença do grupo apolar adamantil (X), confere a este composto uma melhor atividade tripanomicida .



**Figura 11.** Estrutura química dos compostos semicarbazona (VIII), heptilcarbazato (IX) e adamantil (X), sintetizados por AGUIRRE et al., 2006.

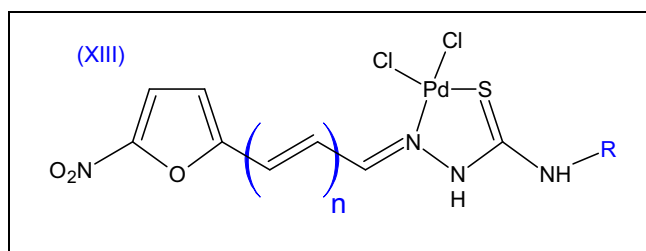
O experimento de OTERO et al.(2006) mostra que complexos derivados de nitrofurilsemicarbazona com rênio (XI) ou rutênio (XII) (Figura 12), podem ser um bom ponto de partida no planejamento de novos compostos com atividade contra *T. cruzi*, pois aumentam o estresse oxidativo e os níveis de ligação com o DNA.



**Figura 12.** Estruturas químicas dos compostos derivados de nitrofurilsemicarbazona com rênio (XI) e rutênio (XII) desenvolvidos por OTERO et al., 2006.

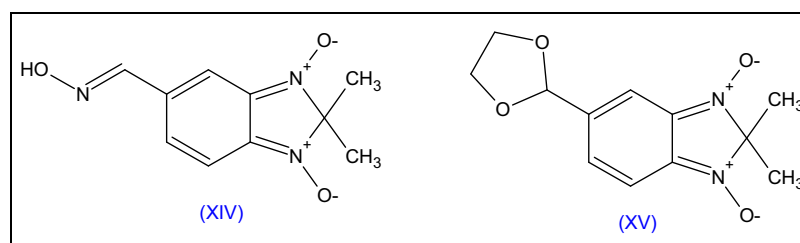
Em outro experimento, OTERO e colaboradores (2006) desenvolveram complexos derivados de nitrofuriltio semicarbazona com paládio (XIII) (Figura 13). Tais compostos em testes *in vitro* mostraram-se mais ativos que o nifurtimox. O

efeito tripanomicida pode ser explicado pelo principal mecanismo de ação desses compostos, os quais estão relacionados com o aumento do estresse oxidativo.



**Figura 13.** Estrutura química de complexos de nitrofurilto semicarbazona com paládio.

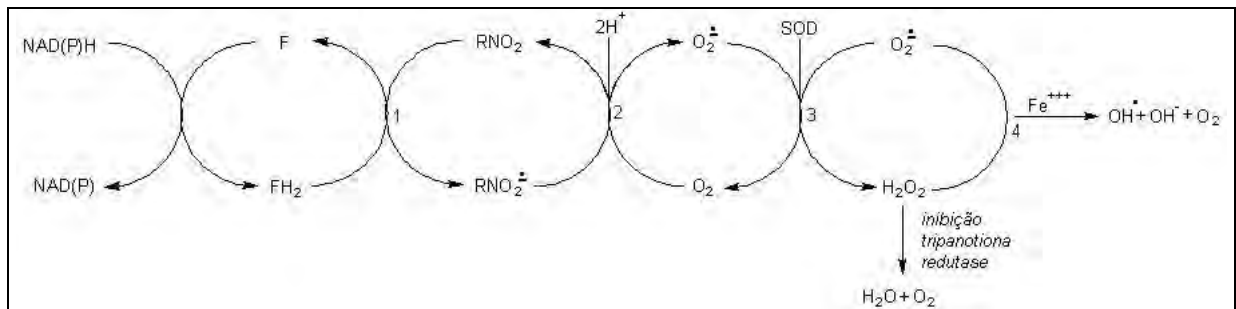
BOIANI e colaboradores (2006) desenvolveram diversos compostos derivados de benzimidazóis com atividade *in vivo* contra o *T. cruzi* e, entre estes, os compostos mais promissores, com baixa toxicidade, estão apresentados na Figura 14.



**Figura 14.** Estrutura química dos principais derivados de benzimidazóis (XIV) e (XV) com atividade contra *T. cruzi* (BOIANI et al., 2006).

### 1.1.5 Mecanismo de Ação

Com base nos efeitos tóxicos observados em mamíferos, a ação tripanomicida de nitrofuranos como o nifurtimox, se deve, provavelmente, à formação do ânion superóxido  $O_2^{\cdot-}$  e, conseqüentemente, à formação de peróxido de hidrogênio,  $H_2O_2$ , via ação da superóxido dismutase (SOD) como mostra a FIGURA 15 (DOCAMPO et al., 1986; KRAUTH-SIEGEL et al., 2005).



**Figura 15.** Relação de formação de produtos radiculares por ação de nitrofuranos (adaptado de DOCAMPO et al, 1986).

O *T. cruzi* possui a enzima superóxido dismutase responsável pela conversão de  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , mas se mostra deficiente quanto à presença das enzimas catalase e glutathiona redutase, responsáveis, respectivamente, pela decomposição de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ .

Os nitrofuranos podem ser reduzidos por flavoproteínas (Figura 15: etapa 1). O nitroânion radicalar formado reduz, geralmente,  $O_2$  a  $O_2^{\cdot-}$  (Figura 15: etapa 2). O nitrocomposto é então regenerado nesta etapa do processo, iniciando o ciclo redox e grande quantidade de  $O_2^{\cdot-}$  é gerada. Desta maneira, o ânion superóxido é subsequêntemente dismutado em reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD) para formar  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Figura 15: etapa 3).

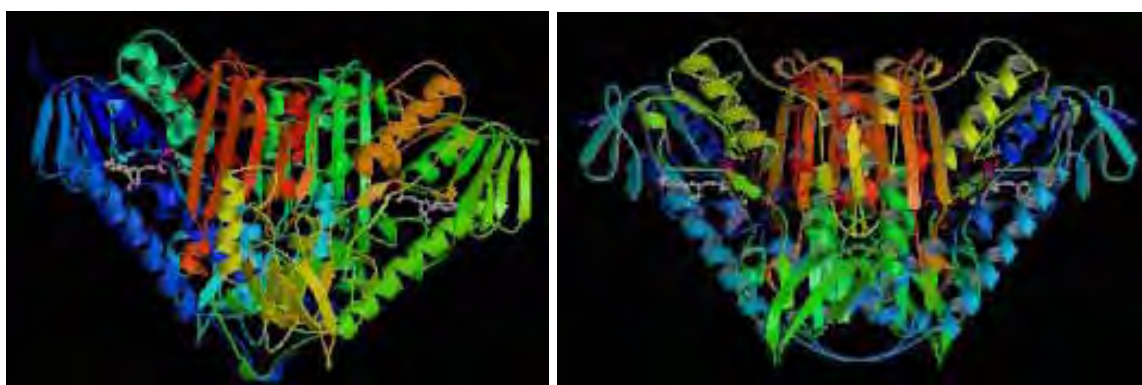
O ânion superóxido e  $H_2O_2$ , também participam de reações catalisadas por metais, como o íon férrico ( $Fe^{3+}$ ), para formar outras espécies de oxigênio ativo, tóxicos, tais como o radical hidroxila  $OH^{\cdot}$  e oxigênio singlete  $^1O_2$  (Figura 15: etapa 4). Estes radicais extremamente reativos reagem com o DNA, provocando danos extensivos. Provocam também, inibição enzimática, peroxidação lipídica e oxidação de grupos tiólicos de proteínas (DOCAMPO et al., 1986).

O mecanismo de ação do benznidazol não é ainda completamente conhecido. Acredita-se que o mesmo iniba o crescimento do *T. cruzi* em concentrações que não estimulam a formação de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ , mostrando que sua ação tripanomicida não

depende dos efeitos dos radicais de oxigênio provocados pela nitroredução. Os metabólitos reativos do benznidazol interagem com o DNA do *T. cruzi*, com proteínas e lipídios. Estas observações podem estar relacionadas aos efeitos inibitórios do fármaco sobre o crescimento do parasito em culturas, à inibição da síntese de macromoléculas, ao aumento da degradação macromolecular e à morte celular. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de interações mais específicas do benznidazol com sistema enzimático do parasito (DOCAMPO et al, 1986).

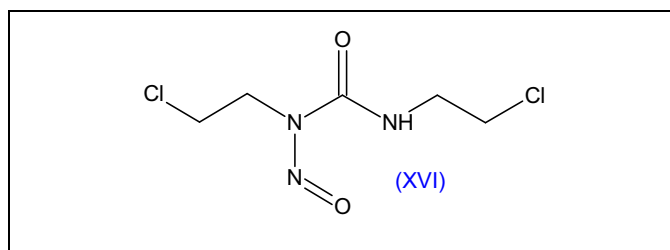
Em 1985, FAIRLAMB et al identificaram a tripanotiona redutase e, em 1989 JOCKERS-SHERÜBL et al, estudando sua propriedade catalítica, descobriram que esta é a enzima chave na ação antioxidante do parasito (BLUMENSTIEL, 1999). Observaram ainda, que a mesma era inibida por compostos nitrofurânicos. Sendo assim, além da formação de espécies radicalares, os nitrofuranos agiriam por inibição da enzima responsável pela ação antioxidante do parasito, favorecendo o aumento da concentração destas espécies no tripanossoma.

A Figura 16 mostra a estrutura cristalográfica das enzimas Tripanotiona Redutase e Glutationa Redutase Humana. .



**Figura 16.** Estrutura cristalográfica da Tripanotiona Redutase do *T. cruzi* (à esquerda) (ZHANG, 2006) e da Glutationa Redutase Humana (à direita); (BECKER, 1998).

Não há diferença significativa entre a tripanotiona redutase e a glutathione redutase no que diz respeito aos seus potenciais redox ( $-242\text{mV}$  e  $-230$  a  $-250\text{mV}$  respectivamente), contudo a tripanotiona redutase possui atividade ótima nas reações de troca dissulfito-tiol, devido ao valor do pKa do grupo tiol ser semelhante ao pH da solução do meio (citoplasma). A nitrosourea carmustina (XVI) (Figura 17) é um inibidor irreversível da tripanotiona redutase, contudo também inativa a glutathione redutase em humanos (KRAUTH-SIEGEL et al., 2005).



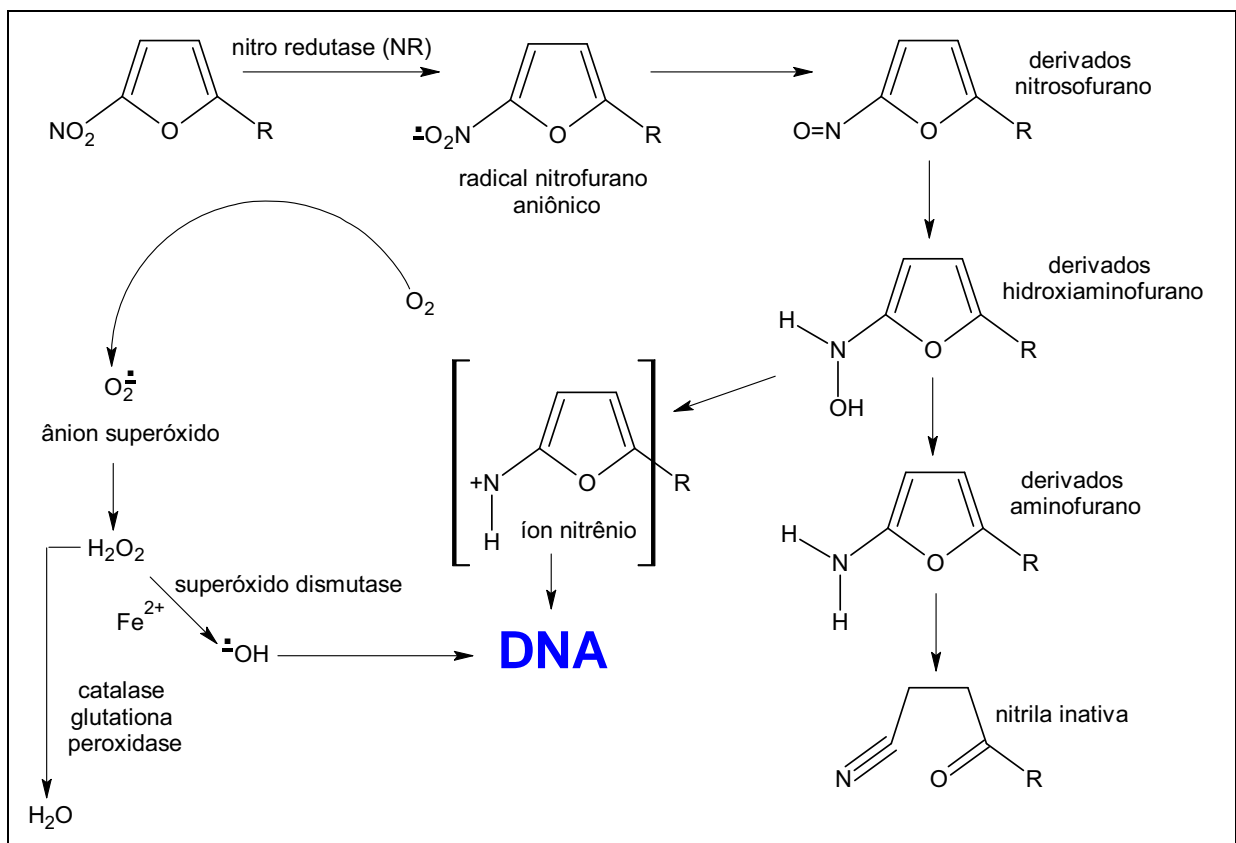
**Figura 17.** Estrutura química da carmustina (XVI).

O estudo de fármacos mais específicos, isto é, seletivos ao tripanossoma e, conseqüentemente, menos tóxicos ao homem, tem sido o objetivo principal do desenvolvimento de novos quimioterápicos (WOLFF, 1995). Neste sentido, enzimas específicas, presentes apenas nos tripanossomos estão sendo estudadas como alvos. Entre os alvos quimioterápicos potenciais em *T.cruzi* encontram-se a tripanotiona redutase (KRAUTH-SIEGEL et al., 2003; LOCKMAN, HAMILTON, 2005; OLIVEIRA et al., 2006; PRIETO et al., 2006; RAVASCHINO et al., 2006; IRIBARNE et al., 2007), a glutationa redutase (GR) (IRIBARNE et al., 2007), a cruzipaína ou GP 57/51 (CAZZULO, 2002; LOCKMAN, HAMILTON, 2005), serina, treonina e metalo-proteinases (CAZZULO, 2005), a GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (ZACKS, 2007) e outras enzimas glicolíticas (VERLINDE et al., 2001), a transialidase (AGUSTÍ et al., 2004; WORONOWICZ et al., 2004; DUTHIE et al., 2005), a biossíntese de purinas (FREYMANN et al., 2000), o metabolismo de folato e pteridina (LOCKMAN, HAMILTON, 2005), a biossíntese do RNAm (BARBOSA et al., 2007), a biossíntese do ergosterol (BUCKNER et al, 2003; URBINA et al., 2003) , dUTP nucleotídeo hidrolase (HARKIOLAKI et al, 2003), o cinetoplasto (SCHNARE et al., 1999), DNA topoisomerase de tripanosomatídeos (BALAÑA-FOUCE et al., 2006),  $\alpha$ -hidroxiácido desidrogenase isoenzima II (CHENA et al., 2004), oleato desaturase (MALDONADO et al., 2006) e DHOD (diidrooronoato desidrogenase) (NARA et al., 2005).

### 1.1.6 Toxicidade

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 18 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.

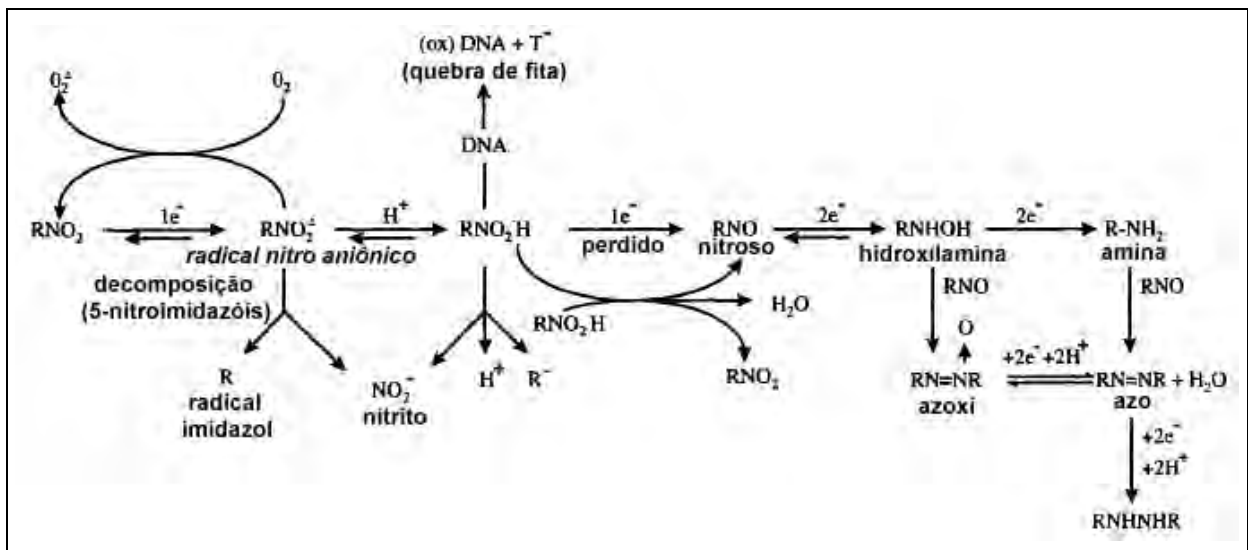


**Figura 18.** Possíveis mecanismos de mutagenicidade dos nitrofurânicos.  
Fonte: Adaptado de McCALLA, 1983; MECCA et al., 2002; HIRAKU, 2004.



A completa redução destes compostos envolve a adição de 6 elétrons para formar a amina via o intermediário nitroso ( $2e^-$ ) e hidroxilamínico ( $4e^-$ ); entretanto alguns fármacos não prosseguem, além da formação da hidroxilamina (TOCHER, 1997).

O alvo destes compostos é o DNA; a redução dos mesmos causa quebra e desestabilização da sua hélice (EDWARDS, 1993). O grau do dano está relacionado com a composição da fita e aumenta com a presença de adenina (A) e timina (T) no DNA. 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 no mínimo 4 elétrons. Paralelamente, ocorre a abertura do anel nitrofurânico, formando derivado nitrila inativo (McCALLA, 1983; KOBIERSKA-SZELIGA et al., 1994). A Figura 19 mostra a redução desses compostos (TOCHER, 1997).



**Figura 19.** Ativação por redução de compostos nitroaromáticos (TOCHER, 1997).

Estudo de relações quantitativas entre estrutura e atividade (QSAR) sobre 2-nitrocompostos aromáticos utilizados como agentes antibacterianos demonstraram que o aumento da densidade eletrônica no carbono da posição 2 do anel aromático, aumenta o efeito mutagênico. Possivelmente, a maior densidade eletrônica neste carbono deva estabilizar o anel furânico e aumentar a probabilidade para a reação com o DNA (DEBNATH et al., 1993).

O trabalho de revisão de STOPPANI et al.(1996), descreve o papel das espécies de oxigênio ativo na quimioterapia da doença de Chagas, incluindo as propriedades eletrônicas de novos compostos em relação à capacidade de produzir radicais nitro-aniônicos e a respectiva atividade tripanomicida.

## 1.2 Planejamento de Novos Fármacos

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).

Ainda hoje, existem diversos fármacos (alguns muito potentes), cujas características físico-químicas, organolépticas, farmacocinéticas, farmacológicas e toxicológicas são barreiras para sua aplicação clínica (ZHENG, 1999; HAN e AMIDON, 2000).

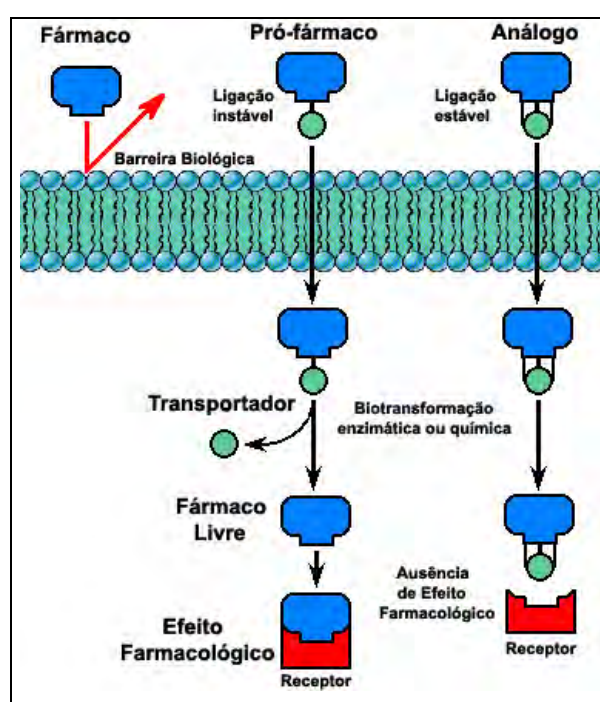
Para otimizar as características físico-químicas de um fármaco podem-se derivar certos grupos funcionais polares com pequenas moléculas orgânicas biorreversíveis, mascarando tais características sem alterar permanentemente as propriedades da molécula. Tal estratégia tem sido utilizada com sucesso e grupos funcionais tais como álcoois são convertidos em ésteres, os quais podem ser rapidamente convertidos *in vivo* por via química ou enzimaticamente (ZHENG, 1999).

Esta estratégia para a superação dos problemas anteriormente referidos e para a busca de novos compostos terapêuticos é a *latenciação de fármacos*, em que o termo *latente* significa: presente ou existente, mas não manifestada, exibida ou desenvolvida (CHUNG et al., 2005).

A latenciação de fármacos foi proposta, em 1959, por HARPER, a qual consiste 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 dele. Entretanto, somente em meados da década de 1970, quando pesquisadores começaram a localizar os alvos dos fármacos no organismo e compreender a farmacocinética dos mesmos é que o processo de latenciação tomou uma direção mais definida (HAN e AMIDON, 2000; CHUNG et al., 2005). Nos últimos anos, a latenciação tornou-se uma das principais ferramentas no desenvolvimento de novos quimioterápicos, para o combate de enfermidades como o câncer e a AIDS (CHUNG et al., 2005).

O *fármaco latente* é uma espécie de “Cavalo de Tróia”, uma vez que este engana o organismo, mas não para destruí-lo e sim para ajudá-lo. Tanto o *fármaco latente* quanto o *análogo*, possuem estruturas químicas similares, mas as

propriedades biológicas desses compostos diferem em relação à do *fármaco matriz* quanto a: atividade, potência, biodisponibilidade, síntese, espectro de ação, índice terapêutico, entre outros. Um análogo, muitas vezes, difere do *fármaco protótipo* em um só átomo ou em um grupo de átomos. Todavia, estruturalmente, o *fármaco protótipo* e o *análogo* possuem características próprias, oriundas de sua estrutura química (Figura 20). Nos últimos anos, a latenciação tornou-se uma das principais ferramentas no desenvolvimento de novos quimioterápicos, para o combate de enfermidades como o câncer e a AIDS (CHUNG et al., 2005).



**Figura 20.** Diferenças entre Fármaco, Pró-fármaco e Análogo (CHUNG et al., 2005).

Muitos problemas relacionados ao fármaco matriz justificam a busca por novos fármacos latentes, tais como: problemas farmacocinéticos, alta toxicidade, baixa estabilidade química, solubilidade inapropriada, odor e paladar indesejáveis, dor no local da administração e formulação farmacêutica de difícil preparo. Os principais problemas farmacocinéticos descritos por BUNDGAARD (1991) incluem: deficiência de biodisponibilidade oral (coeficiente de partição inadequado e/ou hidrossolubilidade); distribuição inespecífica e incapacidade de atravessar diversos tipos de barreiras biológicas (mucosa gástrica, pele, córnea e barreira hematoencefálica) que separam o fármaco de seu local de ação, entre outros.

As formas latentes de fármacos podem ser classificadas, de acordo com Wemuth(2004) em pró-fármacos clássicos, bioprecursores, fármacos dirigidos e pró-fármacos mistos. Albert (1958) definiu pró-fármaco como qualquer composto que sofre biotransformação antes de exibir seus efeitos farmacológicos. Uma definição mais abrangente, considera um pró-fármaco como um fármaco ativo, quimicamente transformado em um derivado inativo, o qual é convertido no fármaco matriz dentro do organismo antes ou após alcançar seu local de ação por um ataque químico ou enzimático ou de ambos (CHUNG et al., 2005).

O desenvolvimento de pró-fármacos tem como objetivo resolver diversos problemas relacionados aos fármacos atuais: alterar a farmacocinética do fármaco *in vivo*, para melhorar sua absorção, distribuição, biotransformação e excreção; diminuir sua toxicidade e os efeitos adversos; aumentar sua especificidade e tempo ação e sua solubilidade e estabilidade.

Os pró-fármacos possuem alguns fatores importantes em seu desenvolvimento, para permitir o aprimoramento das propriedades do fármaco matriz, tais como: ser inativo; sua síntese deve ser menos complexa que a do fármaco matriz; a ligação entre o fármaco matriz e o transportador deve ser cindida, *in vivo*, por via química ou enzimática; o transportador não deve ser tóxico; deve também possuir cinética adequada de biotransformação direta tanto quanto de inativação, assegurando níveis eficazes do fármaco no local de ação.

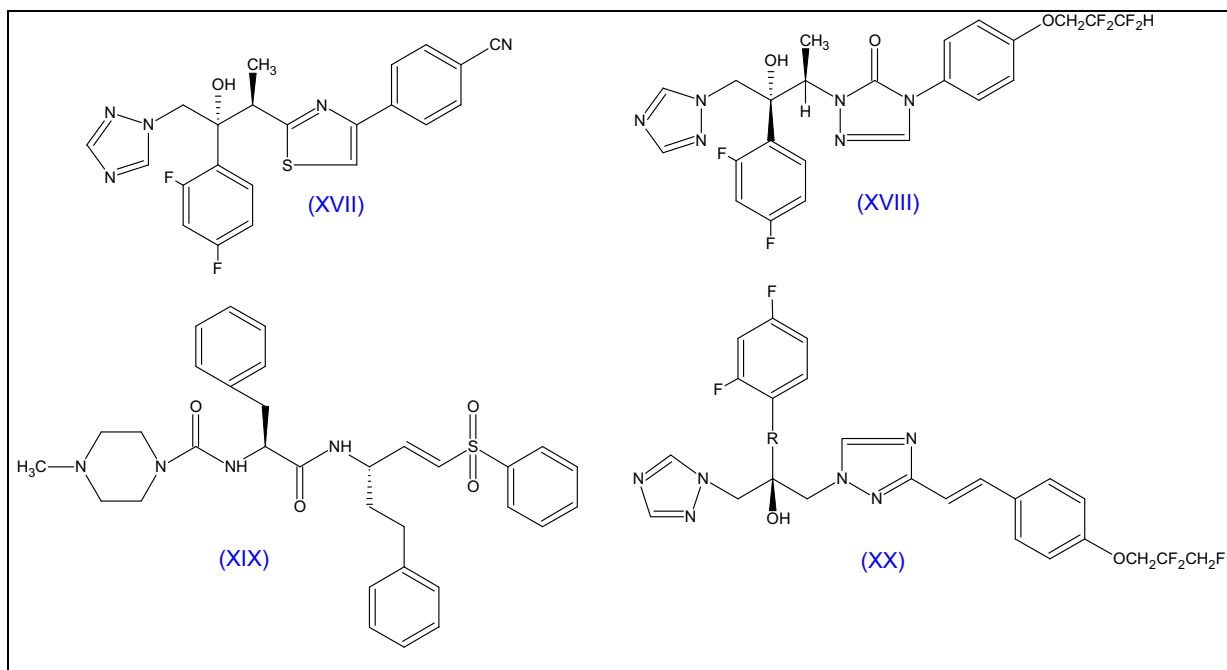
A vantagem do desenvolvimento de pró-fármacos é a facilidade de obtenção de novos compostos, não considerados “me too” e, portanto passível de patentes (CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005). Nesse contexto, diversos pró-fármacos foram inseridos na terapêutica. No mercado alemão, cerca de 6,9% dos fármacos comercializados são pró-fármacos. Entre eles destacam-se substâncias como: enalapril, omeprazol, sinvastatina e aciclovir, considerados *blockbusters* devido ao potencial mercadológico (ETTMAYER et al., 2004).

Diversas técnicas metodológicas foram descritas na literatura (KUBINYI, 1995; BÖHM, 2000), permitindo avanços significativos no planejamento e desenvolvimento de novos fármacos, tais como: química combinatória (GORDON, KERWIN, Jr, 1998), engenharia genética (MEYER, 1996), cristalografia de proteínas (RONDEAU e SCHREUDER, 1996), técnicas multidimensionais em RMN (SCHUKER et al., 1996) relações quantitativas entre estrutura química e atividade

biológica-QSAR (HANSCH e FUJITA, 1964; FUJITA, 1990; KUBINYI, 1993, 1995; SEYDEL, 1979) e a variante QSAR-3D, modelagem molecular, planejamento dirigido com base na estrutura e auxiliado por computador, CADD (KUBINYI, 1993,1998a,1998b; KLEBE, 1999; SCHUKER et al., 1996; BÖHM, 1993; BÖHM et al., 2000; AGUIRRE et al., 2006), e também planejamento de 4D-QSAR ( Liu et al., 2003; PITA et al., 2006), entre outras.

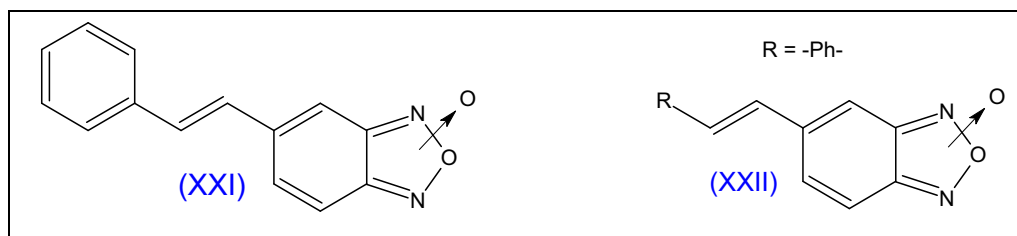
No caso de antichagásicos várias substâncias são projetadas somente contra a forma epimastigota, embora alguns autores já relatam sensibilidades diferentes a fármacos entre formas diferentes do parasito. Em relação aos testes *in vivo*, uma padronização de modelos biológicos em ambas as fases, aguda e crônica, e de parâmetros da cura é de suma importância (COURA e CASTRO, 2002).

Segundo CROFT e colaboradores (2005), novos compostos antichagásicos (Figura 21) estão em fase pré-clínica, como: triazóis (ravuconazol (XVII) e TAK-187 (XVIII); o inibidor irreversível (K-777) (XIX) da cruzipaina, uma enzima (protease) essencial presente em todos os estágios do *T. cruzi* e que possui atividade *in vitro* e *in vivo*; novos derivados triazóis, como o D-0870 (XX), que são inibidores da esterol C14 $\alpha$  desmetilase do *T. cruzi*, possuindo atividade potente e seletiva, erradicando o parasita em modelos animais em ambas as fases da doença de Chagas (aguda e crônica), estando atualmente em desenvolvimento como agentes antifúngicos sistêmicos.



**Figura 21.** Estrutura química de novos compostos antichagásicos: (XVII) ravuconazol, (XVIII) TAK-187, (XIX) K-777 e (XX) D-0870 (CROFT et al., 2005).

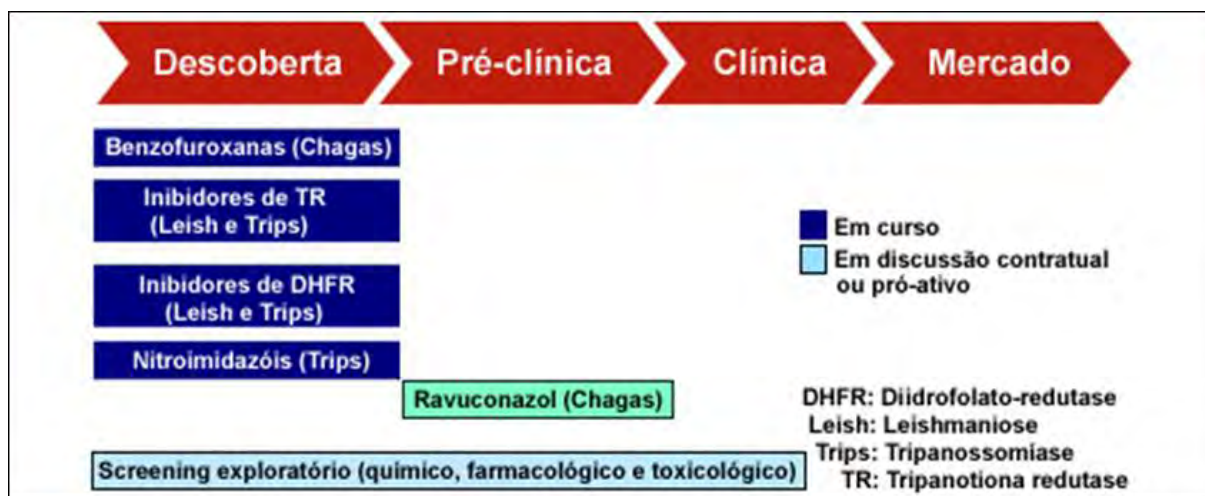
AGUIRRE e colaboradores (2005) desenvolveram 26 compostos derivados de benzofuroxanas, entre eles, o composto (I), que originou diversos análogos com excelente atividade *in vitro*, contra a forma epimastigota do *T.cruzi*, sendo o composto (II) o mais eficiente. Também foi verificado que quando se retira o grupo fenil destes análogos, ocorre a perda de atividade (Figura 22).



**Figura 22.** Estrutura química dos compostos antichagásicos (XXI) e (XXII) (AGUIRRE et al., 2005).

Ainda, outros compostos, descritos por SOUZA e colaboradores (2005), demonstraram atividade antichagásica em testes *in vitro* contra as formas tripomastigota e amastigota, entre os quais, (-) metilpluviatolida e (-) cubebina, mas não *in vivo*.

Embora haja um empenho pela busca por medicamentos para a doença de Chagas, a Figura 23 mostra os cinco projetos em desenvolvimento, que fazem parte do portfólio da Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi), de novos agentes antichagásicos, tais como: benzofuroxanas, inibidores de tripanotona redutase (TR), inibidores de diidrofolato redutase (DHFR), nitroimidazóis e o ravuconazol; sendo este último já em fase pré-clínica (DNDi, 2006).

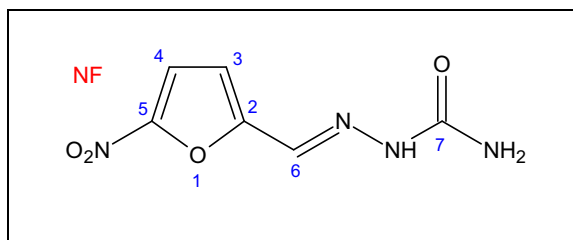


**Figura 23.** Projetos em desenvolvimento de novos compostos antichagásicos (DNDI, 2006).



### 1.2.1 Nitrofurais

O nitrofurais [5-nitro-2-furfurilidenossemicarbazona], (Figura 24), foi sintetizado com base no conhecimento de que o ácido furóico, bem como seus derivados alquilados e mercuriais, apresentavam atividade bacteriostática (DODD e STILLMAN, 1944) contra bactérias Gram-positivas e negativas.



**Figura 24.** Estrutura química do nitrofurais.

Este fármaco foi empregado, inicialmente, durante a II Guerra Mundial, para o tratamento de queimaduras, apresentando amplo espectro de atividade antibacteriana (CRENSHAW et al., 1976).

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

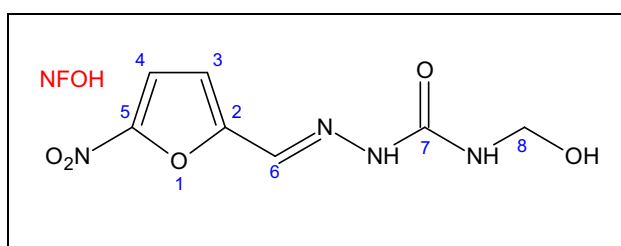
GONÇALVES e colaboradores, em 1994, identificaram potenciação da atividade do nitrofurais em associação com primaquina, quando ensaiado em cultura de células LLC-MK<sub>2</sub>, infectadas com formas tripomastigotas de *T.cruzi*.

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

A toxicidade desse nitrofurais é alta por via oral, em razão da hemólise e neuropatia graves que provoca. Em alguns países foi retirado do mercado e em outros continua a ser empregado apenas por via tópica, no tratamento de infecções estafilocócicas da pele, queimaduras e úlceras, especialmente aquelas resistentes a outros fármacos (KOROKOLVAS, 2003).

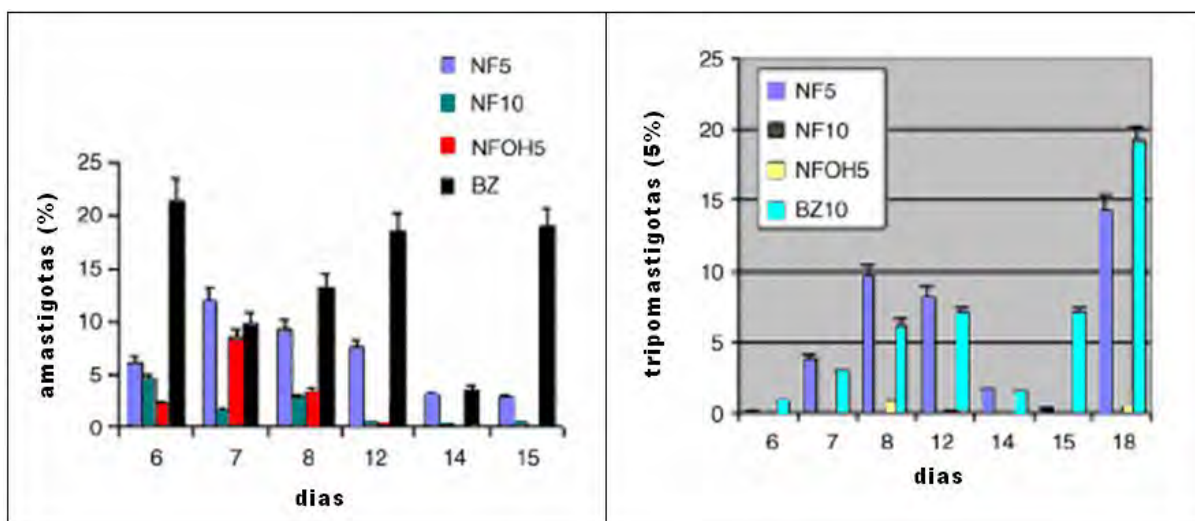
### 1.2.2 Hidroximetilnitrofural

Em 1996, CHUNG sintetizou pró-fármacos recíprocos derivados de primaquina e nitrofural. O intermediário de síntese destas bases de Mannich, o hidroximetilnitrofural (Figura 25), mostrou-se mais ativo que o fármaco utilizado na terapêutica (benznidazol) e também que o nitrofural, ressaltando o papel da modificação molecular, mais especificamente da latenciação, no aprimoramento da ação de fármacos.



**Figura 25.** Estrutura química do hidroximetilnitrofural.

A Figura 26 mostra que a atividade do NFOH é maior tanto nas formas *tripomastigota* quanto na *amastigota*, comparativamente ao benznidazol.

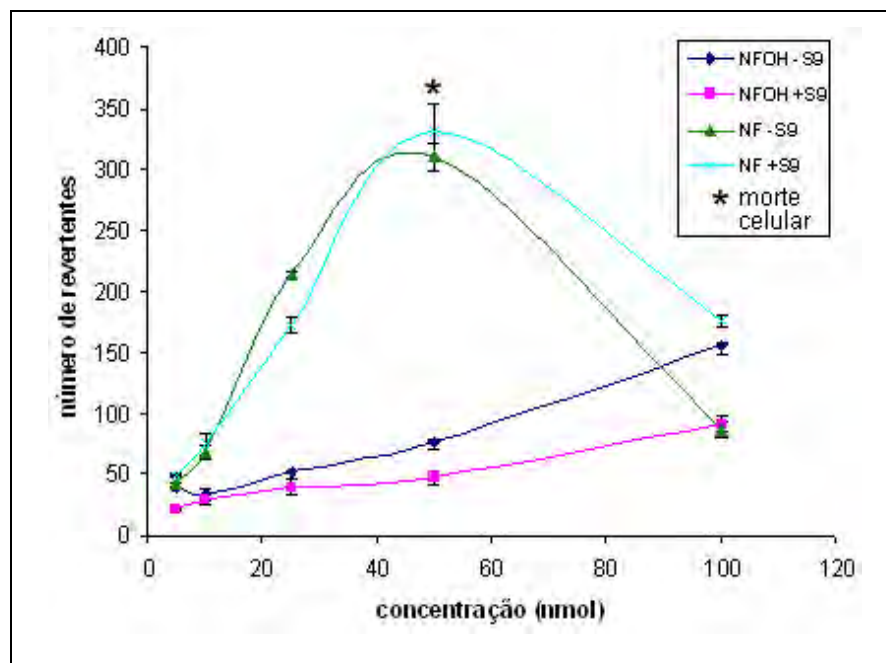


**Figura 26.** Efeito de 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M de NF e NFOH; 10 $\mu$ M benznidazol (Bz) em porcentagem de *amastigotas* e *tripomastigotas* em 6, 7, 8, 12, 14, e 15 dias após a infecção das células com formas *amastigotas* e *tripomastigotas* de *T. cruzi*. Controle: 100% *amastigotas* e *tripomastigotas* (CHUNG *et al.*, 2003).

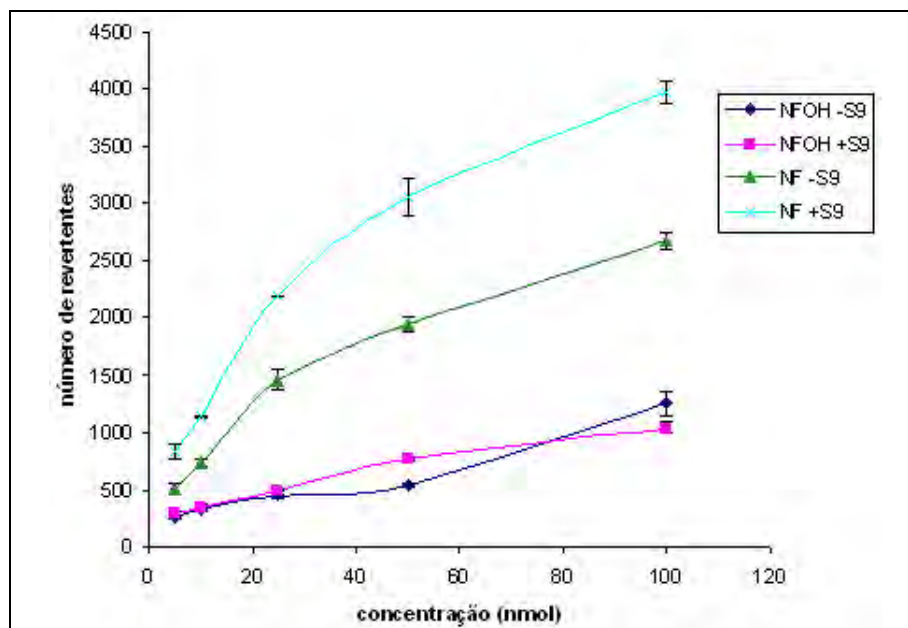
O aspecto altamente promissor desse composto é a diminuição da toxicidade em quatro vezes, comparativamente ao nitrofural, segundo observado no teste de

mutagenicidade em duas linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA102) (GUIDO et al., 2001).

As Figuras 27 e 28 apresentam os resultados do estudo de GUIDO et al., 2000, o qual relata 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 as linhagens testadas.



**Figura 27.** 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 28.** Atividade mutagênica (*S. Typhimurium* cepa TA102) dos compostos NFOH e NF em ensaios com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica (GUIDO et al., 2001).

Testes de toxicidade aguda (14, 28 e 60 dias), realizados com camundongos por vias oral e intraperitoneal, indicaram baixa toxicidade do derivado hidroximetilnitrofurais ( $DL_{50} > 2000$  mg/kg) e ainda permitiram demonstrar menor toxicidade do derivado em relação ao fármaco matriz (NF,  $DL_{50}$  197,2 mg/kg por esta via). Estes resultados justificam a continuidade dos testes pré-clínicos em outras espécies animais, como ratos e cães (MELO et al., 2006).

Em 2005, LA-SCALEA e colaboradores estudaram o comportamento voltamétrico do nitrofurais e do derivado hidroximetilnitrofurais por voltametria cíclica, varredura linear e pulso diferencial, comparando-o ao do metronidazol e do cloranfenicol. A redução do nitrofurais 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 nitrofurais 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 hidroximetilnitrofurais 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 nitrofurais 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).

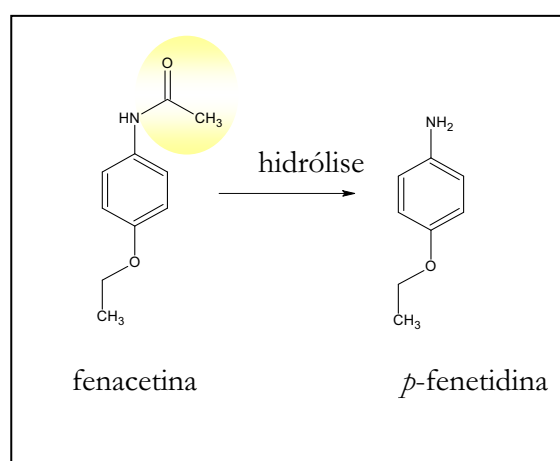
BARBOSA e colaboradores (2007), utilizando reação de *trans-splicing* observaram que o NFOH interfere no processo de pré-maturação do RNA mensageiro, afetando o processamento de RNA nestes parasitas.

### 1.2.3 A importância da hidrólise no planejamento de pró-fármacos

Uma vez que o pró-fármaco necessariamente deve sofrer metabolismo enzimático ou químico, *in vivo*, para liberar o princípio ativo, o estudo farmacocinético torna-se essencial para definição farmacológica.

Dessa forma, o conhecimento do tempo de conversão do pró-fármaco para sua forma ativa torna-se imprescindível, pois se houver hidrólise muito rápida, o pró-fármaco não terá vantagens em relação ao fármaco matriz e se o tempo para a conversão for muito longo, inviabiliza sua utilização na terapêutica, uma vez que o fármaco matriz poderá não atingir a concentração plasmática desejada (CHUNG et al., 2005).

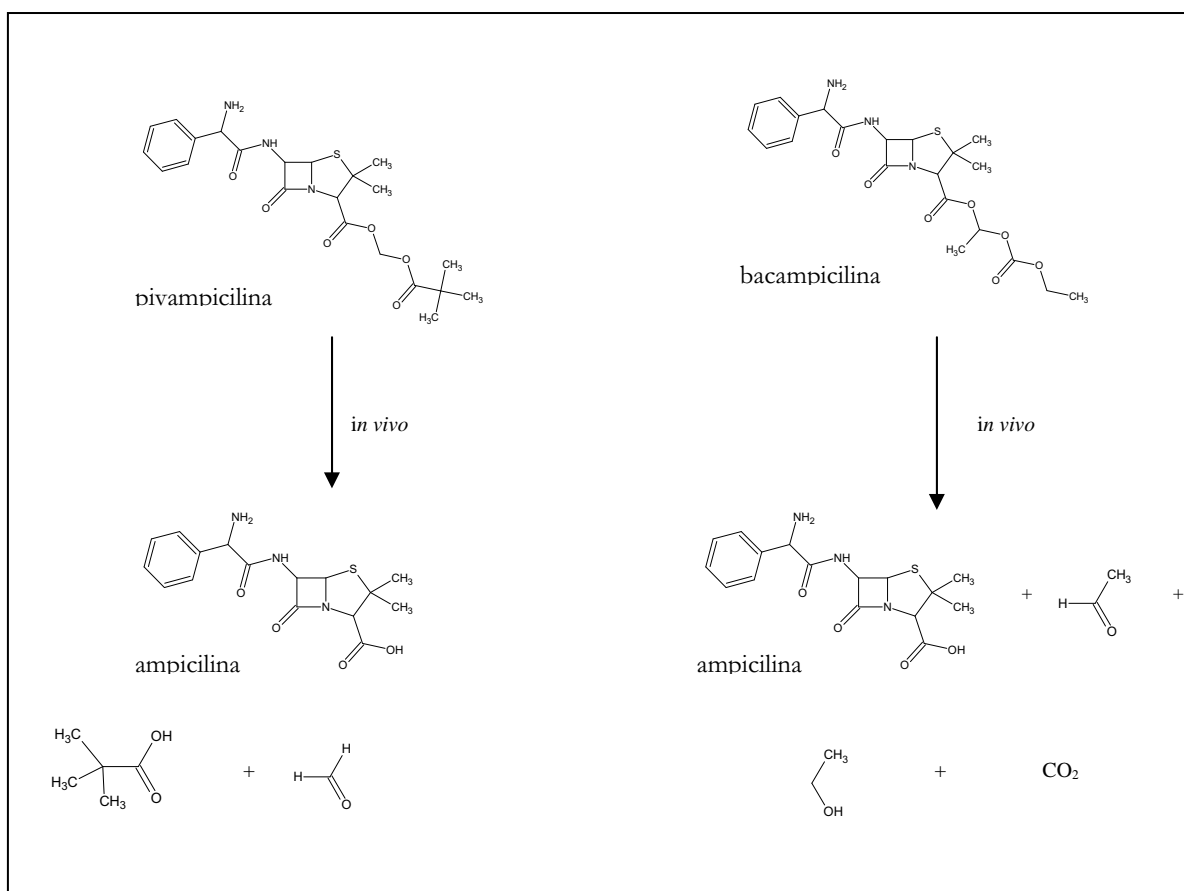
A fenacetina, é um derivado do paracetamol com importante atividade analgésica. Durante seu metabolismo ocorre reação hidrolítica que leva à formação do derivado *p*-fenetidina (Figura 29), que não possui atividade analgésica. Ademais, esse composto inativo, pode sofrer reações de O-desalquilação catalisadas pelo citocromo P450, levando a formação de derivados tipo iminoquinonas, com potencial efeito hepatotóxico (BARREIRO e FRAGA, 2001).



**Figura 29.** Hidrólise da fenacetina levando ao metabólito *p*-fenetidina inativo.

A hidrólise é uma importante reação metabólica para fármacos cujas estruturas contêm grupamentos éster e amida. Todos os tipos de ésteres e amidas podem ser metabolizados por esta via. A hidrólise de ésteres freqüentemente é catalisada por esterases não-específicas do fígado, rins e outros tecidos, assim como pelas pseudocolinesterases do plasma. A conversão de amidas em aminas também é catalisada por esterases não-específicas, assim como por amidases não-específicas, carboxipeptidases, aminopeptidases e deciclases. Essas enzimas são encontradas em vários tecidos do organismo (THOMAS, 2003; FLORENCE e ATTWOOD, 2003; BARREIRO e FRAGA, 2002).

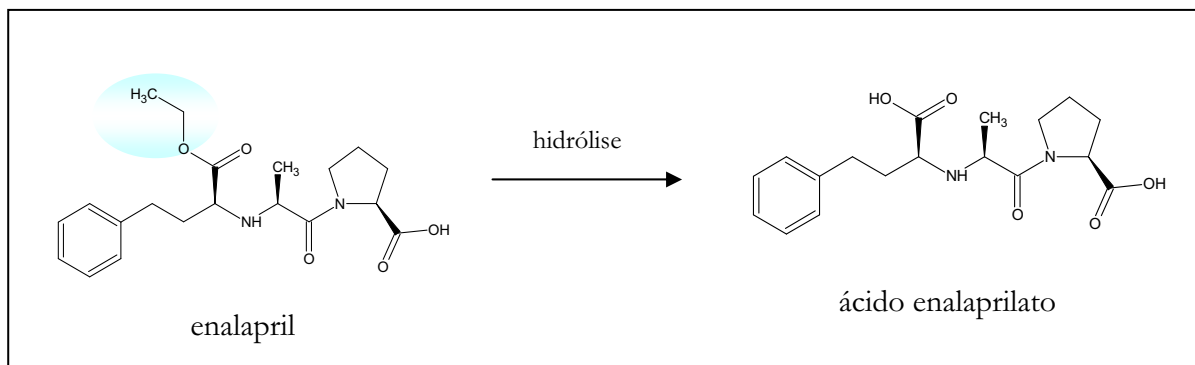
A ampicilina é um dos mais representativos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e, apesar de ser largamente utilizado como antibiótico de largo espectro, sofre baixa absorção quando administrada por via oral: apenas 40% do fármaco é absorvido depois da administração. Através do processo de latenciação, ésteres lipofílicos aciloxialquil foram desenvolvidos, aumentando a absorção para cerca de 90% (Figura 30). Uma vez absorvido, o pró-fármaco sofre reações de hidrólise liberando o fármaco ativo (ampicilina) em aproximadamente 15 minutos (SILVA et al., 2005).



**Figura 30.** Hidrólise de pró-farmacos derivados da ampicilina.

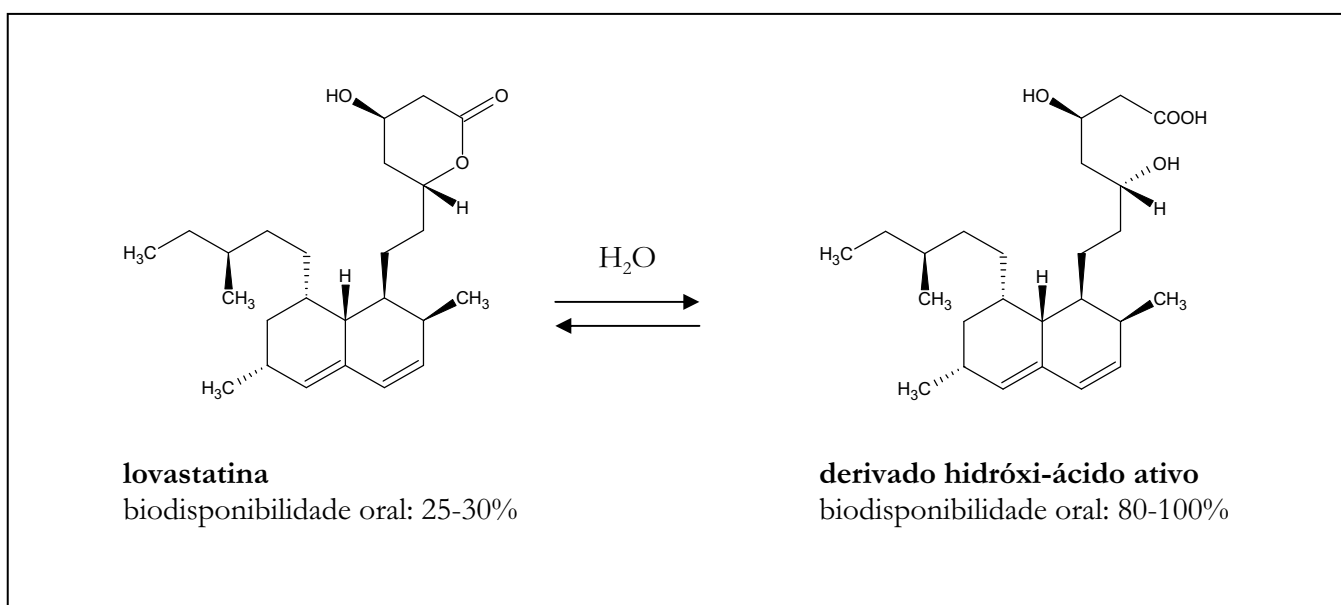
O enalapril é um fármaco anti-hipertensivo, inibidor da enzima conversora de angiotensina, que possui absorção entre 60 e 70%. Uma vez absorvido, o enalapril é convertido ao seu ácido de origem, através da hidrólise da ligação éster, condição essencial para a produção do efeito farmacológico (PEREIRA, 2007).





**Figura 31.** Hidrólise do enalapril levando à formação do ácido enalaprilato (ativo).

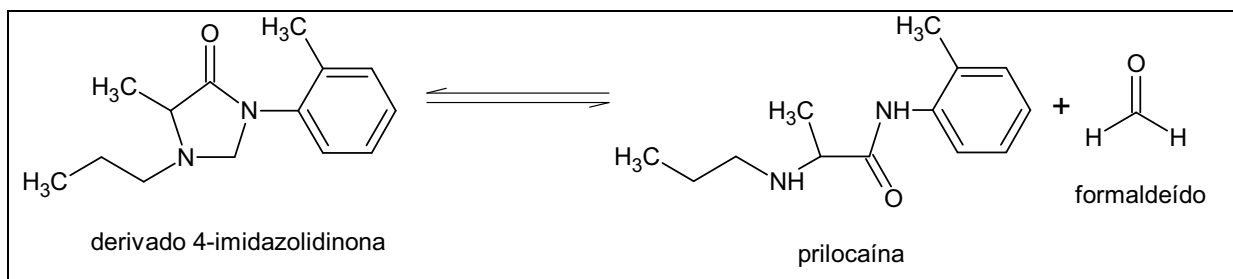
A lovastatina é uma lactona inibidora da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coa (HMG-CoA) redutase, enzima envolvida na biossíntese do colesterol. A reversibilidade da hidrólise de lactonas inibidores de HMG-CoA redutase tem sido demonstrado em pH gástrico (pH=2) a 37°C. Para o pró-fármaco lovastatina, a hidrólise reversível da lactona no seu derivado ativo hidroxi-ácido ocorre com valor de meia-vida, de cerca de 1 hora (Figura 32). Em contraste, esta hidrólise reversível ocorre muito mais lentamente em pH próximos à neutralidade como por exemplo no intestino (TESTA e MAYER, 2003).



**Figura 32.** Hidrólise da lovastatina em seu metabólito ativo derivado hidroxi-ácido.

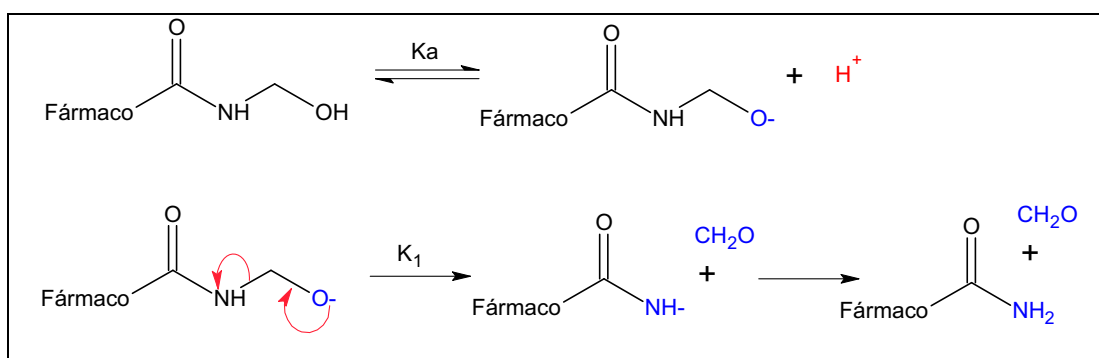
LARSEN e colaboradores (2003), relataram a obtenção de bases de Mannich *N*-cíclicas derivadas de prilocaína, com potencial atividade anestésica, e melhor

perfil terapêutico, por conta da liberação prolongada da prilocaína. Para essa liberação, é necessária reação hidrolítica da 4-imidazolidinona, conforme podemos evidenciar na Figura 33.



**Figura 33.** Reação hidrolítica do derivado 4-imidazolidinona no composto ativo prilocaína.

Os derivados *N*-(hidroximetilados) de nitrofurantoína, antibacterianos utilizados no tratamento de infecções do trato urinário, são pro-fármacos de elevada biodisponibilidade. Sua maior atividade antibacteriana pode ser devido a liberação de formaldeído (CH<sub>2</sub>O) próximo ao local de ação, neste caso o trato urinário, durante o processo de biotransformação (Figura 34) (TESTA e MAYER, 2003).



**Figura 34.** Mecanismo de conversão alcalina para compostos derivados de *N*-(hidroximetil) (LARSEN e BUNDGARD, 1994; TESTA e MAYER, 2003).

### 1.3 Noções gerais sobre parâmetros farmacocinéticos

A ação de um fármaco, quando administrado a humanos ou animais, pode ser dividida em três fases: farmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica.

Na **fase farmacêutica** ocorre a desintegração da forma farmacêutica administrada, seguida da dissolução da substância ativa.

A **fase farmacodinâmica** está relacionada com a interação do fármaco com seu alvo (receptor: enzimas, ribossomos, DNA, RNA, etc.) e a conseqüente produção do efeito terapêutico e pode ser entendida como “o que o fármaco faz no organismo”.

A **fase farmacocinética** abrange os processos de absorção, distribuição, metabolismo (biotransformação) e excreção (ADME), ou seja, “o que o organismo faz com o fármaco”. (HARDMAN e LIMBIRD, 2004; PEREIRA, 2006).

Tradicionalmente, a pesquisa de fármacos concentra seus esforços iniciais na fase farmacodinâmica. Triagens preliminares usam modelos *in vitro*, tais como enzimas ou tecidos para obter a relação entre os novos compostos e sua potência agonista ou antagonista. Caso o resultado seja promissor, testes *in vivo* em modelos animais são a seguir realizados.

No processo de descoberta de novos fármacos, a previsão dos processos de ADME, logo nos estágios iniciais da pesquisa é de extrema importância. A otimização dessas propriedades, através de modificações moleculares de compostos promissores é essencial na seleção de compostos candidatos, com maiores probabilidades de não serem abandonados, mais adiante, na fase clínica. O fracasso na fase clínica representa grandes perdas de tempo e dinheiro (PEREIRA, 2006).

A primeira fase farmacocinética, a absorção, pode ser definida como a passagem do fármaco de um meio externo ao organismo para o sangue, que o conduzirá aos diferentes tecidos e órgãos. Para que este processo ocorra é necessário que o fármaco atravesse as membranas biológicas sob influência das características físico-químicas de ambos (WINTER, 1988; HARDMAN e LIMBIRD, 2004).

Segundo BOROUJERDI (2002), o processo de absorção pode ser avaliado por quatro parâmetros farmacocinéticos obtidos através da construção de uma curva de sua concentração plasmática *versus* tempo:  $k_a$  (constante de absorção),  $C_{max}$  (concentração plasmática máxima),  $t_{max}$  (tempo de ocorrência da concentração plasmática máxima) e AUC (área sob a curva).

Uma vez ocorrida a absorção ou administração endovenosa, o fármaco distribui-se para outros compartimentos (WINTER, 1988; HARDMAN e LIMBIRD, 2004).

A velocidade de distribuição sofre interferência de alguns fatores fisiológicos como fluxo sanguíneo e características da membrana, assim como das propriedades físico-químicas do fármaco que determinam a sua capacidade para atravessar as membranas e sua afinidade para ligar-se com proteínas plasmáticas. Quanto maior a afinidade e extensão de ligação com essas proteínas, menor o acesso desse fármaco a outros compartimentos do organismo.

O processo de distribuição de um fármaco pode ser quantificado, através do parâmetro volume de distribuição ( $V_d$ ), que descreve a relação entre a quantidade do fármaco existente em todo o organismo e a quantidade existente no plasma, e conceitualmente se define como o volume no qual o fármaco deve estar contido para que a sua concentração se iguale à do plasma (WINTER, 1988; HARDMAN e LIMBIRD, 2004).

Em farmacocinética clínica, o  $V_d$  é um importante parâmetro empregado para a construção do regime de dose que será utilizado no paciente. Em conjunto com a concentração alvo no estado de equilíbrio, o  $V_d$  pode ser utilizado para calcular a dose de ataque e a quantidade do fármaco no organismo em qualquer momento desde que se obtenha uma concentração plasmática para estimar a viabilidade de utilizar-se a hemoperfusão ou hemodiálise para a remoção do fármaco do organismo (BJORNSSON, 1997).

Na biotransformação (metabolismo), o fármaco é submetido a reações químicas, geralmente mediadas por enzimas, que o convertem em um ou mais compostos diferentes do originalmente administrado (metabólitos), os quais sempre com polaridade crescente, para que sejam excretados em meios aquosos, especialmente pela urina.

As reações mais comuns da biotransformação de fármacos são classificadas como de fase 1 (oxidação, redução e hidrólise) e fase 2 (conjugação). Os produtos de degradação (metabólitos), por sua vez podem ser inativos ou ativos (WINTER, 1988; HARDMAN e LIMBIRD, 2004; PEREIRA, 2006).

Em geral, o fígado é o mais importante e algumas vezes o único sítio de biotransformação de fármacos; ocasionalmente o fármaco é biotransformado em outros tecidos como os rins, pele, pulmões, sangue e trato gastrointestinal.

Participam dessas reações série de enzimas não-microsômicas, como a monoaminoxidase (MAO) de origem mitocondrial e esterases solúveis presentes no plasma, e enzimas microsomais que pertencem à superfamília de enzimas do CYP450 (WINTER, 1988; HARDMAN e LIMBIRD, 2004).

O complexo enzimático citocromo P450 (CYP450) é o principal responsável pela biotransformação de fármacos no organismo humano, mais propriamente pelas reações de oxidação da fase farmacêutica. Esse sistema, presente em maior quantidade e variabilidade no tecido hepático, pode também ser encontrado em menor quantidade nos pulmões, rins, bexiga, e outros órgãos.

O CYP450 apresenta várias isoformas, que são formas múltiplas da mesma enzima, que catalisam o mesmo tipo de reação com afinidades diferentes frente aos substratos, biotransformando, portanto, fármacos distintos. Além disso, as isoformas diferem na sua distribuição pelo organismo e na modulação de sua atividade, apresentando diferentes inibidores, indutores e fármacos marcadores (WINTER, 1988; HARDMAN e LIMBIRD, 2004).

No processo de biotransformação podem ser originados produtos farmacologicamente ativos, produtos inativos ou produtos dotados de significativa toxicidade. De maneira geral, esses produtos possuem maior hidrossolubilidade e, portanto, são mais facilmente eliminados pelo organismo. (WINTER, 1988; HARDMAN e LIMBIRD, 2004).

Quando administrados pela via oral, os fármacos atingem o sistema porta hepático para chegar à circulação sistêmica, expondo a dose administrada aos sistemas enzimáticos. Se o fármaco sofre rápida e considerável biotransformação nessa primeira passagem pelo tecido hepático, somente pequena fração da dose administrada alcançará a circulação sistêmica (efeito de primeira passagem), levando à baixa biodisponibilidade (WINTER, 1988; HARDMAN e LIMBIRD, 2004).

Os parâmetros farmacocinéticos relacionados ao processo de biotransformação são: a constante de eliminação ( $K_{el}$ ) e o "clearance" (Cl) (WINTER, 1988; HARDMAN, 2004).

A meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de eliminação é um parâmetro híbrido do “clearance” e do volume de distribuição e representa o tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco decline para a metade (ATHANI et al., 1990).

O parâmetro meia vida ( $t_{1/2}$ ) é útil para selecionar o intervalo de dose de um regime posológico, para prever o grau de flutuação da concentração plasmática durante o intervalo de dose, prever quanto tempo será necessário para atingir-se o estado de equilíbrio e para prever quanto tempo será necessário para que uma dada concentração decline à outra concentração específica, se não for administrada nova dose (WINTER, 1988; HARDMAN e LIMBIRD, 2004).

Para a maioria dos fármacos utilizados na terapêutica, a biotransformação é um processo essencial para a sua inativação e excreção renal. Apenas uma pequena parte das substâncias é eliminada do organismo de forma inalterada. Alguns fármacos são excretados via bile e substâncias voláteis são excretadas pelos pulmões.

A excreção é a passagem do fármaco da circulação sangüínea para o meio externo, sendo os rins as principais vias de excreção dessas substâncias. Os mecanismos envolvidos na excreção renal são filtração glomerular, secreção tubular ativa e difusão passiva, sendo os dois primeiros os mais efetivos (WINTER, 1988; HARDMAN e LIMBIRD, 2004).

Na presença de insuficiência renal, fármacos e metabólitos ativos excretados fundamentalmente pelos rins podem-se acumular, alterando os parâmetros farmacocinéticos relacionados ao processo de eliminação: constante de eliminação ( $K_{el}$ ) e “clearance” (Cl), com conseqüências sobre a meia vida do fármaco.

“Clearance” é um termo usado para indicar a remoção completa de determinada substância de um volume específico de sangue na unidade de tempo. O “clearance” é expresso em volume por unidade de tempo (mL/min ou L/h), e compreende todos os processos que resultem na eliminação do fármaco do organismo. Assim, a biotransformação hepática somada à excreção renal de um determinado fármaco levam ao que chamamos de depuração sistêmica total, ou “clearance” total.

$$CI_{\text{Total}} = CI_{\text{renal}} + CI_{\text{hepático}} + CI_{\text{outros}^*}$$

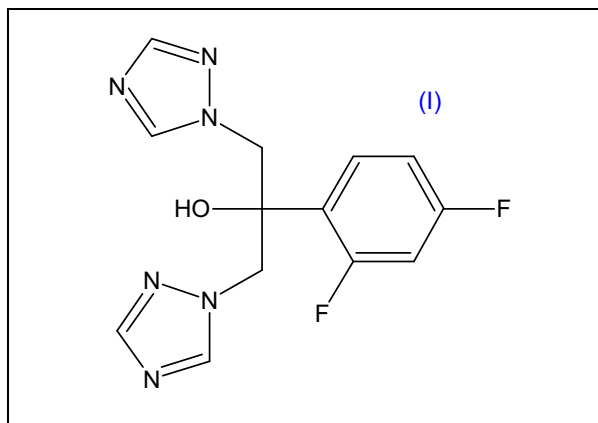
(\* refere-se a outras vias de excreção)

Quando o fármaco é parcial ou totalmente excretado pelos rins de forma inalterada, o “clearance” renal pode ser calculado dividindo-se a velocidade de excreção urinária (mg/min) pela sua concentração sangüínea (mg/mL).

Utilizando o parâmetro “clearance” podemos determinar a concentração plasmática média no estado de equilíbrio da administração de doses múltiplas, calcular a dose/tempo necessária para atingir determinada concentração plasmática média e fazer ajustes de dose para pacientes com hepatopatias ou nefropatias (WINTER, 1988).

Muitas vantagens estão associadas com o aumento da estabilidade metabólica: aumento da biodisponibilidade e maior  $t_{1/2}$ , que por sua vez, pode permitir doses menores e menos freqüentes, proporcionando melhor adesão do paciente; melhor congruência entre dose e concentração plasmática, conseqüentemente reduzindo o mesmo e eliminando a necessidade de monitoramentos terapêuticos; menores diferenças no metabolismo entre espécies, o que pode permitir a melhor extrapolação dos dados de animais para humanos; menor variabilidade inter- e intra-paciente nos níveis plasmáticos; redução do número e significância de metabólitos ativos e conseqüente redução da necessidade de estudos adicionais de metabólitos em animais e humanos. (PEREIRA, 2006).

Um exemplo da ótima combinação de eficácia, características farmacocinéticas, solubilidade em água e perfil de segurança, é relatada na literatura para o fluconazol (I) (Figura 35), como um promissor antifúngico. Embora o fluconazol possua lipofilicidade suficiente para ser consideravelmente reabsorvido (80%) no túbulo renal, sua depuração é predominantemente renal, devido à sua alta estabilidade metabólica. A sua baixa taxa de depuração renal proporciona um  $t_{1/2}$  de 30 horas, adequado para a administração, uma vez ao dia (SMITH, 2000). A estabilidade metabólica do fluconazol foi conseguida pela combinação de três elementos estruturais: a resistência dos anéis triazólicos ao ataque oxidativo; o bloqueio da hidroxilação aromática pela presença dos dois átomos de flúor e o impedimento estérico de hidroxila, após anos de modificações moleculares sistematicamente planejadas.



**Figura 35.** Estrutura química do antifúngico fluconazol (I).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo o estudo da hidrólise *in vitro* e *in vivo* do pró-fármaco hidroximetilnitrofural.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Preparação e identificação do pró-fármaco hidroximetilnitrofural.
- Desenvolvimento e validação de método de análise de hidroximetilnitrofural e nitrofural, por CLAE em pH 1,2 e 7,4 e em plasma.
- Ensaio de hidrólise *in vitro* do hidroximetilnitrofural e nitrofural em plasma humano e de rato.
- Ensaio de hidrólise *in vivo* do hidroximetilnitrofural e nitrofural em plasma de ratos Wistar.
- Determinação de parâmetros farmacocinéticos do hidroximetilnitrofural.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Equipamentos

- Destilador de água desionizada (Marconi) acoplado a um sistema de membrana de osmose-reversa, modelo Q-342, Quimis.
- Filtro LCR em PTFE modificado 0,45 mm para filtração de solventes orgânicos e aquosos.
- Ultra-som *Ultrasonic Cleaner-UNIQUE*
- Incubadoras *shaker* modelo TE-420, Tecnal e modelo MA-420, Marconi
- Centrífuga *Excelsa II-Mod.206 BL*
- Sistema de purificação de água Purelab ultra-ELGA
- Pipetadores *Boeco* (Germany)
- Agitador *Vortex-QI-901*

##### 3.1.2. Reagentes e Solventes

- Acetato de etila (grau HPLC, *Merck* e *Mallinckrodt* )
- Acetato de sódio tri-hidratado (grau HPLC , *Tedia* )
- Acetonitrila (grau HPLC , *J.T.Baker* )
- Ácido acético (pa, *J.T.Baker*)
- Ácido acético glacial ( grau HPLC, *Tedia* )
- Ácido sulfúrico (pa, *Merck*)
- Água Milli-Q
- Carbonato de sódio(pa, *Mallinckrodt* )
- Cloreto de potássio ( pa, *Mallinckrodt* )
- Detergente Extran MA-01 (neutro, *Merck*)
- Dimetilsulfóxido (pa, *Synth*)
- Éter etílico (pa, *Synth*)
- Formaldeído (pa, *Synth*)
- Hidróxido de sódio (pa, *Synth*)
- Metanol (grau HPLC, *J.T.Baker* e *Tedia*)
- Nitrofural, 2-[(5-nitro-2-furanil)metilenohidrazina (pureza:99,4%), (*Sigma-Aldrich Chemie*, Alemanha).

- Papel indicador de pH (*Merck*)
- Sulfato de sódio anidro (pa, *Synth*)

### 3.1.3. Material Biológico

O plasma humano utilizado neste estudo consiste de um “pool” de plasma, cedido pelo Hemocentro, Núcleo de Atendimento ao Consumidor (NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara e mantido congelado até o início das análises.

Para os ensaios *in vivo* foram utilizados ratos machos Wistar albinos, provenientes do biotério central do *Campus* de Botucatu, UNESP-SP.

## 3.2. Métodos

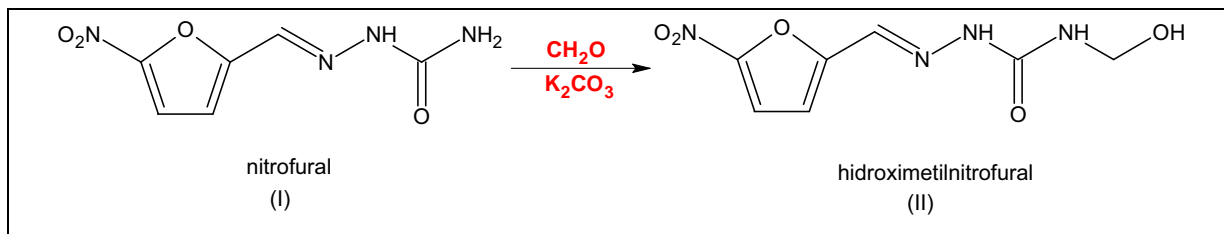
### 3.2.1. Limpeza da vidraria

Os materiais de vidro e plástico utilizados para coleta de plasma humano e de animais, foram lavados obedecendo ao seguinte procedimento: mantidos em solução aquosa de hipoclorito de sódio de 2 a 3 horas, lavados com detergente neutro, enxaguados abundantemente com água corrente, imersos em solução de Extran<sup>®</sup> 20% (MA 02-neutro, Merck) durante aproximadamente 24 horas e, enxaguados sucessivamente em água corrente, água deionizada e água “Milli-Q<sup>®</sup>”. Os materiais de vidro e plástico utilizados para análise em CLAE foram lavados seguindo o mesmo procedimento, com exceção da etapa de uso do hipoclorito de sódio. A secagem dos materiais foi realizada em estufa a temperatura de aproximadamente 40°C, sendo o material volumétrico seco à temperatura ambiente.

### 3.2.2. Preparação do pró-fármaco hidroximetilnitrofural (II)

O pró-fármaco NFOH foi preparado à temperatura ambiente, sob agitação durante 48 horas, pela reação de 1,08 g de nitrofural (NF) (I) com 18 ml de formaldeído em presença de 0,7g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 10 ml de H<sub>2</sub>O. Após completar a

reação, a suspensão foi filtrada e o precipitado foi purificado, conforme procedimento descrito por CHUNG (1996). A Figura 36 mostra o esquema da reação.



**Figura 36.** Esquema da reação de preparação de NFOH.

### 3.3. Técnicas Analíticas de Identificação do NFOH

#### 3.3.1. Determinação da Faixa de Fusão

A faixa de fusão experimental do produto obtido (NFOH) foi determinada utilizando aparelho para determinação de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific.

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

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

#### 3.3.3. Determinação da solubilidade de NF e NFOH

A determinação da solubilidade foi realizada de acordo com critérios estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (1988). Foram testados os seguintes solventes: água, metanol, etanol, acetona, dimetilsufóxido, dimetilformamida, acetonitrila, propilenoglicol, tetrahidrofurano, ácido acético, butanol, álcool isopropílico e hidróxido de amônio. As solubilidades foram designadas por termos descritivos, apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores de referência para determinação de solubilidade.

<b>Termo Descritivo</b>	<b>Solvente</b>
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10.000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10.000 partes

**Fonte:** Farmacopéia Brasileira 4ed. (1988)

### 3.3.4 Espectrometria no Ultravioleta (UV)

Os espectros no ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro ultravioleta da marca HITACHI, modelo U-2001.

### 3.3.5. Espectrometria no Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro infravermelho FTIR-8300 da SHIMADZU Corporation, o qual utiliza o método de Transformada de Fourier com a amostra dispersa em KBr.

### 3.3.6. Espectrometria de RMN $^1\text{H}$ , RMN $^{13}\text{C}$ .

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do nitrofural e do pró-fármaco hidroximetilnitrofural foram obtidos no espectrômetro Bruker, modelo DRX-400, 9.4 T (300 MHz e 400 MHz), utilizando como solvente DMSO- $d_6$ , do laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

### 3.3.7. Equipamento e condições cromatográficas

Para as análises cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu (Japan) modelo LC-10AD, equipado com um detector de absorvância UV-Vis variável modelo SPD-10<sup>A</sup> UV-Vis, controlador modelo SCL-10<sup>A</sup> e, um

desgaseificador modelo DGU-14<sup>A</sup>, com injetor manual e software (CLASS-VP data system, Shimadzu) para aquisição de dados. Coluna analítica de aço inoxidável Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (M) (250 mm x 4,6 mm I.D., 5 µm; Shimadzu), pré-coluna Shimadzu Shim-pack G-ODS (4) (10 mm x 4 mm I.D., 5 µm; Shimadzu), fase móvel em modo isocrático constituída de acetonitrila-tampão pH 4,6 acetato de sódio/ácido acético (21:79/v:v), vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL correspondem às condições cromatográficas otimizadas. O comprimento de onda utilizado para a detecção de NF e NFOH foi 365 nm.

A limpeza da coluna foi realizada diariamente com acetonitrila-água (20:80 v/v) por 12 horas, sendo a água Milli-Q sonicada por 30 minutos anteriormente.

### 3.4. Procedimento Analítico

#### 3.4.1. Preparação da Solução Tampão Acetato de Sódio/Ácido Acético (pH 4,6)

A solução tampão foi preparada pela dissolução de acetato de sódio (8 g) em 500 mL de solução de ácido acético 0,2 M, completando o volume para 1 litro com água desmineralizada, grau “Milli-Q<sup>®</sup>” e ajustando o pH a 4,6.

#### 3.4.2. Preparação das soluções dos padrões

Soluções estoque individuais de nitrofural e hidroximetilnitrofural foram preparadas pela dissolução de cada composto em acetonitrila na concentração de 500 µg/mL. A partir destas, foram preparadas as soluções intermediárias, em acetonitrila, através da diluição de volumes adequados das soluções estoque. As soluções foram devidamente acondicionadas em balões volumétricos, vedados com *parafilm*, identificadas e protegidas da luz com papel alumínio. O trabalho foi desenvolvido com soluções padrões recém-preparadas, ou seja, soluções preparadas sempre no mesmo dia de uso, devido a questões de solubilidade e fotodegradação dos compostos estudados. Essas soluções foram utilizadas para a obtenção das curvas analíticas em acetonitrila, para investigar a hidrólise *in vitro* (em tampão e em plasma) e para estabelecer a metodologia analítica.

### 3.4.3. Determinação da linearidade de resposta do detector (UV) em acetonitrila

A região linear de resposta do detector foi determinada por injeções no CLAE-UV, nas condições operacionais já otimizadas. Soluções padrão de NF e NFOH, preparadas em acetonitrila afim de obter as concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 e 35 µg/ml foram injetadas três vezes. Curvas analíticas foram construídas relacionando-se os valores de concentração das soluções do eixo das abscissas com a resposta ou sinal do detector (expresso como área do pico cromatográfico) dos compostos estudados, no eixo das ordenadas.

### 3.4.4. Determinação da linearidade de resposta do detector (UV) em plasma humano

A faixa linear do detector foi determinada por injeção em triplicata de soluções padrões de NF e NFOH preparadas em acetonitrila, adicionadas em plasma humano, afim, de obter as concentrações de 0,10; 0,25; 0,50; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 8,0 e 10 µg/ml submetidas ao método analítico apresentado no Fluxograma 2. A curva analítica foi construída relacionando-se os valores de concentração das soluções do eixo das abscissas com a resposta ou sinal do detector (expresso como área do pico cromatográfico) dos compostos estudados, no eixo das ordenadas.

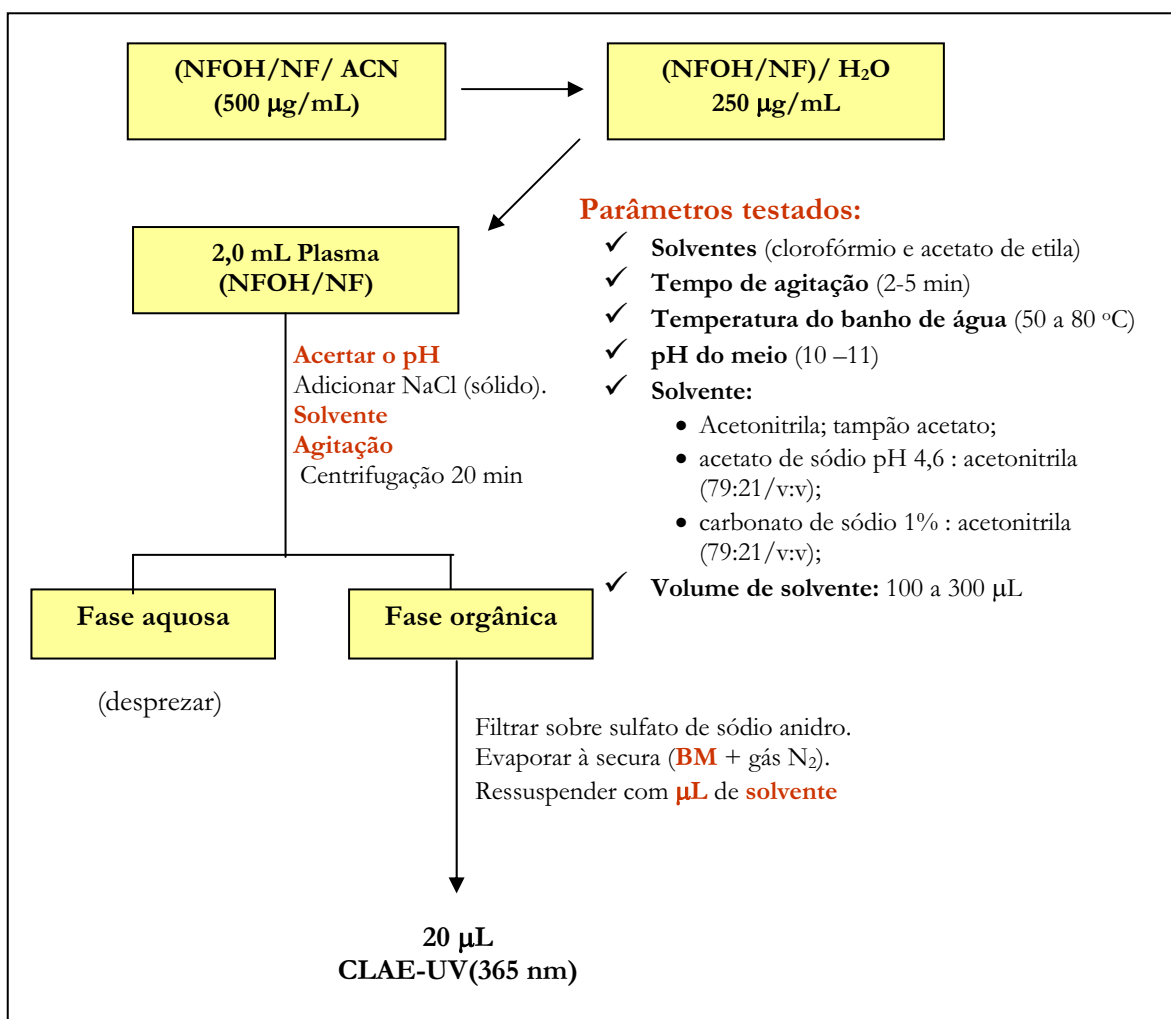
## 3.5. Desenvolvimento e validação de método para determinação dos fármacos em plasma humano

### 3.5.1. Parâmetros investigados

As amostras de plasma foram descongeladas e volume adequado submetido à extração líquido/líquido, testando as seguintes condições experimentais:

- intervalo de pH: 10-11, com uma solução de NaOH 2 N;
- seleção do solvente: clorofórmio e acetato de etila ;
- agitação em vortex: 1, 2 ,3,4 e 5 minutos;
- temperatura de concentração do extrato : 50, 60, 70 e 80 °C
- solvente e volume para ressuspender o extrato: acetonitrila, tampão acetato de sódio (pH 4,6), tampão acetato de sódio (pH 4,6): acetonitrila (79:21/v:v) e carbonato de sódio: acetonitrila (79:21/v:v).

Os fluxogramas (Figuras 37 e 38) representam, respectivamente, os parâmetros de desempenho investigados e o método proposto para determinação de NF e NFOH em plasma humano.



**Figura 37.** Fluxograma dos parâmetros investigados para análise de NF e NFOH em plasma humano.



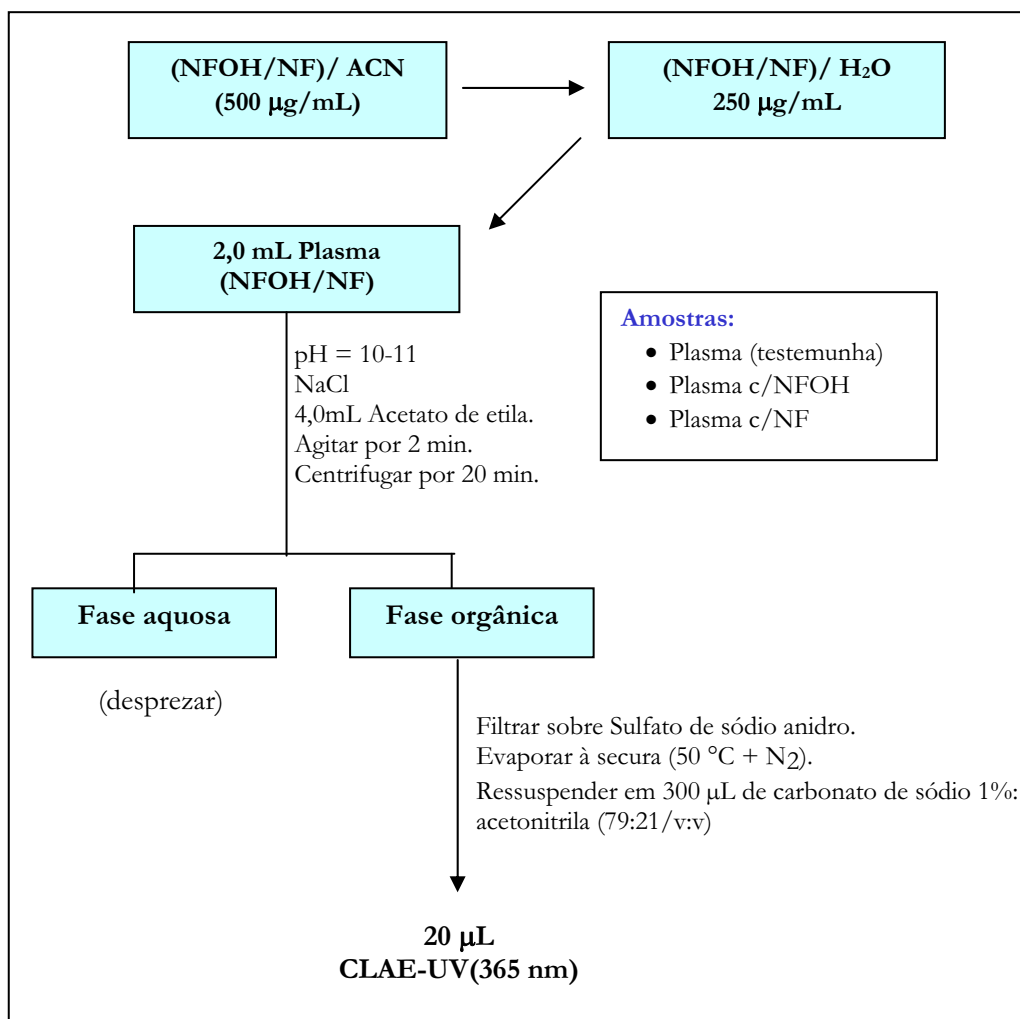


Figura 38. Fluxograma do método proposto para análise de NF e NFOH.

### 3.5.2. Avaliação do método proposto

Em análise de fármacos a validação do método analítico proposto ocorre, usualmente, por meio de ensaios de recuperação, uma vez que esse procedimento gera todas as informações necessárias para a avaliação do procedimento analítico desenvolvido e possa ser aplicado em estudos de farmacocinética (ANVISA, 2003).

A exatidão é a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico e a precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (BRITO et al., 2003). A validação do método foi realizada seguindo recomendações sugeridas pela

ANVISA (2003) para análise de fármacos. Os parâmetros determinados foram: linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e de quantificação do método.

### **3.5.3. Fortificação das amostras**

A fortificação das amostras de plasma foi realizada preparando-se soluções padrão de NFOH e NF em água e adicionando-se volumes adequados destas soluções a 2,0 mL de plasma, de modo a obter concentrações de 0,10; 0,25; 0,50; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 8,0 e 10  $\mu\text{g/mL}$ . Estas soluções foram homogeneizadas e submetidas ao procedimento proposto. Brancos do método foram obtidos, realizando os mesmos procedimentos, sem a adição da amostra dos fármacos em estudo.

### **3.5.4. Exatidão e precisão intra e inter- ensaios**

A exatidão e a precisão (intra e inter-ensaio) do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação realizados com amostras de plasma fortificadas em 3 níveis de concentração ( 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 4,5  $\mu\text{g/mL}$  e 8,0  $\mu\text{g/mL}$ ). A determinação inter ensaio foi obtida com cinco replicatas realizadas durante 3 dias consecutivos para cada nível de fortificação investigado e a intra-ensaio com 10 replicatas, em um único dia, para cada nível de fortificação investigado.

A exatidão e a precisão foram determinadas pelos valores de porcentagem de recuperação e do coeficiente de variação (CV), respectivamente.

### 3.5.5. Determinação do limite de detecção e quantificação do equipamento (CLAE-UV)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do instrumento, para cada composto estudado, equações I e II, foram determinados seguindo método recomendado pela ANVISA (2003), empregando as curvas analíticas obtidas em plasma humano.

$$LD = DP_a \times 3 / b \text{ (I)}$$

$$LQ = DP_a \times 10 / b \text{ (II)}$$

sendo “b” o coeficiente angular da curva analítica de cada composto estudado e “DPa” o desvio padrão da curva analítica.

Operacionalmente, o limite de detecção foi obtido como a menor concentração que resultou na distinção do sinal cromatográfico da linha de base; o limite de quantificação foi definido como a menor concentração que apresentou repetitividade do sinal cromatográfico.

### 3.5.6. Estudo da estabilidade dos fármacos em amostra congelada

O ensaio de estabilidade tem como finalidade verificar se a concentração da substância sofre alterações após um período específico de armazenamento; este ensaio corresponde a um pré-processamento laboratorial (CHANG, 2002).

Amostras de plasma fortificadas em três concentrações situadas nos pontos inferior, médio e superior da curva analítica (0,5 µg/mL; 4,5 µg/mL e 8,0 µg/mL), foram congeladas (-20 °C). A estabilidade dos fármacos foi analisada por diferentes períodos de tempo (1, 2, 3, 8 e 22 dias) de armazenamento. Após esses períodos, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e analisadas.

### 3.6. Conversão *in vitro* do pró-fármaco NFOH em NF

#### 3.6.1. Conversão de NFOH em pH 1,2 e 7,4

A degradação do pró-fármaco NFOH foi estudada em solução tampão aquosa de acetato de sódio (pH 1,2 e 7,4) na concentração de 15 µg/mL, sob agitação constante à temperatura de 37 °C e análise por CLAE. Esta concentração foi escolhida por se situar no ponto médio da curva analítica em acetonitrila (item 4.1.8). As análises foram realizadas em triplicata para cada um dos tempos estudados. Os resultados foram expressos pela média das áreas obtidas.

**pH 1,2:** 0,0; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,00; 12,00; 24,00; 48,00; 72,00; 120,00 horas.

**pH 7,4:** 0,0; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,00; 12,00; 24,00; 48,00; 72,00; 120,00 horas.

#### 3.6.2. Conversão de NFOH *in vitro* em plasma humano

Para realizar o estudo de conversão de NFOH em NF, no plasma, foi preparada uma solução de NFOH de concentração de 250 µg/ml em água a partir da solução estoque de NFOH de 500 µg/ml em acetonitrila. Esta solução aquosa foi adicionada a um volume adequado de plasma para obter concentração final de 15 µg/ml de NFOH.

As análises foram realizadas em triplicata para cada um dos tempos estudados. Os resultados foram expressos pela média das áreas obtidas.

**pH 7,4:** 0,0; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,00; 12,00; 24,00; 48,00; 72,00; 120,00 horas.

### 3.7. Farmacocinética em modelos animais

#### 3.7.1. Protocolo Experimental

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Ciências Farmacêuticas-Unesp-Araraquara (Parecer nº 11/ 2006) em anexo A.

Ratos Wistar, com peso médio entre 250-300g, foram utilizados nos experimentos. Os animais provenientes do biotério central do *Campus* de Botucatu, UNESP-SP foram transferidos para o biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara, onde permaneceram em condições controladas de temperatura ( $23\pm 1$  °C), umidade ( $55\pm 5$  %) e luz (ciclo 12/12 h), recebendo alimento e água à vontade. Os experimentos foram realizados na fase de claro. Os compostos foram administrados na forma de suspensão, na dose de 200 mg/kg, em volume não superior a 1mL. As soluções foram preparadas, diariamente, em DMSO, a partir de massa adequada dos fármacos NF e NFOH. A administração foi realizada por gavagem, uma vez que o tratamento aos portadores da doença de Chagas é realizado com medicamentos por via oral.

O protocolo experimental proposto no presente trabalho para o estudo do NFOH envolveu o número total de 50 animais por grupo, sendo 5 replicatas para a avaliação de 10 tempos de concentração plasmática, viabilizando o cálculo da área sob a curva (AUC) e demais parâmetros farmacocinéticos.

A dose de 200 mg/kg de NF e NFOH, utilizadas para os estudos farmacocinéticos dos dois fármacos, foi escolhida com base nos resultados de toxicidade aguda realizados por Mello (2006). Em seu estudo o autor observou que a dose de 200 mg/kg dos dois fármacos não produziram mortes, quando solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO).

Os animais utilizados foram distribuídos em dois grupos, permanecendo em jejum por 12 horas até a administração do fármaco e mantidos em gaiolas adequadas, sem contato com a maravalha e excrementos, até o início do experimento.

**Grupo I:** animais tratados com NF, via oral

Os animais deste grupo (n=50) receberam dose única de 200 mg/kg de NF pela via oral (gavagem). A cinética do NF foi determinada com base na relação concentração plasmática *versus* tempo, a partir das amostras coletadas em 10 tempos diferentes (0; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,00; 12,00; 24,00 e 48,00 horas). Para cada tempo de coleta foram empregados 5 ratos (5 replicatas para cada tempo).

As amostras de sangue foram obtidas por decapitação dos animais e coletadas em tubos cônicos de plástico com tampas. As amostras de sangue foram mantidas à temperatura ambiente por 3-4 horas até a coagulação do sangue e, em seguida, centrifugadas a 2800 rpm por 10 minutos e os plasmas transferidos para recipientes adequados. Volumes correspondentes a 1,5 mL de plasma foram, então, submetidos ao método proposto.

**Grupo II:** animais tratados com NFOH, via oral

Os animais deste grupo (n=50) receberam dose única de 200 mg/kg de NFOH pela via oral (gavagem). A cinética do NFOH foi determinada com base na relação concentração plasmática *versus* tempo, a partir das amostras coletadas em 10 tempos diferentes (0; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,00; 12,00; 24,00 e 48,00 horas). Para cada tempo de coleta foram empregados 5 ratos (5 replicatas para cada tempo). As amostras de sangue foram mantidas à temperatura ambiente por 3-4 horas até a coagulação do sangue e, em seguida, centrifugadas a 2800 rpm por 10 minutos e os plasmas transferidos para recipientes adequados. Volumes correspondentes a 1,5 mL de plasma foram, então, submetidos ao método proposto e determinadas as concentrações de NFOH, NF administrado e NF produzido pela conversão do NFOH, pelo método de padrão externo, ou seja, usando as equações das curvas analíticas preparadas em plasma (item 4.3). Estas concentrações, para cada tempo, foram obtidas usando os valores médios das análises de cinco replicatas.

### 3.7.2. Análise Farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos (Tabela 4) foram calculados pelas curvas de concentração plasmática *versus* tempo de NFOH, NF e NF obtido pela conversão do NFOH.

As meias-vidas ( $t_{1/2}$ ), as constantes de velocidade (absorção,  $K_a$  e eliminação,  $K_{el}$ ), concentração máxima ( $C_{máx}$ ), tempo máximo ( $T_{máx}$ ), *clearance* (Cl), volume de distribuição (Vd), área sob a curva (AUC) dos fármacos foram determinados pelo modelo monocompartimental para o NF e bicompartimental para NFOH, que melhor se adaptaram aos dados experimentais.

Os valores das áreas sob as curvas de concentração plasmática x tempo ( $AUC_{0-\infty}$ ) foram calculadas pelo método dos trapezóides. Para o NF e NFOH o cálculo do “clearance”(Cl) total aparente foi realizado empregando as equações:

$Cl/f = \text{dose}/AUC$  onde: Cl=“clearance”; f=fator de correção; AUC=área sob a curva

$Vd/f = Cl/f/\beta$  onde: Vd=volume aparente de distribuição; f=fator de correção;  $\beta$ = coeficiente angular da curva.

**Tabela 4.** Método para a obtenção dos parâmetros farmacocinéticos.

Parâmetro	Método para obtenção
$AUC_{0-\infty}$	Trapezóides
Vd/f (L)	Cl/f/ $\beta$
Cl <sub>T</sub> /f (L/h)	Dose/AUC
$T_{1/2}$ (h)	Gráfico
Kel ( $h^{-1}$ )	$0,693/t_{1/2}$

### 3.7.3. Análise Estatística

Para a análise dos resultados obtidos foi utilizado o software EXCEL (pacote Office, Windows® XP).

Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos aplicando-se método gráfico e aplicação de fórmulas matemáticas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pro-fármaco em estudo já mostrou em investigações, realizadas em nosso laboratório, menor mutagenicidade e baixa toxicidade em comparação ao NF, sendo ainda necessário a obtenção de mais informações para sua viabilização no mercado farmacêutico.

Portanto, os procedimentos adotados e os resultados apresentados neste estudo compreendendo preparação e caracterização do NFOH; desenvolvimento e validação de método para determinação do NFOH em plasma animal e humano; ensaio de conversão em meio ácido e alcalino (em tampão) e conversão em plasma humano e análise farmacocinética desenvolvida segundo os protocolos descritos pelo Center for Drug Evaluation and Research (CDER/FDA, 2003) ( $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $K_{el}$ ,  $t_{1/2\beta}$ , "clearance",  $V_d$  e AUC) deverão contribuir para o desenvolvimento do pró-fármaco NFOH.

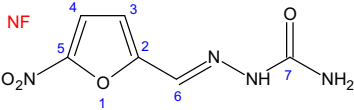
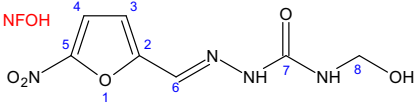
### 4.1. Preparação e caracterização estrutural

A preparação do NFOH a partir do NF foi realizada por adição nucleofílica à carbonila de aldeído, reproduzindo o método descrito por CHUNG (1996).

O produto obtido foi recristalizado com metanol/água e analisado por CCD (uma única mancha:  $R_f$  0,72) utilizando-se como sistema solvente  $CHCl_3:MeOH:CH_3COOH$  (95:5:3/v:v:v), como descrito por CHUNG (1996). O rendimento da reação foi de 65%, com faixa de fusão de 152-156 °C demonstrando que o método utilizado foi eficiente. Este experimento foi repetido para a obtenção de massa adequada para realização dos ensaios. As Tabelas 5 e 6 apresentam, respectivamente, as propriedades físico-químicas do NF e NFOH e os resultados dos testes de solubilidade realizados em diferentes solventes.



**Tabela 5.** Propriedades físico-químicas do NF e NFOH.

Estrutura Química		
Nomenclatura	5-nitro-2-furaldeído semicarbazona ou 2-[(5-nitro-2-furanila)metileno]carboxiamida hidrazina ou nitrofural	5-nitro-2-furaldeído <i>N</i> -(hidroximetil)semicarbazona ou hidroximetilnitrofural
Massa Molecular	198,14	228,29
Fórmula Molecular	$C_6H_6N_4O_4$	$C_7H_8N_4O_5$
Descrição	Pó amarelo	Pó amarelo-castanho
Faixa de decomposição	236-240 °C	152-156 °C
Classe Terapêutica	Antibacteriano	-
Estabilidade	Fotossensível	Fotossensível

#### 4.1.1. Determinação da solubilidade de NF e NFOH

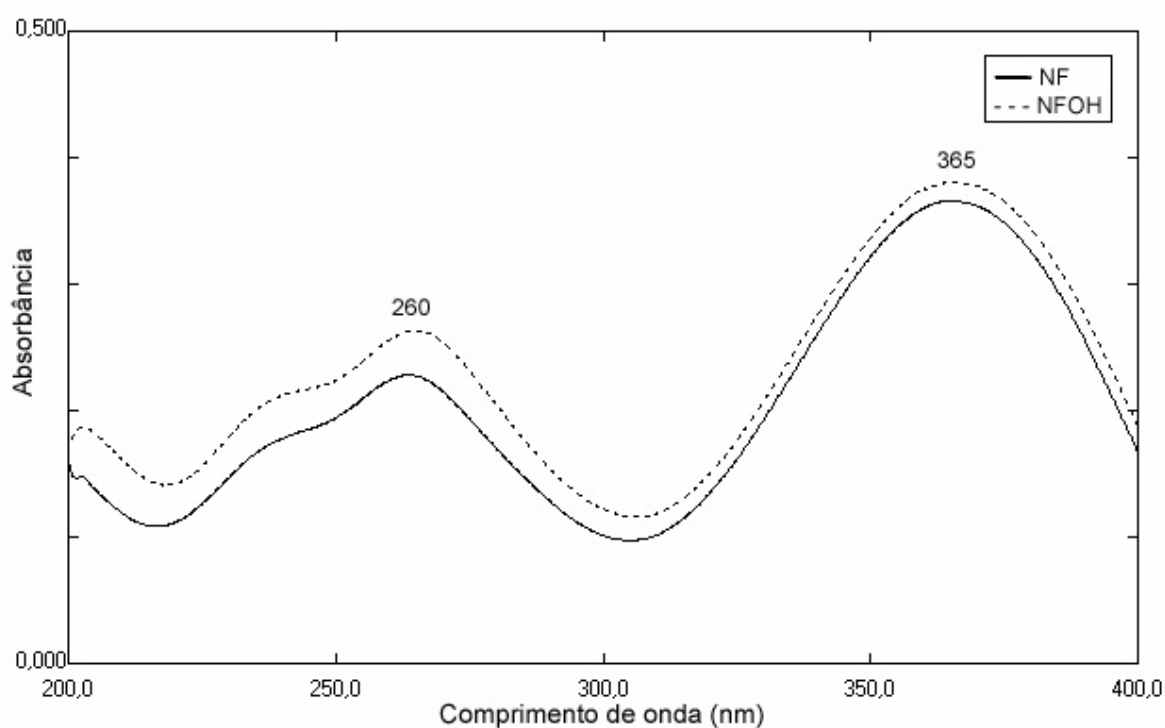
Os testes de solubilidade do NF e NFOH realizados em diferentes solventes estão descritos na Tabela 6, confirmando que a introdução do grupo hidroximetilado altera a solubilidade.

**Tabela 6.** Solubilidade do NF e NFOH em diferentes solventes.

<b>Solvente</b>	<b>Nitrofural</b>	<b>Hidroximetilnitrofural</b>
Água	Insolúvel	Muito pouco solúvel 1:10.000 partes
Metanol	Muito pouco solúvel 1:1200 partes	Muito pouco solúvel 1:1100 partes
Etanol	Muito pouco solúvel 1:3800 partes	Muito pouco solúvel 1:1000
Acetona	Muito pouco solúvel 1:3000 partes	Muito pouco solúvel 1:1800 partes
Dimetilsufóxido	Facilmente solúvel 1:5 partes	Facilmente solúvel 1:3 partes
Dimetiformamida	Facilmente solúvel 1:6 partes	Facilmente solúvel 1:4 partes
Acetonitrila	Muito pouco solúvel 1:2600 partes	Muito pouco solúvel 1:2500
Propilenoglicol	Insolúvel	Muito pouco solúvel 1:2500 partes
Tetrahidrofurano	Muito pouco solúvel 1:9000 partes	Muito pouco solúvel 1:1500
Ácido Acético	Insolúvel	Muito pouco solúvel 1:1200
Butanol	Muito pouco solúvel 1:6000 partes	Insolúvel
Álcool isopropílico	Muito pouco solúvel 1:3500	Insolúvel
Hidróxido de Amônio	Muito pouco solúvel 1:6000	Muito pouco solúvel 1:3000

#### 4.1.2. Espectrometria no UV

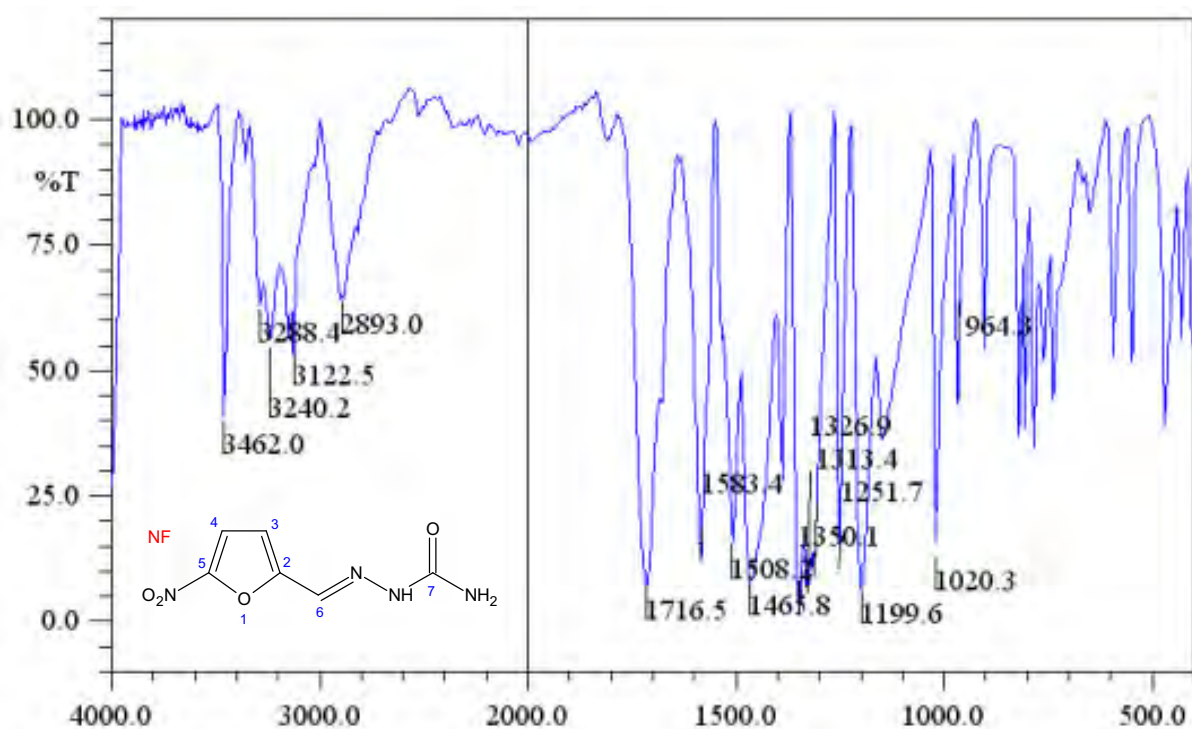
A literatura (O'NEIL, M.J., 2006) apresenta para o NF valores de absorvância máxima nos comprimentos de onda de 260 e 375 nm. O espectro de UV em metanol do hidroximetilnitrofural e do nitrofural (Figura 39) apresentou bandas de absorção com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 260 e 365 nm. Os dois espectros apresentaram bandas de mesmo comprimento de onda, não são sobreponíveis por apresentarem absorvidade molar diferentes e não existindo deslocamentos significativos para a caracterização do NFOH, foi necessário a utilização de outras técnicas, como IV e RMN.



**Figura 39.** Espectros de absorvância no UV-Vis obtidos para hidroximetilnitrofural (NFOH) e do nitrofural (NF).

### 4.1.3. Espectrometria no Infravermelho (IV)

No espectro no IV (KBr) do NF (Figura 40), observam-se bandas de deformação axial de amida primária resultante das deformações simétrica ( $3\,122\text{ cm}^{-1}$ ) e assimétrica ( $3\,288\text{ cm}^{-1}$ ) de NH. A deformação axial de C=O, e a deformação angular de N-H estão sobrepostas em  $1\,716\text{ cm}^{-1}$ . A deformação axial de C-N é observada em  $1\,465\text{ cm}^{-1}$  e a deformação angular fora do plano de N-H é visualizada ente  $600\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ . Outras bandas foram observadas neste experimento: deformação axial de N-H de amida secundária em  $3\,462\text{ cm}^{-1}$ ; deformações axiais assimétricas de  $\text{NO}_2$  em  $1\,583\text{ cm}^{-1}$  e simétricas em  $1\,350\text{ cm}^{-1}$  e, ainda, deformações axiais simétricas e assimétricas de C-H na região  $2\,893\text{-}2\,964\text{ cm}^{-1}$ .

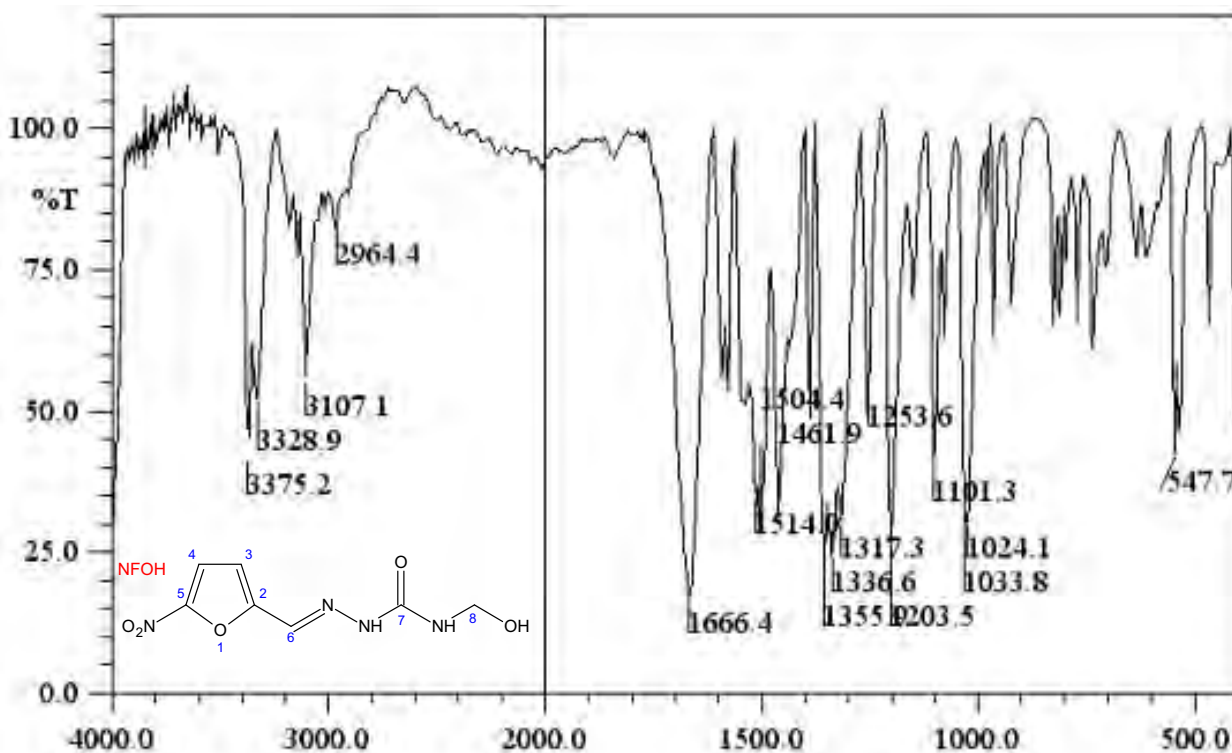


**Figura 40.** Espectro no Infravermelho do nitrofural (NF) (FT-IR)-pastilha de KBr.

No espectro no IV (KBr) do NFOH (Figura 41), não se observam as bandas de deformação axial simétrica e assimétrica de amida primária resultante de NH. A deformação axial de C=O e a deformação angular de N-H aparecem sobrepostas em  $1\,666\text{ cm}^{-1}$ , observando-se deslocamento da banda em relação ao NF. A deformação axial de C-N é observada em  $1\,461\text{ cm}^{-1}$  e a deformação angular fora do plano de N-H é visualizada ente  $600\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ . No espectro de infravermelho de amidas

secundárias em amostras sólidas a banda de N-H livre é substituída por bandas múltiplas na região de 3330 -3060  $\text{cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). O espectro de IV do hidroximetilnitrofurural apresenta duas bandas em 3328  $\text{cm}^{-1}$  e 3375  $\text{cm}^{-1}$  referentes provavelmente ao estiramento axial da ligação O-H e ao estiramento axial simétrico e assimétrico da ligação N-H, respectivamente (MELO, 2006).

Observaram-se deformações axiais assimétricas de  $\text{NO}_2$  em 1583  $\text{cm}^{-1}$  e simétricas em 1350  $\text{cm}^{-1}$ . Ainda observa-se estiramento axial da ligação C-H da subunidade furânica (aromático) em 3107  $\text{cm}^{-1}$ . As deformações axiais simétricas e assimétricas de C-H encontram-se na região 2964-3107  $\text{cm}^{-1}$ . A superposição das frequências de formação axial de N-H e O-H torna diferenciação inequívoca das estruturas desses compostos, freqüentemente impossível. Portanto, a análise dos espectros de IV não é conclusiva para observar a modificação estrutural.



**Figura 41.** Espectro no Infravermelho do hidroximetilnitrofurural (NFOH) (FT-IR)- pastilha de KBr.

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

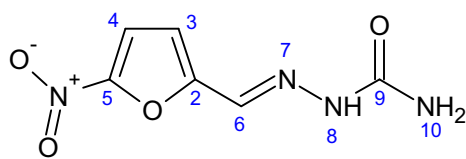
A Ressonância Magnética Nuclear é uma das técnicas mais utilizadas e a que fornece maiores informações para a elucidação e/ou determinação estrutural de substâncias. Portanto, foram obtidos os espectros de RMN, de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do NF e NFOH.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do NF (Figura 42, Tabela 7) mostrou sinais de deslocamentos químicos em  $\delta$  10,81 referentes aos hidrogênios 8 e 10. Observa-se ainda um singlete em  $\delta$  7,77 que foi atribuído ao hidrogênio 6 e dois dubletos, ( $J = 3,96$ ) um em  $\delta$  7,23 e outro em  $\delta$  6,62 referentes aos hidrogênios 3 e 4 respectivamente .

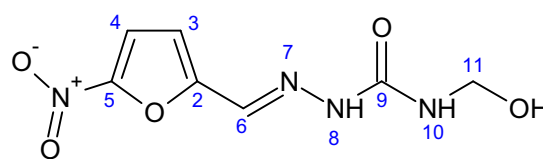
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do NF (Figura 43) apresentou sinais de 6 carbonos, sendo o carbono do grupo carbonila observado em  $\delta$  155,8. A Tabela 7 apresenta os deslocamentos químicos de todos os carbonos, que foram comparados com os valores da literatura (MILLS e ROBERSON, 1987).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do NFOH (Figuras 44 e 44a, Tabela 7) apresentou sinais de deslocamentos químicos em  $\delta$  7,66 referente ao hidrogênio 8 e em  $\delta$  5,53 referente ao hidrogênio 10. Observa-se ainda um singlete em  $\delta$  7,82 que foi atribuído ao hidrogênio 6 e dois dubletos ( $J = 3,96$ ), um em  $\delta$  7,81 e outro em  $\delta$  7,25 referentes aos hidrogênios 3 e 4 respectivamente. Observa-se ainda um tripleto em  $\delta$  4,62 referente a hidrogênios ( $\text{CH}_2$ ), ligado a oxigênio. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou ainda um singlete em  $\delta$  11,03 que foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do NFOH (Figura 45) apresentou sinais de 7 carbonos, sendo o carbono do grupo carbonila observado em  $\delta$  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  $\delta$  63,0. O espectro Dept (Figura 46) confirmou a presença de um grupo  $\text{CH}_2$  em  $\delta$  63,04, demonstrando, portanto a formação de NFOH. A Tabela 7 apresenta o deslocamento químico de todos os carbonos observados.



NF



NFOH

**Tabela 7.** Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de NF e NFOH ( $\text{DMSO}_{\text{d}_6}$ , 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 400 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).

Posição	$^1\text{H}$ NF	$^{13}\text{C}$ NF	$^1\text{H}$ NFOH	$^{13}\text{C}$ NFOH
2	—	153,1	—	152,7
3	7,23 (1H, d, 3,96)	112,1	7,81 (1H, d, 3,96)	112,6
4	6,62 (1H, d, 3,96)	115,2	7,25 (1H, d, 3,96)	115,0
5	—	151,2	—	151,2
6	7,77 s (1H)	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 (2H, t)	—
11	—	—	4,62 (1H, t)	63,0
OH	—	—	11,0	—

<sup>a</sup> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

<sup>b</sup> Constantes de acoplamento ( $J$ ), expressos em Hz.

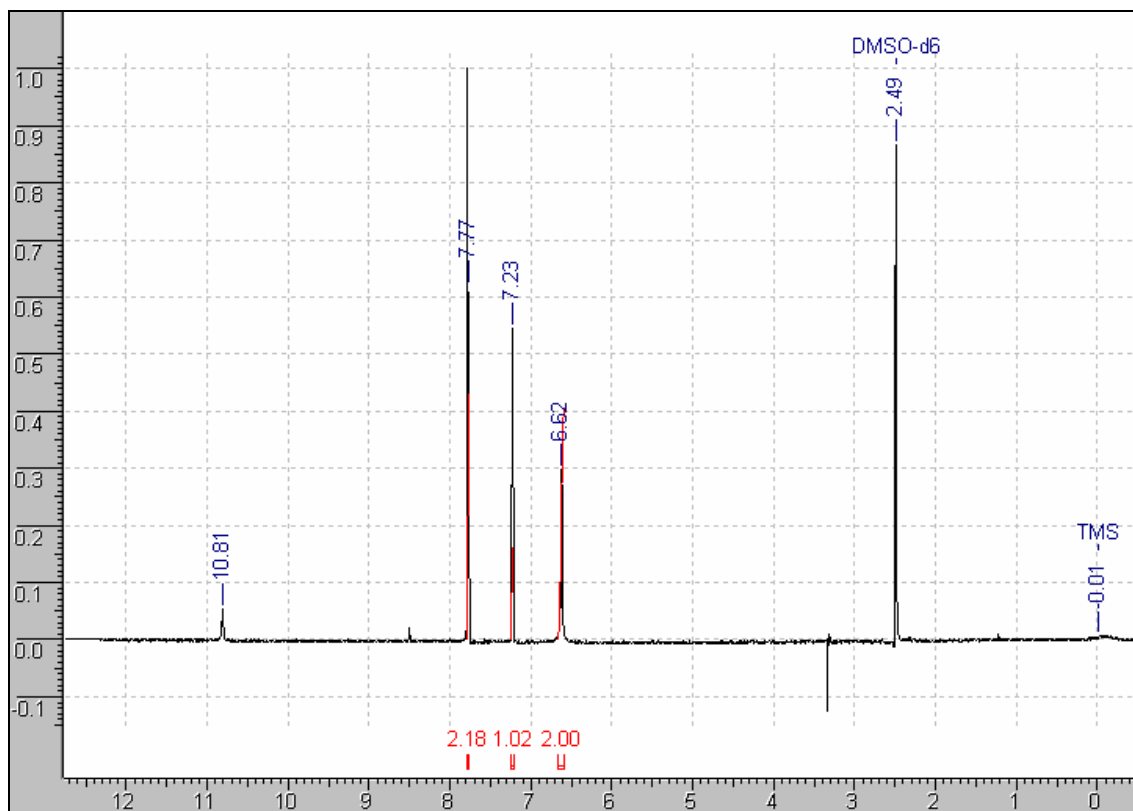


Figura 42. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ampliado (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm) do fármaco nitrofurural (NF).

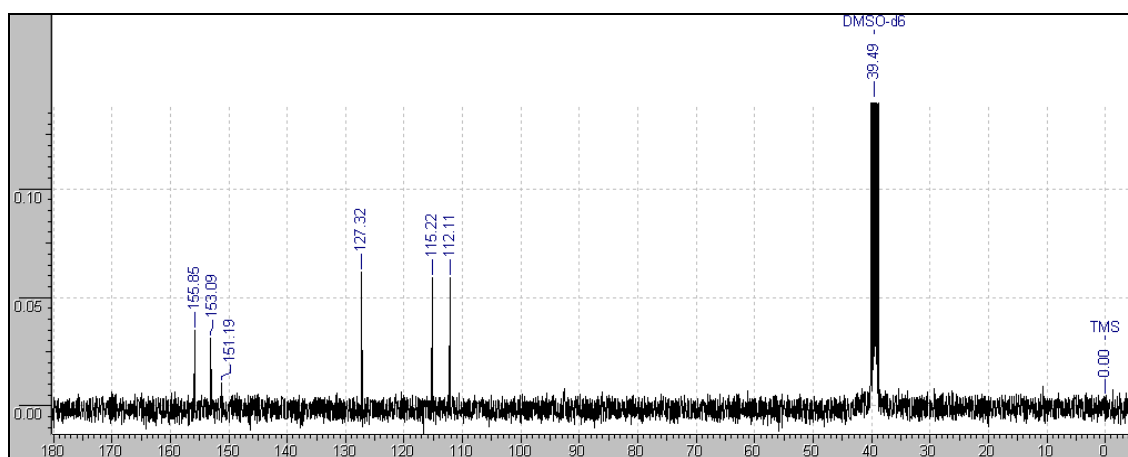
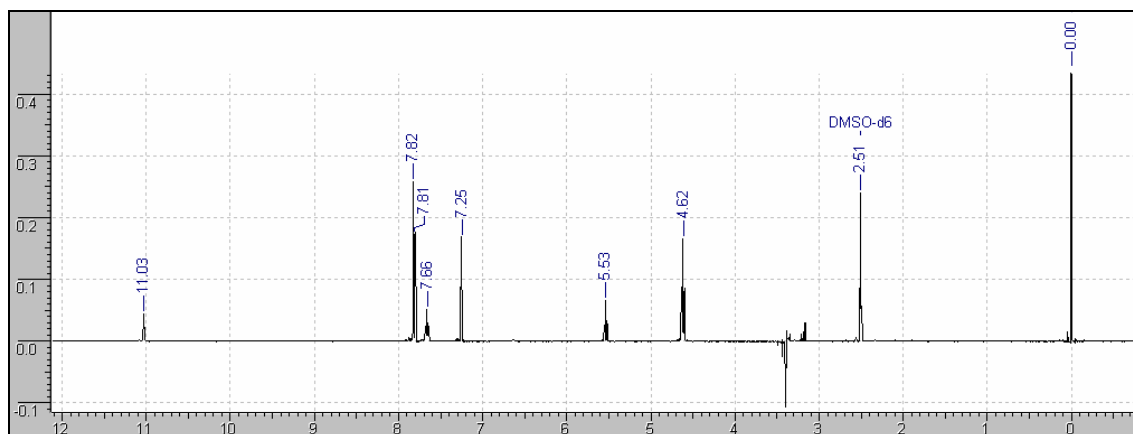
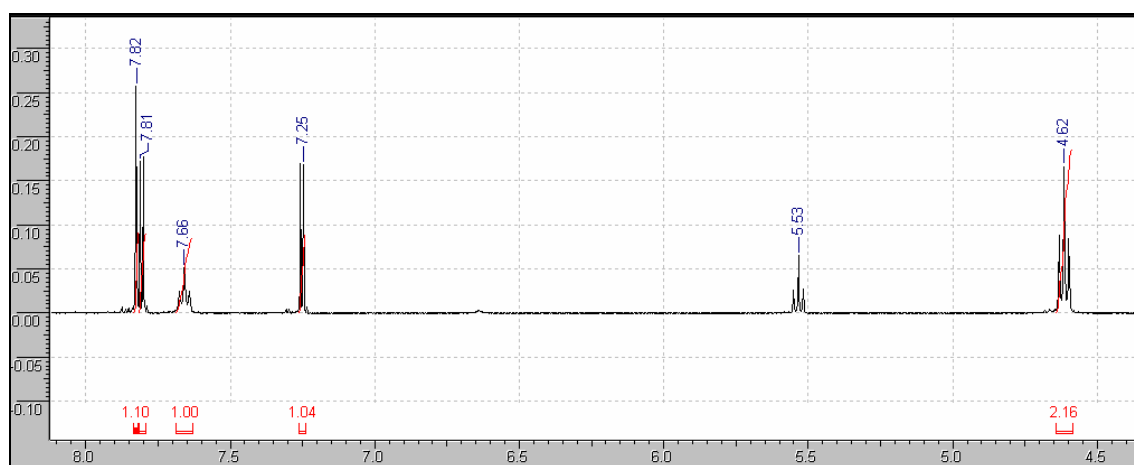


Figura 43. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm) do fármaco nitrofurural (NF).





**Figura 44.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm) do pró-fármaco hidroximetilnitrofurazol .



**Figura 44a.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ampliado (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm) do pró-fármaco hidroximetilnitrofurazol .

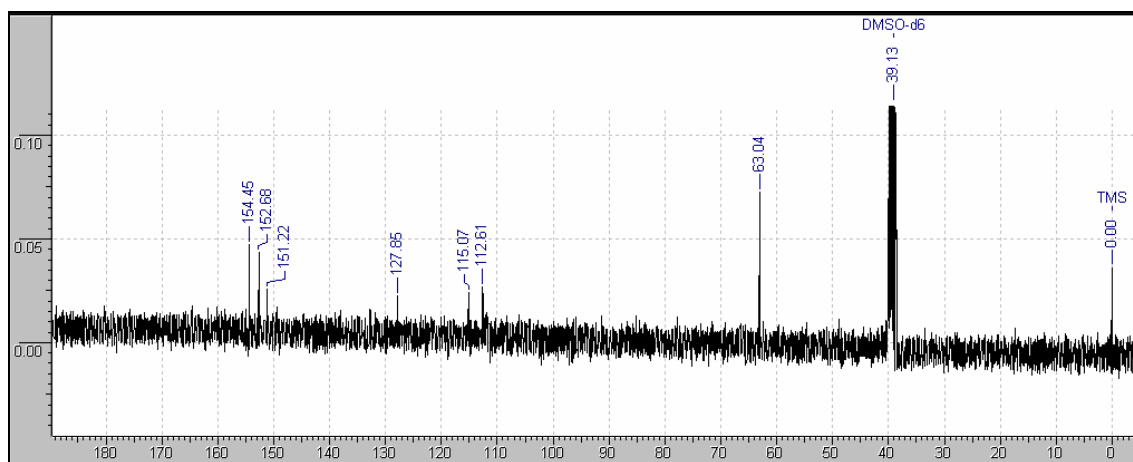


Figura 45. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ,  $\delta$  ppm) do pró-fármaco hidroximetilnitrofur.

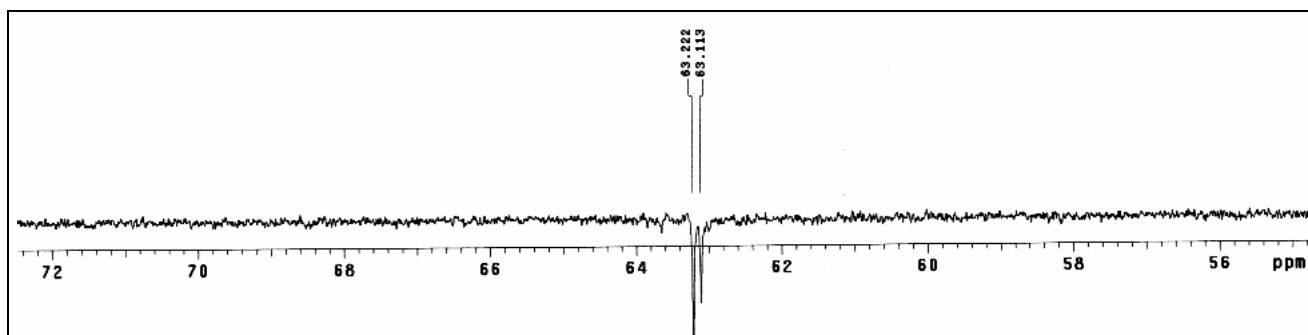
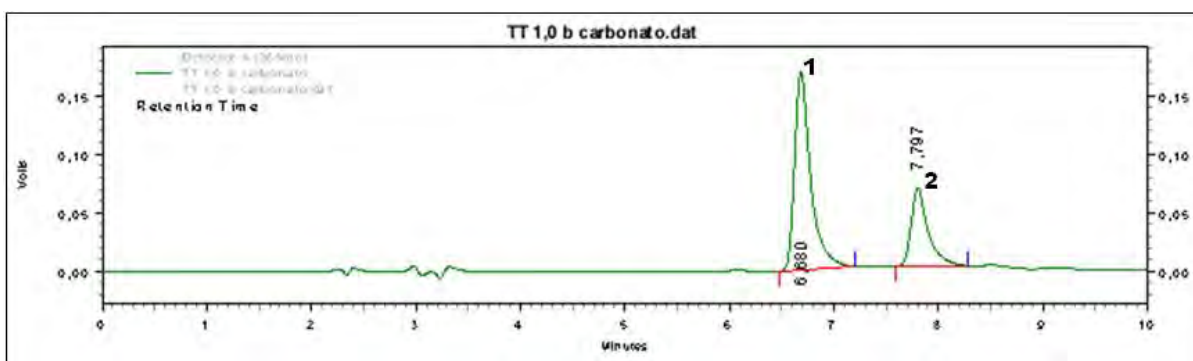


Figura 46. Espectro DEPT (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ,  $\delta$  ppm) do NFOH

#### 4.1.5. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas, descritas no item 3.3.7, foram aquelas otimizadas anteriormente por Chung et al (2003).

Foi observado no desenvolvimento do trabalho que o sistema solvente para ressuspender os fármacos influenciavam as respostas obtidas nos cromatogramas: variação na linha de base e baixa resolução dos picos. Vários testes foram realizados, ressuspendendo os fármacos em acetonitrila, na fase móvel, em tampão acetato de sódio/ ácido acético pH 4,6 (79:21/v:v) e em carbonato de sódio e acetonitrila (79:21/v:v). Este último sistema foi o mais adequado para resolver este problema. A Figura 48 apresenta um cromatograma que exemplifica este resultado.



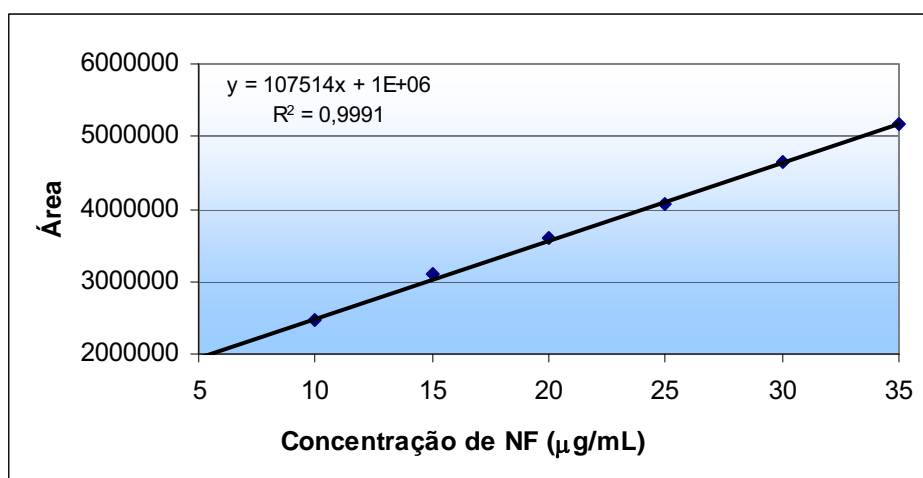
**Figura 47.** Cromatograma (CLAE-UV) (1) solução NF (2,5 $\mu$ g/mL); (2) solução NFOH (2,5 $\mu$ g/mL). Fase Móvel: tampão acetato de sódio/ácido acético pH 4,6 (79:21/v:v) a 365 nm.

#### 4.1.6. Preparação das curvas analíticas (CLAE) do NF e NFOH em acetonitrila

Para avaliar o comportamento cromatográfico do NF e do NFOH foi realizado um estudo preliminar dos padrões em acetonitrila. As curvas analíticas foram construídas empregando soluções padrões, preparadas em acetonitrila nas concentrações de 5,0 a 35,0  $\mu\text{g/mL}$  para NF e NFOH, como mostram as Tabelas 8 e 9. As curvas analíticas, as equações obtidas pela regressão linear das curvas analíticas,  $y=bx+a$ , e seus respectivos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) apresentadas nas Figuras 49 e 50, indicam bons valores de coeficiente de correlação para os fármacos estudados. O resumo destes resultados (Tabela 10) confirma o intervalo linear de 5,0 a 35,0  $\mu\text{g/mL}$  para NF e NFOH.

**Tabela 8.** Concentração de NF ( $\mu\text{g/mL}$ ) x área (triplicata)

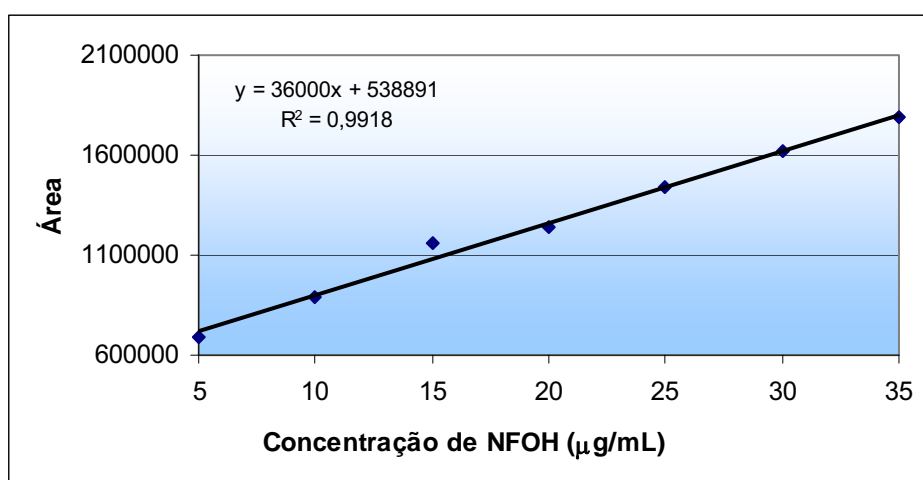
Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (média)	Área A	Área B	Área C
5,0	1933115	1821072	1980234	1998040
10,0	2466263	2101757	2689533	2607499
15,0	3094148	3079281	3057849	3145313
20,0	3598576	3590168	3535433	3670126
25,0	4076273	4142248	4101699	3984873
30,0	4644009	4668097	4539685	4724244
35,0	5171238	5246121	5193865	5073729



**Figura 48.** Curva analítica para NF, à  $\lambda = 365$  nm.

**Tabela 9.** Concentração de NFOH ( $\mu\text{g/mL}$ ) x área (triplicata de padrão)

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (média)	Área A	Área B	Área C
5,0	688085	688661	692254	683339
10,0	886480	863028	927762	868651
15,0	1155265	1059325	1352789	1053682
20,0	1240005	1252619	1227087	1240308
25,0	1438149	1417333	1471135	1425978
30,0	1618501	1615141	1618661	1621701
35,0	1785787	1768167	1782883	1806312

**Figura 49.** Curva analítica para NFOH, a  $\lambda = 365$  nm.**Tabela 10.** Tempo de retenção e equações das curvas analíticas e coeficientes de correlação dos fármacos estudados em acetonitrila utilizando como fase móvel acetonitrila: tampão acetato de sódio/ácido acético pH 4,6 (21:79/v:v) (CLAE-UV-vis)

Fármacos	Tempo de retenção (min)*	Equação da reta ( $R^2$ )
NF	7,8	$Y=147514x+1E+06$ (0,9991)
NFOH	6,7	$Y=36000x+538891$ (0,9918)

\* n=15 replicatas

## 4.2. Desenvolvimento e validação de método para determinação dos fármacos em plasma humano

O estudo da disposição cinética de fármacos requer disponibilidade de métodos analíticos com sensibilidade e especificidade compatíveis com as concentrações plasmáticas obtidas pela administração de fármacos em doses única ou múltiplas. A determinação das concentrações séricas ou plasmáticas de fármacos e seus metabólitos possui grande importância para a avaliação da relação dose *versus* efeito e, desta forma, métodos validados desses compostos são imprescindíveis para o desenvolvimento de novos fármacos.

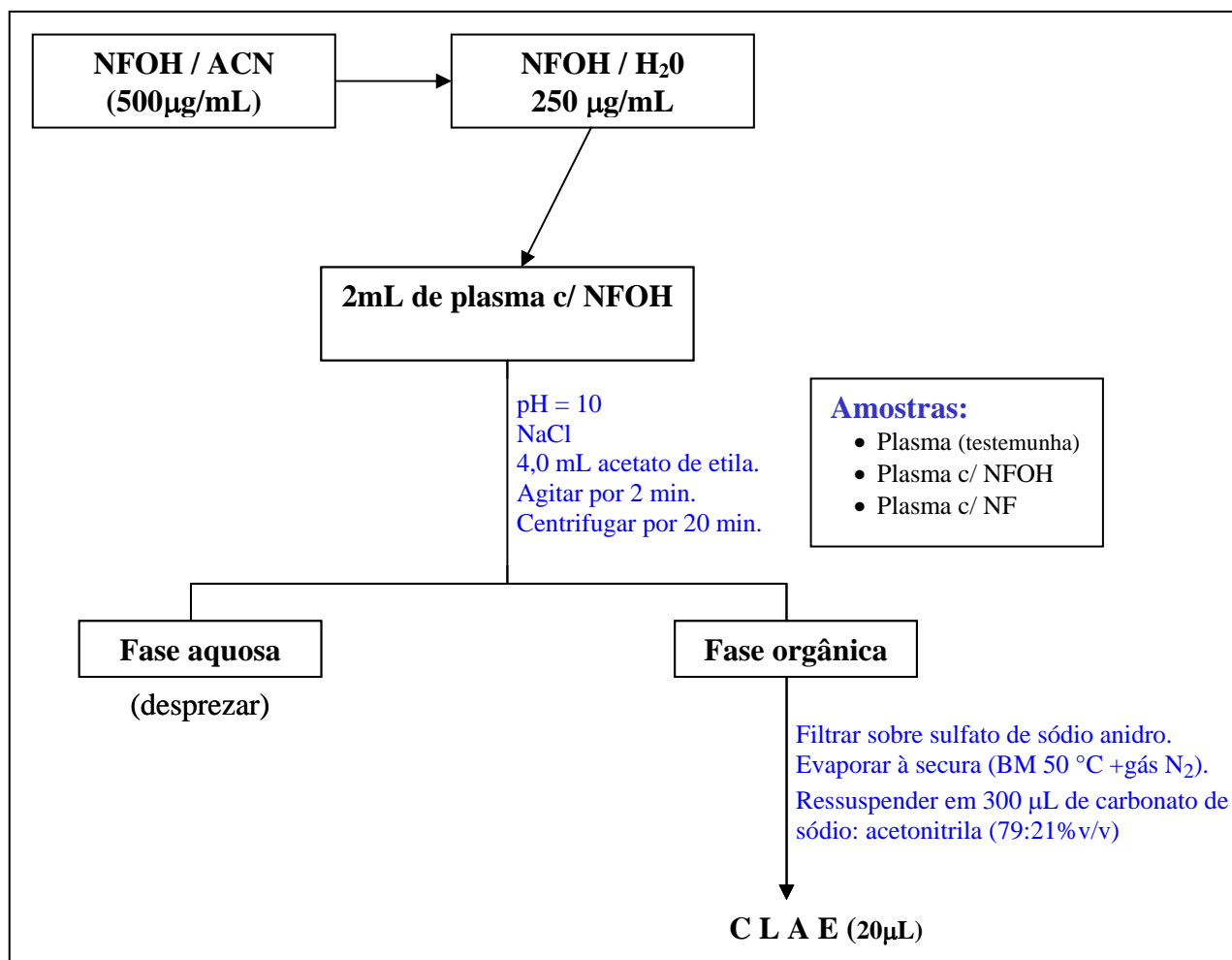
Nas análises de fármacos em amostras biológicas, as técnicas mais empregadas são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV, a cromatografia gasosa (CG) com detector de captura de elétrons e eletroforese capilar (EC) (FREIRE et al, 2005; RIBANI et al, 2004). Independentemente da técnica de identificação e quantificação, as amostras biológicas precisam ser submetidas a um pré-tratamento (extração, pré-concentração e purificação) para eliminar interferentes da matriz e aumentar a sensibilidade e seletividade analítica (LANÇAS e QUEIROZ, 2005). No pré-tratamento das amostras biológicas as técnicas mais utilizadas são: extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS), extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas ou líquidas (LIMA et al, 2006).

Neste trabalho, optou-se pela extração líquido-líquido, técnica simples e de baixo custo, amplamente utilizada nas determinações de fármacos em materiais biológicos e os parâmetros de validação do método analítico investigado foram: linearidade, intervalo de trabalho, exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação.

#### 4.2.1. Otimização das condições de extração de NF e NFOH de plasma usando a técnica de extração líquido /líquido

Os seguintes parâmetros foram estabelecidos para extração de NF e NFOH de plasma: amostras de plasma foram tratadas com solução de NaOH até atingir pH 10, o qual mantém o NF e o NFOH na forma não ionizada, além de permitir a eliminação de outros interferentes do plasma na próxima etapa do procedimento; a adição de NaCl promoveu o “salting-out” dos fármacos da fase aquosa para a orgânica; o acetato de etila foi selecionado como solvente de extração dos fármacos pela eficiência da extração (melhores resultados de recuperação), além de substituir um solvente clorado (clorofórmio) e evitar a formação de emulsão; o tempo de agitação (2 minutos) foi adequado para efetuar a extração e não emulsionar a solução; centrifugação de 20 minutos proporcionou adequada separação das fases aquosa e orgânica; a evaporação do acetato de etila foi realizada, sob suave fluxo de nitrogênio, à temperatura de aproximadamente 50 °C para evitar perdas dos fármacos; foi necessário testar sistemas de solventes que solubilizassem o resíduo e que fornecessem picos bem resolvidos e, estas condições foram conseguidas ressuspendendo em solução de carbonato de sódio:acetonitrila (79:21/v:v).

Definidos os parâmetros experimentais do procedimento analítico, o método foi, então, aplicado às seguintes amostras: plasma (amostra testemunha), plasma com NF e/ou NFOH nas concentrações de 15 µg /mL(amostra fortificada) conforme mostra a Figura 51.



**Figura 50.** Fluxograma do procedimento analítico proposto.



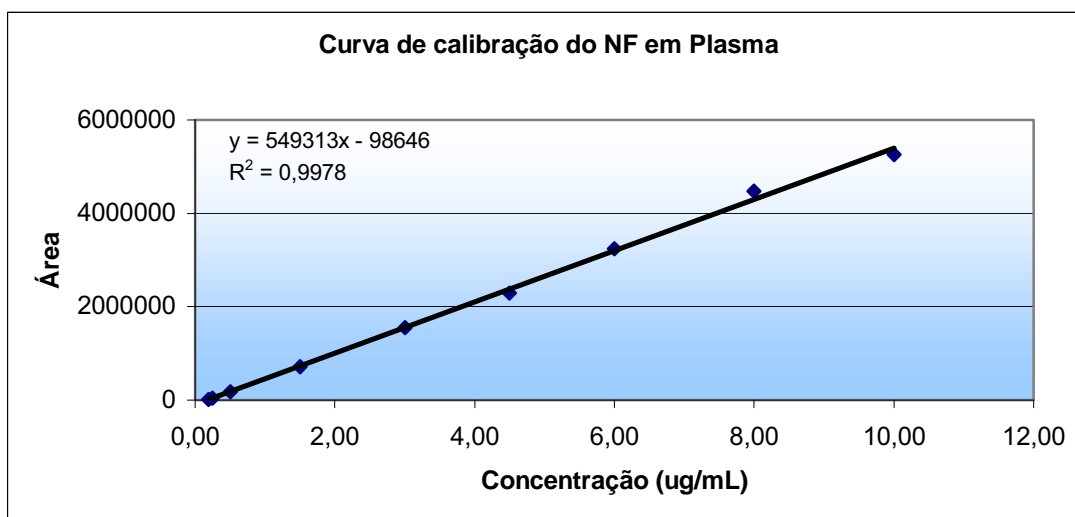
### 4.3. Preparação das curvas analíticas do NF e NFOH em plasma humano

Com o objetivo de reproduzir as mesmas condições experimentais das análises *in vitro* e *in vivo* e garantir a confiabilidade destes resultados, curvas analíticas foram construídas, a partir de amostras de plasma fortificadas no intervalo de concentrações: 0,10 a 10,0 µg/mL, para NF e NFOH (Figuras 52 e 53) e submetidas ao método analítico proposto. A Tabela X apresenta as equações obtidas pela regressão linear das curvas analíticas,  $y=bx+a$ , e seus respectivos coeficientes de correlação ( $R^2$ ), bem como o intervalo linear de trabalho para amostras de plasma.

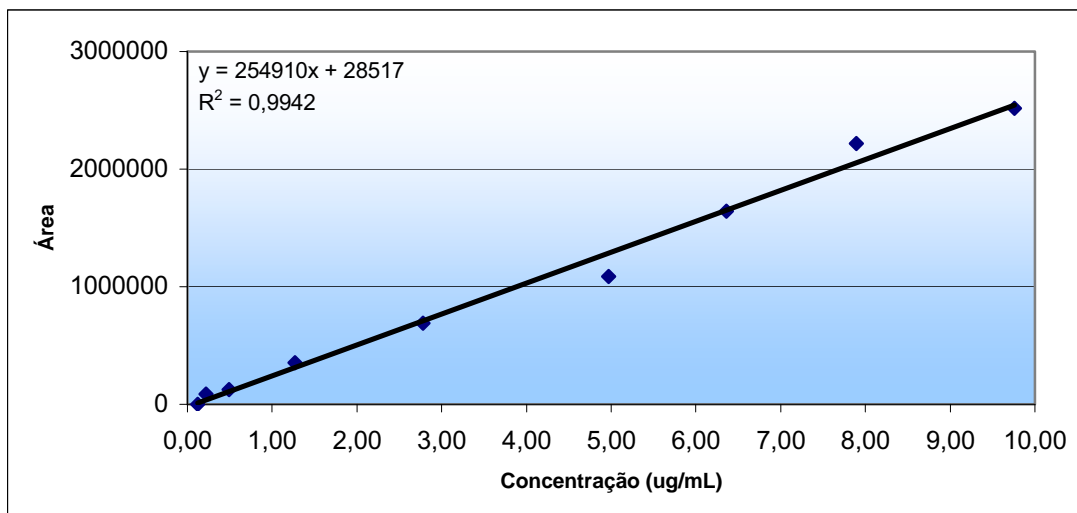
**Tabela 11.** Tempo de retenção e equações das curvas analíticas e coeficientes de correlação dos fármacos estudados em plasma utilizando como fase móvel acetonitrila: tampão acetato de sódio/ácido acético pH 4,6 (21:79/v:v) (CLAE-UV-vis)

Fármacos	Tempo de retenção (min)*	Equação da reta ( $R^2$ )
NF	7,8	$Y=549313x-98646$ (0,9978)
NFOH	6,7	$Y=254910x+28517$ (0,9942)

\* n=15 replicatas



**Figura 51.** Curva analítica em plasma humano para NF.



**Figura 52.** Curva analítica em plasma humano para NFOH.

A repetitividade (intra e inter-dias) dos tempos de retenção dos fármacos estudados, obtidos por CLAE-UV estão apresentados na Tabela 12 e são médias de quinze injeções de NF e NFOH. Os valores de desvio padrão demonstram que os tempos de retenção foram repetitivos, expressando assim a precisão (repetitividade) das injeções, nas mesmas condições de operação, sob curto espaço de tempo. A Tabela 12 demonstra também que os valores dos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) obtidos para NF e NFOH em acetonitrila e em plasma estão de acordo com o critério mínimo aceitável para amostras biológicas (0,99), exigido pela legislação da ANVISA (ANVISA, 2003).

**Tabela 12.** Equações das curvas analíticas, coeficientes de correlação e repetitividade do tempo de retenção (intra e inter dias) dos fármacos

Fármacos	Tempo de retenção (min)* CV(%)	Equações da reta ( $R^2$ )	
		Acetonitrila	Plasma humano
NF	7,8 (0,2)	$y=107514x + 10^6$ (0,9991)	$y=549313x - 98646$ (0,9978)
NFOH	6,7 (0,3)	$y=36000x + 538891$ (0,9918)	$y=254910x + 28517$ (0,9942)

\*média de 5 repetições

#### 4.4. Avaliação da eficiência do método proposto: exatidão e precisão

A eficiência do método para a determinação de NF e NFOH foi avaliada a partir dos resultados de exatidão e precisão obtidos com estudos de recuperação com amostras de plasma humano fortificadas em 3 níveis de concentração (0,50 µg/mL; 4,50 µg/mL e 8,00 µg/mL).

##### 4.4.1. Exatidão intra-ensaio e precisão intra-ensaio (ou repetibilidade)

A exatidão intra-ensaio foi determinada como recuperação média. A repetibilidade foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) dos resultados de recuperação obtidos em um único dia (n=10).

##### 4.4.2. Exatidão inter-ensaio e precisão inter-ensaio (ou precisão intermediária)

A exatidão inter-ensaio e a precisão intermediária do método foram determinadas da mesma maneira descrita para os testes intra-ensaio (na seção anterior), mas com os testes de recuperação realizados em três dias consecutivos (n=5). O sumário dos resultados de recuperação e CV obtidos nos testes inter-ensaio para os fármacos, nos três níveis de fortificação, 0,50 µg/mL; 4,5 µg/mL; e 8,0 µg/mL estudados são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Sumário dos resultados de recuperação obtidos nos testes intra e inter-ensaios para os fármacos NF e NFOH no método de extração líquido-líquido (ELL/CLAE-UV)

Nível de fortificação (µg/mL)	Intra-ensaio (*n=10)	Inter-ensaio (*n=5)
	%Recuperação* (CV,%)	%Recuperação* (CV,%)
<b>NF</b>		
0,50	86 (82-90) (4)	84 (81-87) (3)
4,50	96 (93-99) (3)	96 (93-99) (3)
8,00	98 (96-99) (1)	98 (97-99) (1)
<b>NFOH</b>		
0,50	88 (75-101) (13)	90 (78-101) (11)
4,50	96 (94-98) (2)	97 (95-99) (2)
8,00	96 (93-99) (3)	96 (94-98) (2)

CV (coeficiente de variação), \* média de 5 e 10 repetições.

A exatidão inter-ensaio e a precisão inter-ensaio obtidas para os fármacos foram satisfatórias (Tabela 13).

Em conclusão, os resultados apresentados para a exatidão e precisão (intra e inter-ensaio) dos fármacos mostram que o desempenho do método de extração líquido-líquido (ELL/CLAE-UV) desenvolvido, utilizando a matriz plasma, apresenta concordância com as exigências requeridas para um método quantitativo (inferiores a 15%), de acordo com os critérios para validação de métodos para análise de fármacos (ANVISA, 2003).

#### 4.4.3. Limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção é a menor concentração do fármaco que pode ser detectada, mas não quantificada sob as condições experimentais estabelecidas. Os limites de detecção do método proposto para NF e NFOH foram determinados operacionalmente como a menor concentração dos fármacos que resultou em um sinal cromatográfico distinguível da linha de base: 0,02 µg/mL. O limite de quantificação é definido como sendo a menor concentração do fármaco em uma amostra, que pode ser determinada experimentalmente com precisão e exatidão aceitáveis sendo 0,12 µg/mL para (NFOH) e 0,19 µg/mL para (NF).

#### 4.4.4. Estabilidade de NF e NFOH

A estabilidade dos compostos foi estudada para avaliar o comportamento químico durante o tempo de armazenamento das amostras de plasma. Os resultados obtidos mostram que NF mantém estável, podendo ficar armazenado por período de 22 dias e o NFOH não pode ficar armazenado devido à sua instabilidade. Neste estudo, todos os experimentos foram realizados obedecendo estes limites.

**Tabela 14.** Estudo do tempo de congelamento (1, 2, 3, 8 e 22 dias) das amostras de plasma humano fortificadas com NF e NFOH

Concentração Adicionada (µg/mL)	Tempo de espera para análise				
	1 dia	2 dias	3 dias	8 dias	22 dias
	%recuperação* (CV,%)	%recuperação* (CV,%)	%recuperação* (CV,%)	%recuperação* (CV,%)	%recuperação* (CV,%)
<b>NF</b>					
0,50	84 (3)	82 (3)	82 (2)	80 (4)	78 (3)
4,50	98 (2)	94 (3)	92 (3)	92 (3)	91 (3)
8,00	98 (2)	98 (2)	93 (7)	85 (12)	78 (12)
<b>NFOH</b>					
0,50	98 (2)	38 (6)	24 (5)	22 (10)	18 (5)
4,50	115 (5)	79 (3)	59 (3)	50 (11)	37 (7)
8,00	98 (6)	64 (1)	55 (2)	53 (4)	47 (5)

\* média de 5 repetições

#### 4.5. Ensaio de conversão *in vitro*

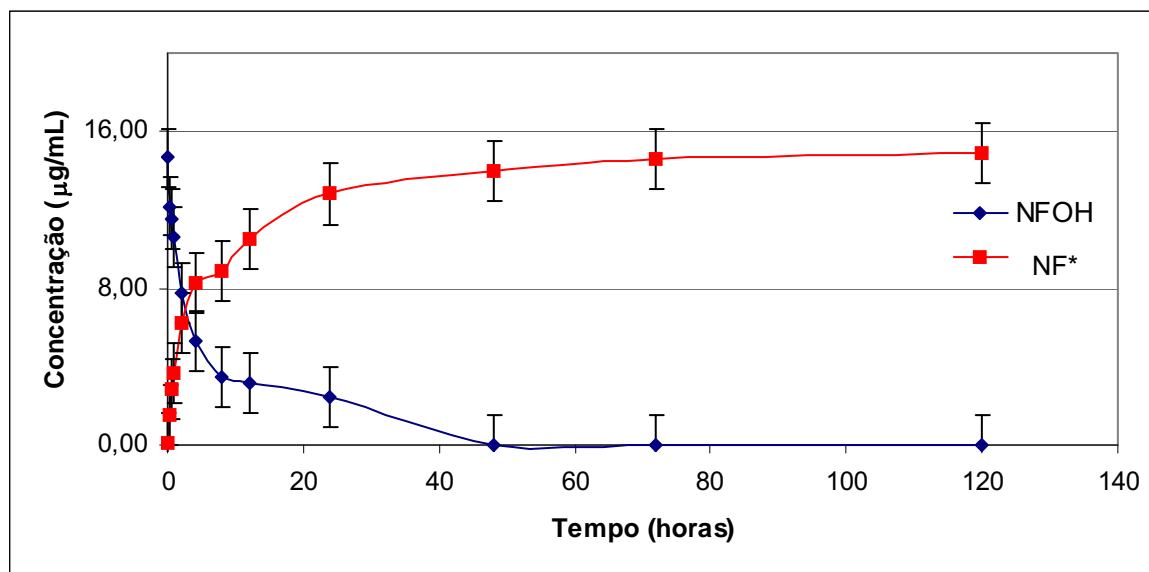
Derivados hidroximetilados, em geral, sofrem degradação *in vitro* em solução tampão (pH=1,2 e 7,4) e não apresentam suscetibilidade à conversão enzimática “*ex vivo*” (em plasma). Estes derivados apresentam estabilidade em pH ácido e, decompõem-se gradativamente com o aumento do pH (KROGSGAARD-LARSEN e BUNDGAARD, 1994).

Os resultados obtidos neste trabalho no teste de conversão *in vitro* pH 1,2 e 7,4 encontram-se nas Tabelas 15 e 16 e Figuras 54 e 55, confirmando a degradação de NFOH em NF. Entretanto, inversamente ao descrito na literatura os resultados demonstraram que o derivado NFOH apresentou maior instabilidade em pH ácido.

**Tabela 15.** Valores ( $\mu\text{g}$ ) obtidos a partir de conversão *in vitro* (pH 1,2) de 15  $\mu\text{g}$  NFOH em 120 horas

Tempo (horas)	NFOH ( $\mu\text{g}$ )	NF* ( $\mu\text{g}$ )
0	14,65 $\pm$ 1,28	0,07 $\pm$ 0,01
0,25	12,19 $\pm$ 0,10	1,51 $\pm$ 0,14
0,5	11,55 $\pm$ 0,04	2,82 $\pm$ 0,17
1	10,58 $\pm$ 0,07	3,67 $\pm$ 0,06
2	7,78 $\pm$ 0,17	6,23 $\pm$ 0,19
4	5,27 $\pm$ 0,03	8,25 $\pm$ 0,09
8	3,48 $\pm$ 0,11	8,91 $\pm$ 0,42
12	3,19 $\pm$ 0,06	10,52 $\pm$ 0,44
24	2,43 $\pm$ 0,14	12,81 $\pm$ 0,23
48	0,00	13,98 $\pm$ 0,05
72	0,00	14,59 $\pm$ 0,10
120	0,00	14,62 $\pm$ 0,02

\* NF obtido



**Figura 53.** Curvas de degradação de NFOH e a taxa de formação de NF, em solução tampão acetato de sódio (pH 1,2), a 37 °C.

Tabela 16. Ensaio de conversão *in vitro* do NFOH em pH 7,4

Tempo (horas)	NFOH( $\mu\text{g}$ )	NF*( $\mu\text{g}$ )
0	14,43 $\pm$ 0,08	0,06 $\pm$ 0,00
0,25	13,93 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,00
0,5	13,50 $\pm$ 0,05	1,17 $\pm$ 0,05
1	13,24 $\pm$ 0,02	1,40 $\pm$ 0,01
2	13,08 $\pm$ 0,01	1,43 $\pm$ 0,04
4	13,05 $\pm$ 0,00	1,45 $\pm$ 0,04
8	13,02 $\pm$ 0,00	1,62 $\pm$ 0,04
12	13,00 $\pm$ 0,00	1,75 $\pm$ 0,03
24	12,68 $\pm$ 0,13	1,97 $\pm$ 0,02
48	12,10 $\pm$ 0,05	2,47 $\pm$ 0,05
72	9,68 $\pm$ 0,04	4,61 $\pm$ 0,05
120	7,76 $\pm$ 0,02	6,39 $\pm$ 0,09

\* NF obtido

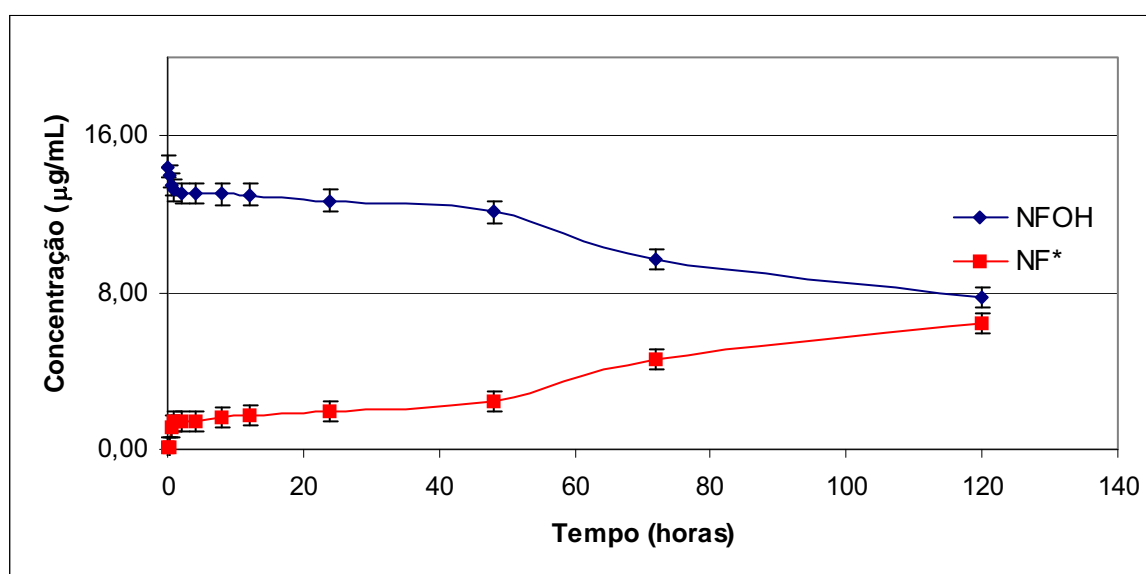
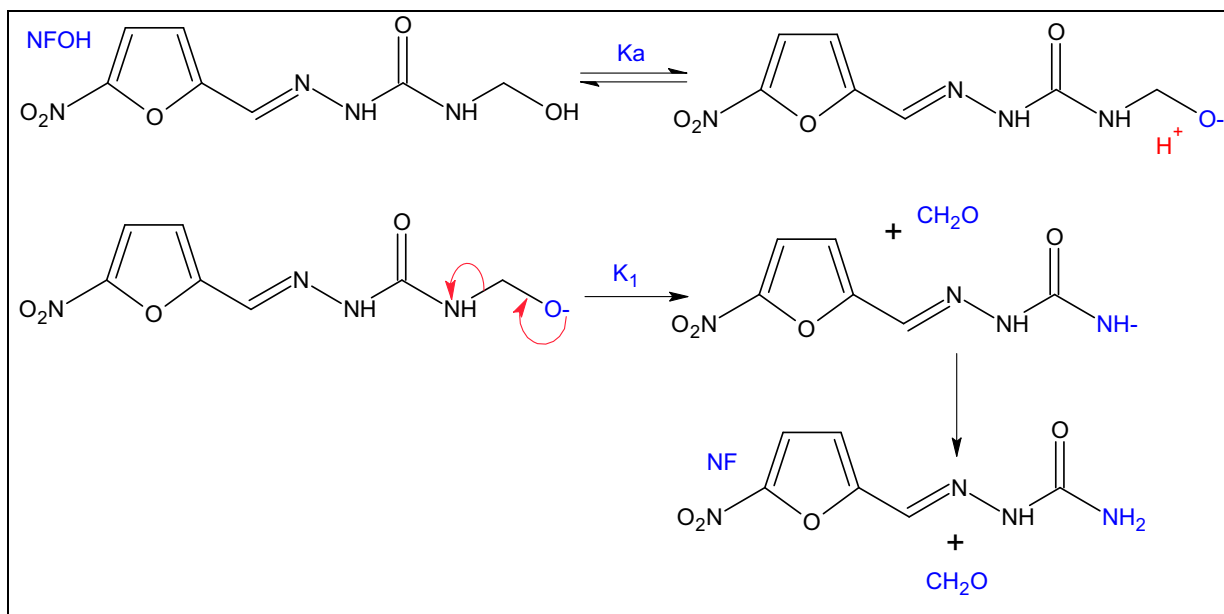


Figura 54. Curvas de degradação de NFOH e a taxa de formação de NF, em solução tampão acetato de sódio (pH 7,4), a 37 °C.



O NFOH a 37 °C se converte totalmente em NF após 48 horas, *in vitro*, em pH 1,2 e, em pH 7,4 converte 20% após 48 horas, e cerca de 50% após 120 horas.

O mecanismo para a decomposição do NFOH em NF está representado na Figura 56, a qual envolve a etapa da formação do anion “*N*-hidroximetilado” como intermediário e posterior clivagem da ligação N-C.

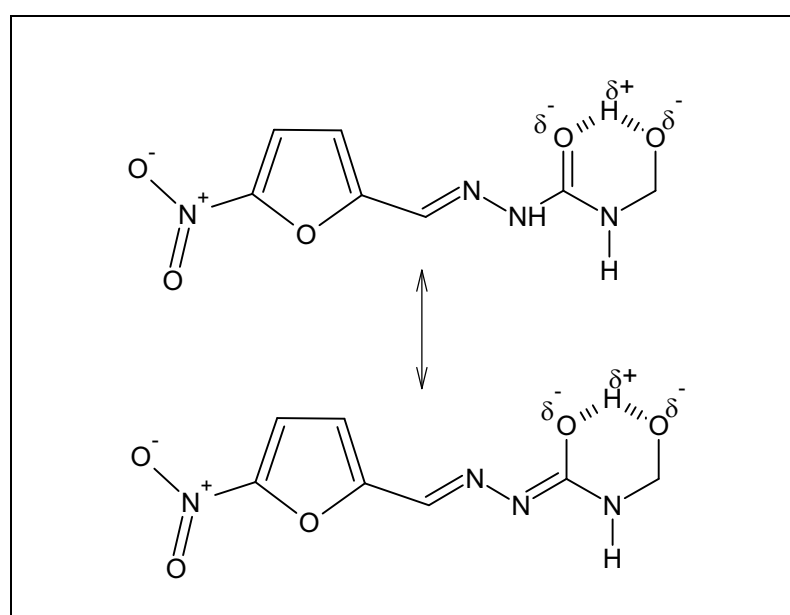


**Figura 55.** Esquema do mecanismo de decomposição de NFOH em NF em pH 7,4. (adaptado de TESTA e MAYER, 2003).

Os derivados *N*-hidroximetilados de compostos do tipo amida ou imida são mais solúveis em água do que os compostos matrizes, sugerindo uma área potencial de aplicação de pró-fármacos *N*-hidroximetilados para moléculas nitrogenadas, por exemplo, para aumentar a taxa de dissolução e conseqüentemente a biodisponibilidade oral. Substituindo uma ligação de um próton no nitrogênio por um grupo hidroximetilado, a ligação intra ou intermolecular do hidrogênio em tais moléculas pode diminuir, conduzindo à diminuição correspondente no ponto de fusão e aumentando a solubilidade em água. TESTA e MAYER (2003) verificaram que a taxa de conversão de derivados *N*-hidroximetilados de derivados de amidas e imidas é marcadamente influenciada pelo pKa da amida ou imida matriz. Para amidas ou imidas com valores de pKa < 13,1, os valores de  $t_{1/2}$  são menores que 1 hora, em pH 7,4 á 37 °C e valores menores que 10,8, a meia vida é de menos de 1 minuto. Este mesmo autor relata que este dado não é universalmente verdadeiro. Existem compostos de pKa entre 10,5-11 que fogem a esta regra, sendo muito estáveis, não-biorreversíveis.

De acordo com a literatura (O'NEIL, 2006), o nitrofural apresenta pKa 10,98, estando portanto, na faixa dos derivados hidroximetilados não biorreversíveis quimicamente. Esta estabilidade deve-se provavelmente, à formação de ponte de hidrogênio intramolecular, observada pelos valores da banda OH intramolecular no espectro de IV e pelos estudos conduzidos por GIAROLLA (2007), que realizou estudo de modelagem molecular de NFOH.

Está apresentada na Figura 57 proposta para estrutura da estabilidade do NFOH, em meio básico (formação da ponte intramolecular).



**Figura 56.** Estruturas tautoméricas propostas para o NFOH em meio básico.

No sentido de se confirmar se o composto NFOH se tratava de um novo composto (análogo) ou pró-fármaco, uma vez que mostrou ser biologicamente ativo e estável quimicamente pelos testes de conversão *in vitro*, realizaram-se os testes de metabolismo *extra-vivo* e *in vivo*.

Para os ensaios de metabolismo *in vivo* foram realizados testes em plasma de ratos para os fármacos NF e NFOH, os quais confirmaram não haver diferença significativa do plasma de rato e plasma humano (dados não mostrados). Neste caso, de acordo com Baldan e colaboradores (2007), a mesma equação da reta da curva analítica de plasma pode ser utilizada para os cálculos de hidrólise *in vivo*.

Durante o procedimento experimental de extração em plasma, ocorreu conversão de 6,36 µg de NFOH e o aparecimento de 1,03 µg de NF. Estes valores não devem ser considerados conversão ou metabolismo, mas sim como perda decorrente da metodologia experimental.

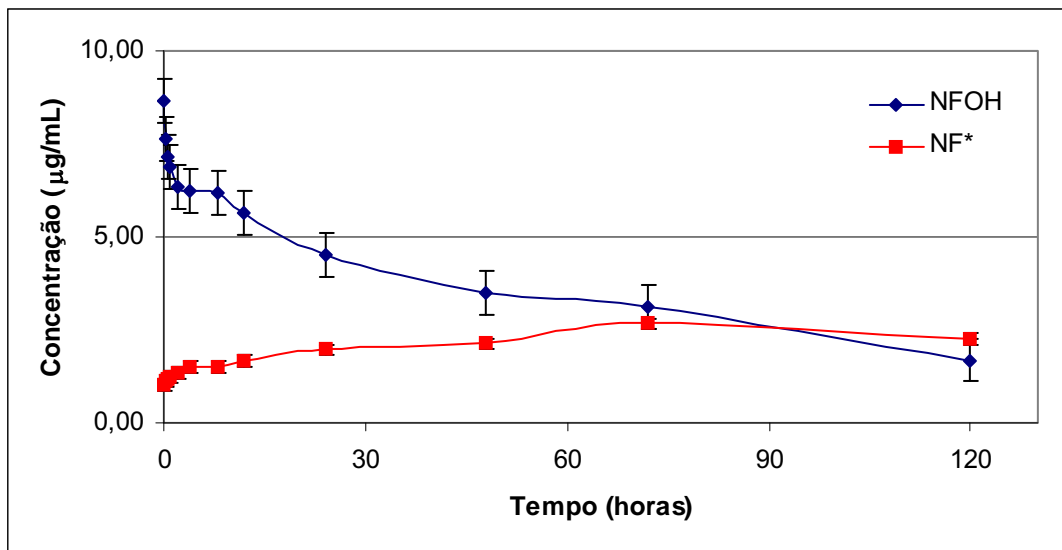
Na Tabela 17 e Figura 58 observam-se os resultados do ensaio em plasma, em que o NFOH manteve-se convertendo em NF lentamente nas primeiras 12 horas e atingindo 50% de conversão em torno de 24 horas contra 120 horas no teste *in vitro*, sugerindo a participação de enzimas plasmáticas.

**Tabela 17.** Ensaio de conversão em plasma humano do NFOH

<b>Tempo (horas)</b>	<b>NFOH (µg)</b>	<b>NF* (µg)</b>
<b>0</b>	8,64 ± 0,24	1,03 ± 0,02**
<b>0,25</b>	7,61 ± 0,24	1,13 ± 0,01
<b>0,5</b>	7,14 ± 0,06	1,21 ± 0,01
<b>1</b>	6,90 ± 0,12	1,24 ± 0,00
<b>2</b>	6,33 ± 0,04	1,35 ± 0,01
<b>4</b>	6,25 ± 0,05	1,50 ± 0,00
<b>8</b>	6,17 ± 0,06	1,52 ± 0,01
<b>12</b>	5,62 ± 0,07	1,66 ± 0,00
<b>24</b>	4,51 ± 0,09	1,97 ± 0,00
<b>48</b>	3,51 ± 2,09	2,13 ± 1,13
<b>72</b>	3,13 ± 1,87	2,67 ± 1,44
<b>120</b>	1,69 ± 1,04	2,25 ± 1,19

\*NF obtido

\*\*NF obtido decorrente à conversão durante o procedimento experimental.



**Figura 57.** Curvas de degradação de NFOH e a taxa de formação de NF em plasma humano (pH 7,4) a 37°C.

Diante destes resultados, foi necessário a realização de ensaios *in vivo*, no sentido de se obter informações sobre a influência de outros sistemas enzimáticos, além do plasmático, na degradação de NFOH.

Além disso, os guias para avaliação pré-clínica de fármacos, publicados pelo Center for Drug Evaluation and Research (CDER), recomendam que os estudos de toxicidade (ou efeitos tóxicos) incluam a avaliação da farmacocinética.

Estão estabelecidos pelo Food and Drug Administration (FDA) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) protocolos para o desenvolvimento de estudos em farmacocinética, que são estabelecidos a partir das características de cada fármaco e sua utilização na terapêutica.

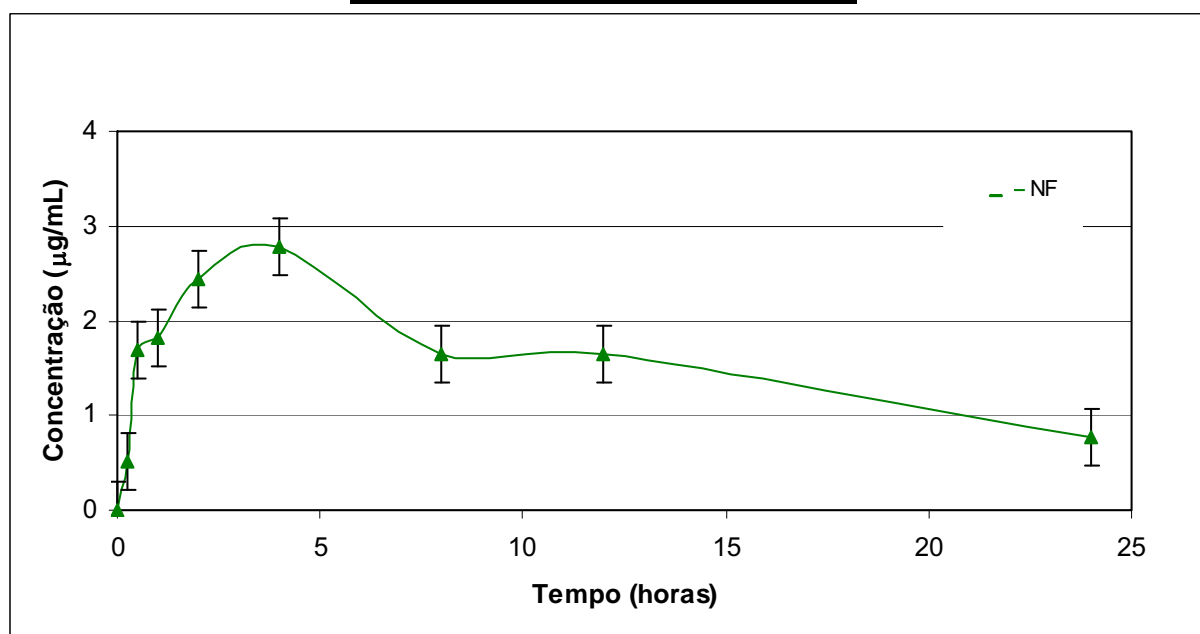
Segundo o Guidance for Industry “Exposure-Response Relationships – Study Design, Data Analysis and Regulatory Applications” (FDA, 2003), a área sob a curva/ (AUC) é um parâmetro utilizado para representar a média da exposição durante um intervalo de tempo e freqüentemente relacionado aos efeitos a longo prazo e o pico plasmático (Cmax) de grande importância para a correlação com o efeito tóxico. Ainda, de acordo com as informações do referido guia, existe uma grande variabilidade no tempo em que a concentração máxima (Cmax) ocorre, sendo necessário estreitamento no tempo de coleta durante o período provável de sua ocorrência, de tal forma que a concentração plasmática máxima determinada seja o

mais próximo possível do valor real. Por essa razão foram realizadas 3 coletas na primeira hora após a administração de NFOH.

A Tabela 18 e a Figura 59 representam os resultados obtidos pela administração de NF, composto matriz, utilizado como controle para estudo farmacocinético de NFOH.

**Tabela 18.** Perfil Farmacocinético *in vivo* do NF

Tempo (horas)	NF ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	0
0,25	$0,51 \pm 0,11$
0,5	$1,68 \pm 0,29$
1	$1,82 \pm 0,27$
2	$2,43 \pm 0,47$
4	$2,78 \pm 0,59$
8	$1,65 \pm 0,36$
12	$1,64 \pm 0,26$
24	$0,76 \pm 0,17$



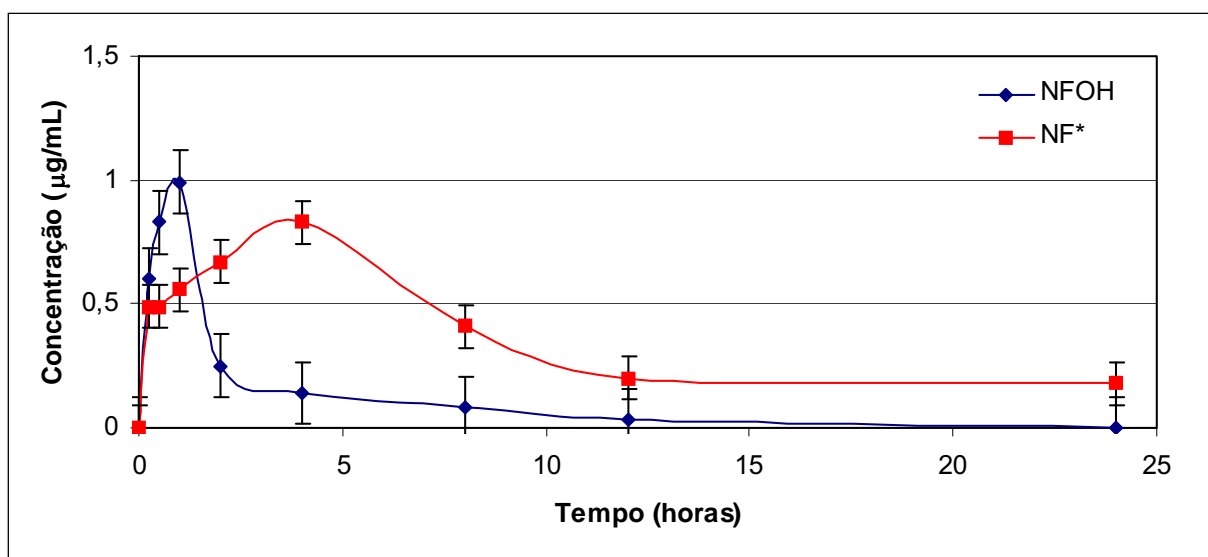
**Figura 58.** Perfil farmacocinético *in vivo* do NF.

Os resultados obtidos com o teste *in vivo* com NFOH nas diferentes concentrações, estão apresentados na Tabela 19, o gráfico tempo/concentração na Figura 60.

**Tabela 19.** Perfil Farmacocinético *in vivo* do NFOH e NF obtido da biotransformação do NFOH.

Tempo (horas)	NFOH ( $\mu\text{g}$ )	NF* ( $\mu\text{g}$ )
0	0	0
0,25	$0,60 \pm 0,07$	$0,49 \pm 0,03$
0,5	$0,83 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,08$
1	$0,99 \pm 0,21$	$0,56 \pm 0,05$
2	$0,25 \pm 0,05$	$0,67 \pm 0,14$
4	$0,14 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,04$
8	$0,08 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,03$
12	$0,03 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$
24	0	$0,18 \pm 0$

\*NF obtido

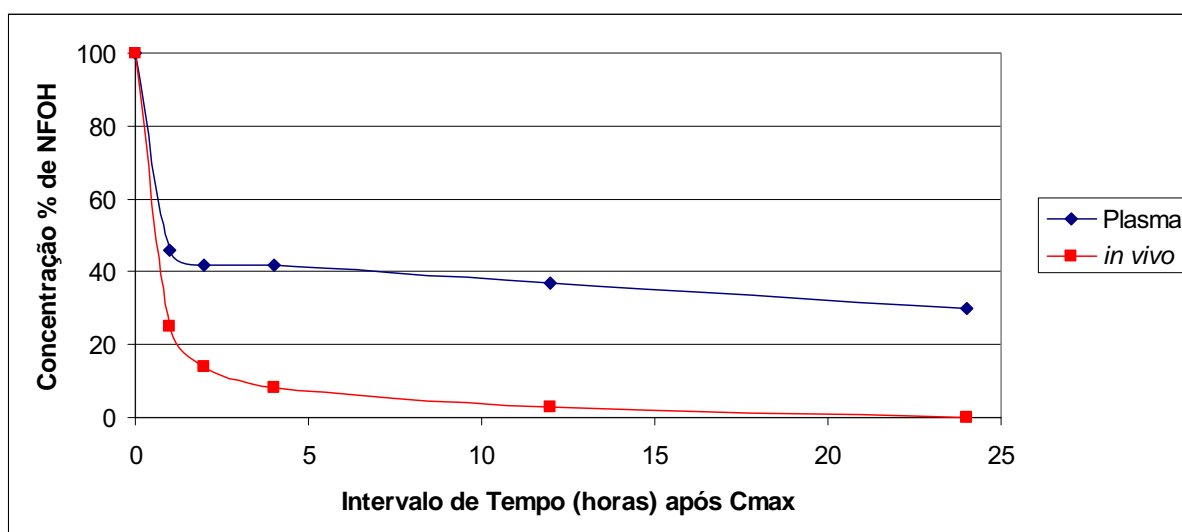


**Figura 59.** Perfil farmacocinético *in vivo* do NFOH.

A Figura 61 e Tabela 20 mostram claramente que o perfil de conversão do NFOH em NF no plasma, após atingir  $C_{\max}$  é diferente do obtido *in vivo*, sugerindo a participação de outro sistema na metabolização do NFOH, quando o mesmo é administrado no animal. Desta forma, o NFOH apresenta, conforme a literatura, a estabilidade química, mas contrariamente ao esperado, sofre metabolismo plasmático e enzimático (fígado), confirmando ser um pró-fármaco.

**Tabela 20.** Valores de % de NFOH ( plasma e *in vivo*) e tempo (horas)

Tempo	% de NFOH no meio	
	Plasma	In Vivo
0	100	100
1	46	25
2	42	14
4	42	8
12	37	3
24	30	0



**Figura 60.** Estudo comparativo das conversões do NFOH em NF, após  $C_{\max}$  em plasma humano e *in vivo*.

Os parâmetros farmacocinéticos (Tabela 21) foram calculados como valores necessários para posterior avaliação e estudo de esquema de dose.

**Tabela 21.** Parâmetros farmacocinéticos após administração de dose única oral de NF e NFOH (200 mg/kg) em ratos Wistar (n=5)

Parâmetros	NFOH	NF*	NF
C <sub>máx</sub> (µg/mL)	0,99	0,83	2,78
T <sub>máx</sub> (h)	1,00	4,00	4,00
Kel(h <sup>-1</sup> )	0,099	0,231	0,178
t <sub>1/2β</sub> (h)	7,00	3,00	3,9
Cl/f (L/h.kg)	33,41	-	3,140
Vd/f (L/kg)	337,5	-	17,64
AUC 0-12 (µg/mL.h)	5,683	13,36	54,49
AUC 0-∞ (µg/mL.h)	5,986	14,23	63,70

\*NF obtido

O coeficiente de partição [*n*-Octanol/Água] (P) é um parâmetro freqüentemente usado em estudos de QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) como medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos (LIMA, 2006). Pela regra de Lipinsky (1997), os valores ótimos para compostos candidatos a fármacos devem possuir massa molecular abaixo de 500 e log P < 5.

A introdução do grupo hidroximetil no NF promove um aumento na hidrossolubilidade da molécula, conforme os testes de solubilidade (Tabela 6) e valores obtidos de P e log P calculados pelo método de fragmentação (GHOSE e CRIPPEN, 1987) utilizando programa Chem Draw Ultra 8.0:

**NF:** P = 0,316; log P = - 0,50

**NFOH:** P = 0,093; log P = -1,05.

Estes dados apenas sugerem a alteração, devendo posteriormente ser realizado experimentalmente. Muito provavelmente, é este aumento na hidrossolubilidade, o responsável pela alteração dos valores dos parâmetros farmacocinéticos, conforme podemos observar pela Tabela 21.

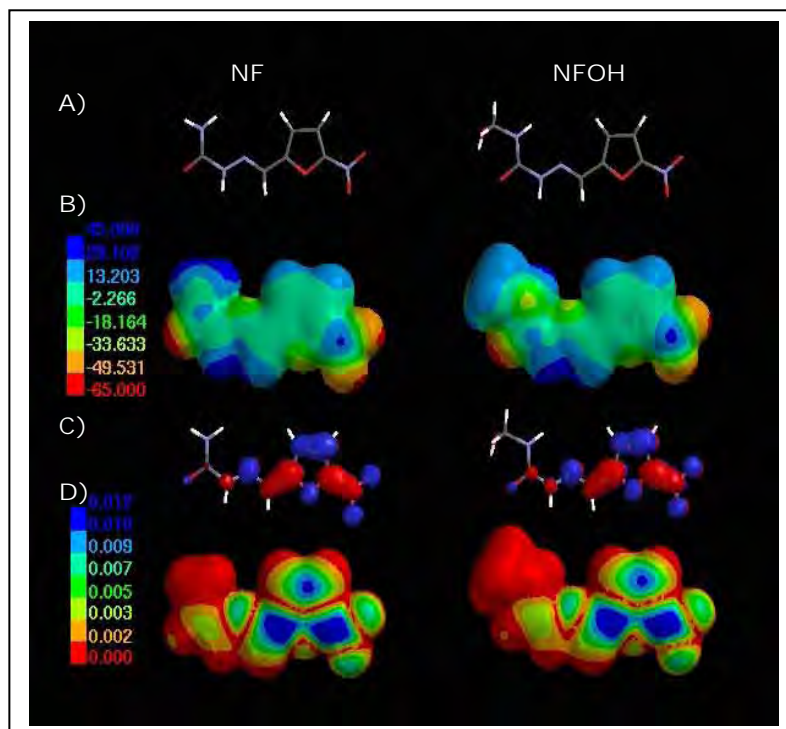


O NFOH atinge um T<sub>máx</sub> em 1 hora contra 4 horas do NF, sugerindo uma absorção mais rápida para o NFOH. Os valores de C<sub>máx</sub> mostram que a concentração máxima de NFOH no plasma é de 0,99 µg/mL contra 2,78 µg/mL do NF, mas o volume de distribuição (V<sub>d</sub>) para o NFOH é de 337,5 L/kg contra 17,64 L/kg do NF. Estes dados indicam 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. Estes dados podem explicar a melhor atividade quanto maior a distribuição e maior especificidade do NFOH em relação à molécula matriz.

Além disso, o metabólito ativo NF obtido pela hidrólise de NFOH *in vivo*, mostra que a concentração de NF é cerca de 4 vezes menor (C<sub>max</sub> = 0,83 µg/mL, AUC 0-12 = 5,683 µg/mL.h ) que o administrado (C<sub>max</sub> = 2,78 µg/mL, AUC 0-12 = 54,49 µg/mL.h ). Estes dados sugerem que a toxicidade (mutagenicidade) observada por Guido e colaboradores (2001) pode estar relacionada apenas ao NF e não ao NFOH (mutagenicidade 4 vezes inferior ao observado com NF).

Os resultados farmacocinéticos sugerem, inicialmente, que o NFOH é um pró-fármaco. Entretanto, os trabalhos de Barbosa e colaboradores (2007) demonstram que o NFOH apresenta atividade inibitória no processamento de RNA mensageiro de *T.cruzi* (cepa Y, NCS e BOL) superior ao NF, sendo este teste realizado em apenas 20 minutos, tempo insuficiente para que ocorresse conversão total de NFOH em NF (lembrando que o pró-fármaco é inativo *per se*). Desta forma, o NFOH poderá estar agindo por si só e pela ação do seu metabolismo, sendo portanto, um composto com atividade mista (análogo e pró-fármaco).

Corroborando esta hipótese, Trossini e colaboradores (2006) observaram a inibição *in vitro* de cruzipaina, enzima importante no metabolismo do *T.cruzi*, pelo NFOH (60%), atividade esta, superior ao seu metabólito NF (30%). A Figura 61 mostra a energia mínima dos confôrmeros de NF e de NFOH. O mapa da superfície eletrônica indica um ataque nucleofílico favorável ao Cys-25 da cruzipaina para o grupo carbonílico de NFOH devido à sua baixa densidade eletrônica em comparação ao NF.



**Figura 61.** Energia mínima dos confôrmeros de NF e de NFOH (fase gasosa): A) modelo de tubo; B) MEPS (nível discreto) na faixa de  $-65$  (vermelho intenso) a  $30$  (azul intenso) kcal/mol ( $0.002$  e/au<sup>3</sup>); C) distribuição do orbital LUMO ( $0.032$  eV); D) Mapa de LUMO (nível discreto) ( $0.000$  (vermelho) para  $0.012$  (azul) kcal/mol). Cor dos átomos: C (cinza), O (vermelho), N (azul) and H (branco) (Trossini et al, 2006).

Estes dados de inibição de cruzipaina (efeito de NFOH 100% superior em relação ao NF), pode ser responsável pela atividade biológica do NFOH observada por Chung (1996), que foi 100% superior na inibição de tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* em comparação com NF.

Ao contrário dos hidroximetilados, os quais são, geralmente instáveis e quando não, são pró-fármacos, o NFOH através dos estudos realizados aliado à estabilidade química favorecida pela sua estrutura, torna-se um candidato a fármaco antichagásico para os estudos clínicos.

## 5. CONCLUSÕES

- ✓ O NFOH foi obtido com rendimento de 65% e, sua estrutura caracterizada e confirmada por RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{C}^{13}$  e DEPT.
- ✓ O NFOH é mais estável quimicamente em pH 7,4 (37 °C), o qual favorece, provavelmente, a conversão em NF. 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.
- ✓ No desenvolvimento do procedimento analítico em matriz de plasma, o controle do pH (pH =10) é determinante para a eficiência da extração do NFOH e NF (separação dos interferentes).
- ✓ A eficiência da metodologia foi demonstrada pelos adequados parâmetros de validação obtidos, possibilitando sua aplicação em estudos farmacocinéticos: intervalo linear, exatidão, (recuperação entre 86 a 98% para NF e NFOH), precisão (CV 1 a 13 % para NF e NFOH), LD e LQ,
- ✓ Os ensaios de estabilidade em plasma congelado mostraram que o NF se mantém estável até 22 dias (limite do teste), enquanto o NFOH, mesmo em baixas temperaturas, é decompõe-se a partir do segundo dia. Estes dados demonstram que as amostras de plasma, fortificadas com NFOH, devem ser preparadas no dia da realização do experimento.
- ✓ Os ensaios *in vitro* mostraram que em plasma humano, o NFOH é metabolizado por enzimas plasmáticas (50% é convertido a NF após 24 horas/37 °C), enquanto em solução tampão o tempo de conversão é de 120 horas
- ✓ O comportamento de estabilidade *in vitro* do NFOH em ratos Wistar é similar ao de plasma humano.
- ✓ Os ensaios *in vivo*, sugerem a participação de outro sistema no metabolismo do NFOH, muito provavelmente, do sistema hepático, pois após 1 hora é alcançada a concentração máxima plasmática (hidrólise de 75% do NFOH e de 54% no teste em plasma). Os dados *in vivo* demonstram que o NFOH atinge um  $T_{\text{máx}}$  em 1 hora contra 4 horas do NF, sugerindo uma absorção mais rápida para o NFOH.

- ✓ Os valores de  $C_{\text{máx}}$  mostram que a concentração máxima de NFOH no plasma é de 0,99 ug/mL e de 2,78 do NF.
- ✓ O volume de distribuição ( $V_d$ ) para o NFOH é de 337,5 e de 17,64 do NF. Estes dados indicam 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.
- ✓ Segundo os dados de Guido e colaboradores (2001), a mutagenicidade de NFOH mostrou ser quatro vezes menor do que a do NF. Dado que o metabólito ativo NF, obtido pela conversão de NFOH *in vivo*, apresenta concentração cerca de 4 vezes menor ( $C_{\text{max}} = 0,83$  ug/mL) em relação ao administrado ( $C_{\text{max}} = 2,78$  ug/mL), estes dados sugerem que a mutagenicidade pode estar relacionada apenas com o metabólito ativo NF.
- ✓ De acordo com os testes de Barbosa e colaboradores (2007), o RNAm de *T.cruzi* é inibido pelo NFOH em 20 minutos, tempo insuficiente para a hidrólise de NFOH em NF. Além disso, Trossini e colaboradores (2007) observaram que o NFOH inibe a cruzipaina, enzima do metabolismo de *T.cruzi*. Uma vez que o pró-fármaco é inativo *per se*, apresentando atividade através de seu metabólito, estes dados sugerem que o NFOH não é um pró-fármaco, mas sim, um composto com atividade híbrida (agindo como análogo e pró-fármaco), com vida-média de 7 horas e seu metabólito (NF), também ativo, com vida-média de 3 horas.

## REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos; revoga a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Disponível em <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>> Acesso em: 29 maio 2006.

AGUILAR, H. M.; ABAD-FRANCH, F.; DIAS, J. C. P.; JUNQUEIRA, A. C. V.; COURA, J. R. Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 47-55, 2007. Suplemento.

AGUIRRE, G. L.; BOIANI, L.; BOIANI, M.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; PORCAL, W.; DENICOLA, A.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; SAN'ANNA, C. M. R.; BARREIRO, E. J. New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Quantitative structure-activity relationship studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 6336-6346, 2005.

AGUIRRE, G.; BOIANI, M.; CABRERA, E.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; DENICOLA, A.; SANT'ANNA, C. M. R.; BARREIRO, E. J. New potent 5-nitrofuryl derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. 3D-QSAR (CoMFA) studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 457-466, 2006.

AGUSTÍ, R.; PARÍS, G.; RATIER, L.; FRASCH, A. C. C.; LEDERKREMER, R. M. Lactose derivatives are inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity toward conventional substrates *in vitro* and *in vivo*. **Glycobiology**, v. 14, n. 7, p. 659-670, 2004.

ALEJANDRE-DURAN, E.; CLARAMUNT, R. M.; SANZ, D.; VILAPLANA, M. J.; MOLINA, P.; PUEYO, C. Study on the mutagenicity of nifurtimox and eight derivatives with the L-arabinose resistance test of *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research**, v. 206, n. 2, p. 193-200, 1988.

AMBRÓSIO, D. L.; BARBOSA, C. F.; VIANNA, V. F.; CICARELLI, R. M. B. *Trypanosoma cruzi*: establishment of permeable cells for RNA processing analysis with drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 617-620, oct. 2004.

ANANDAN, J. V. Parasitic disease. In: DIPIRO, J. T. (Ed.). **Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach**. 3rd ed. London: Appleton & Lange, 1997. p. 2161-2172.

- 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.
- ANNINO, J. S.; GIESE, R. W. **Química clínica: princípios e métodos**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1978. p. 39-42.
- ATHANI, A. V.; MAKOID, M. C.; BANAKAR, U. V. Issues in contemporary drug delivery. Part III: pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling. **Journal of Pharmacy Technology**, v. 6, p. 337-503, 1990.
- BAGSHAW, K. D.; SHARMA, S. K.; SPRINGER, C. J.; ROGER, G. T. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). A review of some theoretical, experimental and clinical aspects. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 5, n. 10, p. 879-891, 1994.
- BALAÑA-FOUCE, R.; REDONDO, C. M.; PERTEJO, Y. P.; GONZÁLEZ, R. D.; REGUERA, R. M. Targeting atypical trypanosomatid DNA topoisomerase I. **Drug Discovery Today**, v.11, n. 15/16, p. 733-740, 2006.
- BALDAN, H. M.; DE ROSA, H. J.; BRUNETTI, I. L.; XIMENES, V. F.; MACHADO, R. G. P. The effect of rifampicin and pyrazinamide on isoniazid pharmacokinetics in rats. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 28, p. 409-413, 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**. Porto Alegre: ARTMED, 2001.
- 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.
- BECKER, K.; SAVVIDES, S. N.; KEESE, M.; SCHIRMER, R. H.; KARPLUS, P. A. Enzyme inactivation through sulfhydryl oxidation by physiologic NO-carriers. **Natural Structural & Molecular Biology**, v. 5, n. 4, p. 267-271, 1998. Disponível em:

<<http://www.nature.com/nsmb/journal/v5/n4/pdf/nsb0498-267.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2006.

BJORNSSON, T. D. Practical uses of individual pharmacokinetic parameters in drug development and clinical practice: examples and simulations. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 22, n. 1, p. 1-14, 1997.

BLUMENSTIEL, K.; SCHÖNECK, R.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Nitrofurantoin drugs as common substrate substrates of *Trypanosoma cruzi* lipamide dehydrogenase and Trypanothione Reductase. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 11, p. 1791-1799, 1999.

BÖHM, H. J. Ligand design. In: KUBINYI, H. **3D QSAR in Drug Design: theory, methods and applications**. Leiden: ESCOM, 1993. p. 386-405.

BÖHM, H. J.; BOERINGER, M.; BUR, D.; GMUENDER, H.; HUBER, W.; KLAUS, W.; KOSTREWA, D.; KUEHNE, H.; LUEBBERS, T.; MEUNIERKELLER, N.; MUELLER, F. Novel inhibitors of DNA gyrase: 3D structure based biased needle screening, hit validation by biophysical methods, and 3D guided optimization: a promising alternative to random screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2664-2674, 2000.

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.

BOROUJERDI, M. **Pharmacokinetics: principles and applications**. Bourne: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2002. p. 51-72.

BRENER, Z.; CANÇADO, J. R. Terapêutica. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 362-424.

BRITO, M. N.; AMARANTE, P. J.; POLESSE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUCKNER, F.; YOKOYAMA, K.; LOCKMAN, J.; AIKENHEAD.; OHKANDA, J.; SADILEK, M.; SEBTI, S.; VOORHIS, W. V.; HAMILTON, A.; GELB, M. A class of

sterol 14-demethylase inhibitor as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 25, p. 15149-15153, 2003.

BUNDGAARD, H. (Ed.). **Design of produgs**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 360.

BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. **Drugs of the Future**, v. 16, n. 5, p. 443-458, 1991.

BUNDGAARD, H.; JOHANSEN, M. Pro-drugs as drug delivery systems VIII. Bioreversible derivatization of hydantoins by N-hydroxymethylation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 5, n. 1, p. 67-77, 1980.

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.

CARVALHO, M. E.; SILVA, R. A.; BARATA, J. M. S.; DOMINGOS, M. F.; CIARAVOLO, R. M. C.; ZACHARIAS, F. Soroepidemiologia da tripanosomíase americana na região do litoral sul. **Revista Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p.49-58, 2003.

CAZZULO, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 11, p. 1261-1271, 2002.

CAZZULO, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. **Medicinal Chemistry Reviews**, v. 2, n. 6, p. 495-504, 2005.

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.

CAZZULO, J. J.; COUSO, R.; RAIMONDI, A.; WERNSTEDT, C.; HELLMAN, H. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 1, p. 33-41, 1989.



CHANG, K. H. **Avaliação da bioequivalência de comprimidos contendo hidroclorotiazida**. 2002. 188 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CHENA, M. A.; JIMÉNEZ, S. E.; PÁEZ, L. R.; TORRES, B. N.; RAMÍREZ, I. B.; RAMÍREZ, C. W. *Trypanosoma cruzi*: Inhibition of  $\alpha$ -hydroxyacid Dehydrogenase Isozyme II by N-allyl and N-propyl oxamates and their Effects on Intact Epimastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 831-837, 2004.

CHIU, J. A.; FRANKLIN, R. B. Analysis and pharmacokinetics of olanzapine (LY170053) and two metabolites in rat plasma using reversed-phase HPLC with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 5, p. 609-615, 1996.

CHRISTOPHE, L. M. J.; VERLINDE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; GILMORE, L. A. F.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G. J.; MICHELS, P. A. M. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drug. **Drug Resistance Updates**, v. 4, n. 1, p. 50-65, 2001.

CHUNG, M. C. **Planejamento e sínteses de pró-fármacos recíprocos derivados de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos**. 1995. 196 f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

CHUNG, M. C. Antichagásicos. In: BARREIRO, E. J.; FERREIRA, E. I. (Org.). **Fundamentos de química farmacêutica**. São Paulo: Atheneu, 2008. No prelo.

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

CHUNG, M. C.; GUIDO, R. V. C.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. F.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K. C. A.; VARANDA, E. A.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T. M.; FERREIRA, E. I. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4779-4783, 2003.

CHUNG, M. C.; SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F. et al. Latentiation and advanced drug transport forms. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 155-180, 2005.

CLARKE, E. G. C. **CLARKE'S isolation and identification of drugs:** in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. 2nd ed. London: The Pharmaceutical, 1986.

CONSULTA técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 512-514, 2006.

COSTA, F.; FRANCHIM, G.; PEREIRA-CHICCOLA, V. L.; RIBEIRÃO, M.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M. M. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Vaccine**, v. 16, n. 8, p. 768-774, 1998.

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.

CRENSHAW, C. A.; GLANGES, E.; STUART, B. H. Nitrofurazone therapy in middle burns – review. **Current Therapeutic Research-Clinical and Experimental**, v. 19, n. 4, p. 487-492, 1976.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508-512, 2005.

CRUZ, M. L. **Preparação e análise estrutural de iminas derivadas de dextrano oxidados e antimaláricos.** 1995. 236 f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

DEBNATH, A. K.; HANSCH, C.; KIM, K. H.; MARTIN, Y. C. Mechanistic interpretation of the genotoxicity of nitrofurans (antibacterial agents) using quantitative structure-activity relationships and comparative molecular field analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1007-1016, 1993.

DIAS, J. C. Doença de Chagas: epidemiologia e prevenção. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 63, n. 5, p. 451-455, 1994.

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

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. ***Trypanosoma cruzi.*** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 48-74.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, p. 165-169, 2001. Suplemento.

DIAS, J. C. P.; JATENE, A. D. Doença de Chagas no Brasil: situação atual e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, p. 6-8, 1992. Suplemento 3.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 103-121, 1999. Suplemento 1.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Free radical metabolism of anti-parasitic agents. **Federation Proceedings**, v. 45, p. 2471-2476, 1986.

DODD, M. C.; STILLMAN, W. B. The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 1, p. 11-18, 1944.

DORIGUETTO, A. C.; SILVA, C. H. T. P.; ELLENA, J.; TROSSINI, G. H. G.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. 5-Nitro-2-furaldehyde N-(hydroxymethyl)-semicarbazone. **Acta Crystallographica**, v. 61, n. 7, p. 2099-2101, 2005.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INICIATIVE. **DNDI Chagas' disease portfolio, 2H2006**: 5 Projects. 2006. Disponível em: <[www.dndi.org/cms/public\\_html/insidearticleListing.asp?categoryid=149&articleid=205&templateid=1](http://www.dndi.org/cms/public_html/insidearticleListing.asp?categoryid=149&articleid=205&templateid=1)>. Acesso em: 25 nov. 2006.

DRUMOND, J. A. G.; MARCOPITO, L. F. Migração interna e a distribuição da mortalidade por doença de Chagas, Brasil, 1981/1998. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n.10, p. 2131-2140, 2006.

DUTHIE, M. S.; CETRON, M. S.; VAN VOORHIS, W. C.; KAHN, S. J. *Trypanosoma cruzi*-infected individuals demonstrate varied antibody responses to a panel of trans-sialidase proteins encoded by SA85-1 genes. **Acta Tropica**, v. 93, n. 3, p. 317-329, 2005 .

EDWARDS, D. I. DNA binding and nicking agents. In: HANSCH, C.; SAMMES, P. G.; TAYLOR, J. B. (Ed.). **Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compound**. Oxford: Pergamon, 1990. v. 2, p. 725-751.

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

ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 2393-2404, 2004.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Identification of a novel, thiol-containing cofactor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. **Molecular and Biochemistry Parasitology**, v. 14, p. 187-198, 1985.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Ed. USP, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: exposure-response relationships, study design, data analysis, and regulatory applications**. Rockville, MD, 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Acesso em: 12 abr. 2006.

FREIRE, E. F.; MIRANDA, J. L.; MAIA, P. P.; VIEIRA, E. P.; BORGES, K. B.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Diazepam e Nordiazepam em plasma: métodos de extração líquido-líquido e em fase sólida no pré-tratamento de amostras para análise cromatográfica em fase líquida. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 773-776, 2005.

FREYMAN, D. M.; WENCK, M. A.; ENGEL, J. C.; FENG, J.; FOCIA, P. J.; EACKIN, A. E.; CRAIG, S. P. Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of inhibitors of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. **Chemistry and Biology**, v. 7, p. 957-968, 2000.

FRIIS, G. J.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORDS, T.; MADSEN, U. A. **A textbook of drugs design and development**. 2nd ed. Harwood: Academic Publishers, 1996. p. 351-385.

FUJITA, T. The extrathermodynamic approach to drug design, In: HANSCH, C.; SAMMES, P. G.; TAYLOR, J. B. (Ed.). **Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds**. Oxford: Pergamon, 1990. v. 4, p. 497-560.

GAJEWSKA, J.; SZCZYPKA, M.; TUDEK, B.; SZYMCZYK, T. Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity on nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone. **Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 232, n. 2, p. 191-197, 1990.

GHOSE, A. K.; CRIPPEN, G. M. Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. **Journal of Chemistry Information and Computer Science**, v. 27, p. 21-35, 1987.

GIAROLLA, J. **Pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofurural potencialmente antichagásicos: estudo de condições sintéticas para a primeira geração**. 2007. 155 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GOLDBAUM, 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.

GORDON, E. M.; KERWIN JR., J. F. (Ed.). **Combinatorial chemistry and molecular diversity in drug discovery**. New York: Wiley-Liss, 1998.

GÜIDO, R. V. C.; FERREIRA, E. I.; NASSUTE, J. C.; VARANDA, E. A.; CHUNG, M. C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofurural (nitrofurazona). **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 22, n. 2, p. 319-333, 2001.

HAN, H. K.; AMIDON, G. L. Targeted prodrug design to optimized drug delivery. **AAPS Pharmaceutical Science**, v. 2, p. E6, 2000.

HANSCH, C.; FUJITA, T. Analysis: a method for correlation of biological activity and chemical structure. **Journal of American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1616-1626, 1964.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman**: as bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2004. p. 955-961.

HARKIOLAKI, M.; DODSON, E. J.; BERNIER-VILLAMOR, V.; TURKENBURG, J. P.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D.; WILSON, K. S. The crystal structure of *Trypanosoma Cruzi* dUTPase reveals a novel dUTP/ dUDP binding fold. **Structure**, v. 12, n. 1, p. 41-53, 2004.

HASEGAWA, T.; KAWAGUCHI, T. Future of prodrugs in antiviral therapy. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 27, n. 5, p. 331-336, 1994.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 15, 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.

HUDYMA, T. W.; BUSH, K.; COLSON, T. L.; FIRESTONE, R. A.; KING, H. D. Synthesis and release of doxorubicin from a cephalosporin based prodrug by a  $\beta$ -lactamase-immunoconjugate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 2, p. 323-328, 1993.

IRIBARNE, F.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; AGUILERA, S.; TAPIA, O.; PAULINO, M. Interaction energies of nitrofurans with trypanothione reductase and glutathione reductase studied by molecular docking. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 818, n. 1/3, p. 7-22, 2007.

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

JOCKERS-SCHRÜBL, M. C.; SCHIMER, R. H.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. **European Journal of Biochemistry**, v. 180, n. 2, p. 267-272, 1989.

JOLLES, G.; WOOLDRIDGE, K. R. H. **Drug design**: fact or fantasy? New York: Academic Press, 1984. 268 p.

KLEBE, G.; ABRAHAM, U. Comparative molecular similarity index analysis (CoMSIA) to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 13, n. 1, p. 1-10, jan. 1999.

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

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

KOROLKOVAS, A. **Essentials of medicinal chemistry**. 2nd ed. New York: Wiley, 1988. 1204 p.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; INHOFF, O. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. **Parasitology Research**, v. 90, p. S77-S85, 2003. Supplement 2.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; SCHIRMER, R. H.; BAUER, H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in Trypanosomes and Malaria-causing plasmodia. **Angewandte Chemie International**, v. 44, n. 5, p. 690-715. 2005.

KROGSGAARD - LARSEN, P.; BUNDGAARD, H. **A textbook of drug design and development**. 14th ed. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1994. 643 p.

KUBINYI, H. QSAR: hansch analysis and related approaches. In: MANNHOLD, R.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; TIMMERMAN, H. (Ed.). **Methods and principles in medicinal chemistry**. Weinheim: VHC, 1993a. v. 1.

KUBINYI, H. (Ed.). **3D QSAR in drug design: theory, methods and applications**. Leiden: ESCOM, 1993b.

KUBINYI, H. Strategies and recent technologies in drug discovery. **Pharmazie**, v. 50, p. 647-662, 1995a.

KUBINYI, H. The quantitative analysis of structure-activity relationships. In: WOLFF, M. E. (Ed.). **Burge's medicinal chemistry**. 5th ed. New York: Wiley, 1995b. v. 1, p. 497-571.

KUBINYI, H. Similarity and dissimilarity: a medicinal chemist's view. **Perspectives in Drug Discovery Design**, v. 9-11, p. 225-252, 1998a.

KUBINYI, H. Combinatorial and computational approaches in structure-based drug design. **Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 1, p. 16-27, 1998b.

KUBINYI, H. Structure-based design of enzyme inhibitors and receptor ligands. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 1, n. 1, p. 4-15, 1998c.

KUBINYI, H.; HAMPRECHT, F. A.; MIETZNER, T. Three-dimensional quantitative similarity-activity relationships (3D-QSiAR) from SEAL similarity matrices. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 14, p. 2553-2564, 1998.

LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida 'no tubo e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

LARSEN, S. W.; SIDENIUS M.; ANKERSEN, M.; LARSEN, C. Kinetics of degradation of 4-imidazolidinone prodrug types obtained from reacting prilocaine with formaldehyde and acetaldehyde. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 2, p. 233-240, 2003.

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.

LE LAMER, S.; CROS, G.; PINOL, C.; FERNÁNDEZ-ALVAREZ, J.; BRESSOLE, F. An application of population kinetics analysis to estimate pharmacokinetic parameters of sodium tungstate after multiple-dose during preclinical studies in rats. **Pharmacology & Toxicology**, v. 90, n. 2, p. 100-105, 2002.



LEITE, F. **Validação em análise química**. 4.ed. Campinas: Átomo, 2002.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 72-78, 2006.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1/3, p. 3-26, Jan. 1997.

LIU, J.; PAN, D.; TSENG, Y.; HOPFINGER, A.J. 4D-QSAR analysis of a series of antifungal P450 inhibitors and 3D-pharmacophore comparisons as a function of alignment. **Journal Chemistry Computer Science**, v. 43, p. 2170-2179, 2003.

LOCKMAN, J. W.; HAMILTON, A. D. Recent developments in the identification of chemotherapeutics for Chagas Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 945-959, 2005.

LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Activity of Neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 10, p. 2126-2130, 2006.

MALDONADO, R. A.; KUNIYOSHI, R. K.; LINSS, J. G.; ALMEIDA, I. C. *Trypanosoma cruzi* oleate desaturase: molecular characterization and comparative analysis in other trypanosomatids. **Journal of Parasitology**, v. 92, v. 5, p. 1064-1074, 2006.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3/4, p. 173-215, 1983.

MARTINEZ, S.; RESTREPO, C. S.; CARRILLO, J. A.; BETANCOURT, S. L.; FRANQUET, T.; VARÓN, C.; OJEDA, P.; GIMÉNEZ, A. Thoracic manifestations of Tropical parasitic infections: a pictorial review<sup>1</sup>. **RadioGraphics**, v. 25, n. 1, p. 135-141, 2005.

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

MCCARTHY-BURKE, C.; TAYLOR, Z. A.; BUCK, G. A. Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 82, n. 1, p. 177-189, 1989.

McKERRROW, J. H.; McGRATH, M. E.; ENGEL, J. C. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. **Parasitology Today**, v. 11, n. 8, p. 279-282, 1995.

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.

MÈDECINES SANS FRONTIÈRES. **Fatal imbalance**: the crises in research and development for drugs for neglected diseases. Geneva, 2001. Disponível em: <<http://www.msf.org/source/access/2001/fatal/fatalshort.pdf>>. Acesso em: 6 out. 2001.

MELO, M. F. F. **Preparação e determinação da atividade toxicológica do pró-fármaco Hidroximetilnitrofurál, potencialmente antichagásico**. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MEYER, P. Discovering new drugs. In: WERMUTH, C. G. (Ed.). **The practice of medicinal chemistry**. London: Academic Press, 1996b. p. 11-24.

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: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. **World Health Statistics Quarterly: Rapport Trimestriel de Tistiques Sanitaires Mondiales**, v. 45, n. 2/3, p. 276-279, 1992.

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.

MORAES, E. de C. F.; SZNELWAR, R. B.; FERNÍCOLA, N. A. G. G. **Manual de toxicologia analítica**. São Paulo: ROCA, 1991. 229 p.

MURRAY, R. K. (Ed.). **Harper: bioquímica**. 9. ed. São Paulo: Atheneo, 2002. p. 737-761.

NARA, T.; KAMEI, Y.; TSUBOUCHI, A.; ANNOOURA, T.; HIROTA, K.; IZUMI, K.; DOHMOTO, Y.; ONO, T.; AOKI, T. Inhibitory action of marine algae extracts on the *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase activity and on the protozoan growth in mammalian cells. **Parasitology International**, v. 54, n. 1, p. 59-64, 2005.

NARE, B.; LUBA, J.; HARDY, L. W.; BEVERLEY, S. New approaches to *Leishmania* chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. **Parasitology**, v. 114, p. S101-110, 1997. Supplement.

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.

NITZ, N.; GOMES, C.; ROSA, A. C.; D'SOUZA-AULT, M. R.; MORENO, F.; PIRES, L. L.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. L. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas Disease. **Cell**, v. 118, n. 6, p. 175-186, 2004.

NOMURA, H.; FUGONO, T.; HITAKA, T.; MINAMI, I.; AZUMA, T.; MORIMOTO, S.; MASUDA, T. Semisynthetic  $\beta$ -lactam antibiotics. VII. Sulfocephalosporins and their antipseudomonal activities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 1312-15, 1974.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug on Discovery**, v. 5, n. 11, p. 941-955, Nov. 2006.

OLIVEIRA, R. B.; VAZ, A. B. M.; ALVES, R. O.; LIARTE, D. B.; DONNICI, C. L.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. Arylfurans as potencial *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 169-173, mar. 2006.

O'NEIL, M. J. (Ed.). **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14th ed. Whitehouse Station: Merck, 2006.

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.

OTERO, L.; SMIRCICH, P.; VIEITES, M.; CIGANDA, M.; SEVERINO, P. C.; TERENCEZI, H.; CERECETTO, H.; DENICOLA, A.; GAMBINO, D.; GARAT, B. DNA conformational changes and cleavage by ruthenium(II)nitrofurylsemicarbazone complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 1, p. 74-79, 2007.

PEREIRA, D.G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 171-177, jan./feb. 2007.

PEREZ, J.; GALLEGOS, V.; BERNIER-VILLAMOR, V.; CAMACHO, A.; GONZALEZ-PACANOWSKA, D.; RUIZ-PEREZ, L. M. Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae leishmania major and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient Escherichia coli. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 3, p. 771-777, 1999.

PITA, S. S. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; ALENCASTRO, R. B.; RODRIGUES, C. R. Modelos de QSAR – 4D de inibidores peptídicos da tripanotona redutase. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., Águas de Lindóia. [Resumos]. Disponível em: <<https://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T1264-2.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2006.

PRIETO, J. J.; TALEVI, A.; BRUNO-BLANCH, L. E. Application of linear discriminant analysis in the virtual screening of antichagasic drugs through trypanothione reductase inhibition. **Molecular Diversity**, v. 10, n. 3, p. 361-375, Aug. 2006.

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

RASSI, A.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, G. G.; RASSI JR., A. Tratamento específico da doença de Chagas: uma visão de 1962 a 1999. **Revista de Patologia Tropical**, v. 29, p.157-163, 2000. Suplemento.

RAVASCHINO, E. L.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J. B. Design, synthesis, and biological evaluation of Phosphinopeptides against *Trypanosoma cruzi* targeting Trypanothione Biosynthesis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, n. 1, p. 426-435, 2006.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 115-169.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIGOL, C.; OLEA-ZAR, C.; MENDIZÁBAL, F.; OTERO, L.; GAMBINO, D.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 61, n. 13/14, p. 2933-2938, 2005.

RONDEAU, J. M.; SCHREUDER, H. The use of X-ray structures of receptors and enzymes in drug discovery. In: WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. London: Academic Press, 1996. p. 485-522.

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.

SCHNARE, M. N.; GRAY, M. W. A candidate U1 small nuclear RNA for trypanosomatid protozoa. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 23691-23694, 1999.

SCHUMUNIS, A. G. A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z.; ANDRADEDE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1-12.

SDR – Strategic Direction for Research, WHO, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int./tdr/diseases/chagas/directions.htm>>. Acesso em: 14 fev. 2005.

SEYDEL, J. K.; SCHAPER, K. J. **Chemische struktur und biologische aktivität von wirkstoffen**: methoden der quantitativen struktur-wirkung-analyse. Weinheim: VHC, 1979.

SHUKER, S. B.; HAJDUK, P. J.; MEADOWS, R. P.; FESIK, S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. **Science**, v. 274, n. 5292, p. 1531-1534, 1996.

SILVA, A. T. A.; CHUNG, M. C.; CASTRO, L. F.; GÜIDO, R. V. C.; FERREIRA, E. I. Advances in prodrug design. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 893-914, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

SINGH, G.; SHARMA, P. D. Mutual prodrugs-a recent trend in prodrug design. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 56, n. 3, p. 69-79, 1994.

SMITH, T. P.; O'DONNELL, M. E.; O'CONNOR, M. J.; St LEDGER, J. O.  $\beta$ -Lactamase-dependent prodrugs-recent developments. **Tetrahedron**, v. 56, n. 31, p. 5699-5707, 2000.

SOUZA, D. H.; GARRAT, R. C.; ARAUJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **Febs Letters**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.

SOUZA, V. A.; SILVA, R.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. A.; SARAIVA, J.; MONTANHEIRO, M.; SOUZA, G. H. B.; SILVA FILHO, A. A.; GRANDO, M. D.; DONATE, P. M.; BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. A. Trypanocidal activity OF ( - )-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Letters**, v. 15, n. 2, p. 303-307, 2005.

STOPPANI, A. O. M.; PAULINO, M.; DUBIN, M. Oxigen radicais and the chemotherapy of Chagas' disease: an overview. **Ciência e Cultura**, v. 48, n. 1/2, p. 75-85, 1996.

SVENSSON, H. P.; WALLACE, P. M.; SENTER, P. D. Synthesis and characterization of monoclonal antibody - $\beta$ -lactamase conjugates. **Bioconjugate Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 262-267, 1994.

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.

TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 8, n. 3, p. 207-231, 1995.

TAKAYA, T.; TAKASUGI, H.; MASUGI, T.; KOCHI, H.; NAKANO, H. Studies on  $\beta$ -lactam antibiotics. II. Synthesis and structure-activity relationships of  $\alpha$ -hydroxyiminoarylacetyl cephalosporins. **Journal of Antibiotics**, v. 34, n. 10, p. 1290-1299, 1981.

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.

TDR-TRAINING IN TROPICAL DISEASES. **Strategic direction: Chagas Disease**, 2005. Disponível em <<http://www.who.int/tdr>>. Acesso em: 15 jul. 2007.

TESTA, B.; MAYER, J. M. **Hidrolisis in drug and produg metabolism, chemistry, biochemistry, and enzymology**. Zürich: Wilet-VCH, 2003. p. 148-162.

THE UNITED States pharmacopeia: USP29: the national formulary: NF24 : by authority of the United States Pharmacopeial Convention. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005.

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

THOMAS, G. **Química medicinal: uma Introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413 p.

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.

TROSSINI, G. H. G.; MALVEZZI, A.; AMARAL, A. T.; MENEZES, C. M. S.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. Cruzain inhibitory activity of hydroxymethylnitrofurazone. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DRUG DISCOVERY; NATIONAL MEETING OF MEDICINAL CHEMISTRY PROFESSORS, 9th, 2006, Araraquara. [**Abstracts**]. Araraquara: [s.n.], 2006. 1 CD-ROM.

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.

VERLINDE, C. L.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G.; MICHELS, P. A. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resist Updat**, v.4, n. 1, p. 50-65, 2001.

VRUDHULA, V. M.; SVENSSON, H. P.; KENNEDY, K. A.; SENTER, P. D.; WALLACE, P.M. Antitumor activities of a cephalosporin prodrug in combination with monoclonal antibody -  $\beta$ -lactamase conjugates. **Bioconjugate Chemistry**, v. 4, n. 5, p. 334-340, 1993.

WANG YUAN, H.; WRIGHT, S. C.; WANG, H.; LARRICK, J. W. Synthesis and preliminary cytotoxicity study of a cephalosporin-CC-1065 analogue prodrug. **BMC Chemical Biology**, v. 1, n. 4, 2001. Disponível em: <<http://bmc.ub.uni-potsdam.de/1472-6769-1-4/1472-6769-1-4.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2006.

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. **The practice of medicinal chemistry**. 2nd ed. Oxford: Elsevier, 2004.

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

WILLIAMS-BLANGEROS, S.; MAGALHÃES, T.; RAINWATER, E.; BLANGERO, J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; VANDEBERG, J. L. Electrocardiographic characteristics in a population with high rates of seropositivity for *Trypanosoma cruzi* Infection. **American Journal Tropical Medicinal Hygiene**, v.77, n.3, p. 495-499, 2007.



WINTER, M. E. **Basic clinical pharmacokinetics**. 2nd ed. Washington: Applied Therapeutics, 1988.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Reports of meeting of development of drugs against african trypanosomiasis, leishmaniasis and Chagas disease**. Geneva: UNDP: World Bank: WHO, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas disease**. Geneva, 1991. (WHO Technical Report Series).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas: the disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>>. Acesso em: 10 set. 2007.

WORONOWICZ, A.; DE VUSSER, K.; LAROY, W.; CONTRERAS, R.; MEAKIN, S. O.; ROSS, G. M.; SZEWCZUK, M. R. Trypanosome trans-sialidase targets TrKA tyrosine kinase receptor and induces receptor internalization and activation. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 987-998, 2004.

WU, W. N.; CALDWELL, G. W.; MASUCCI, J. A. Evaluation of the excretion and metabolism of the new analgesic agent RWJ-22757 in male and female CR Wistar rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 3/4, p. 659-671, 2002.

ZACKS, M. Impairment of cell division of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 111-115, feb. 2006.

ZHANG, Y.; BOND, C. S.; BAILEY, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; HUNTER, W. N. The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. **Protein Science**, v. 5, n. 1, p. 52-61, 1996. Disponível em: <<http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1AOG>>. Acesso em: 25 nov. 2006.

ZHENG, A.; WANG, W.; ZHANG, H.; WANG, B. Two new improved approaches to the synthesis of coumarin-based prodrugs. **Tetrahedron**, v. 55, n. 14, p. 4237-4254, 1999.

## ANEXO

 unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 25/2005 – Animais em Pesquisa

Interessado: ELIANA OMETTO PAVAN SERAFIM

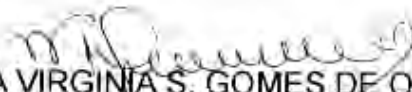
Orientador: Profa. Dra. Chung Man Chin

Título do Projeto: Estudo da hidrólise in vitro e em meio biológico do hidroximetilnitrofurol (NFOH), um novo agente antichagásico

**Parecer nº 11/2006 – Comitê de Ética em Pesquisa**

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Estudo da hidrólise in vitro e em meio biológico do hidroximetilnitrofurol (NFOH), um novo agente antichagásico", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 20 de abril de 2006.



Profª. Drª. MARIA VIRGINIA S. GOMES DE OLIVEIRA  
Coordenadora do CEP