



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas  
Departamento de Ciências Biológicas  
Laboratório de Imunopatologia

Thaís Fernanda Rodrigues Bastos Mendes

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DO BENZNIDAZOL EM  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS  
TERAPÊUTICOS**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Martins Carneiro

Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Luisa Perin

Ouro Preto – MG  
2019

Thaís Fernanda Rodrigues Bastos Mendes

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DO BENZNIDAZOL EM  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS  
TERAPÊUTICOS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto como requisito da disciplina Seminários de Pesquisa e Monografia II (CBI261) para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Área de concentração: Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Martins Carneiro  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Luisa Perin

Ouro Preto-MG  
2019



## FOLHA DE APROVAÇÃO



Universidade Federal de Ouro Preto  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas  
Departamento de Ciências Biológicas



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Monografia Intitulada:

"ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DO BENZNIDAZOL EM CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS TERAPÊUTICOS"

Aos 12 dias do mês de dezembro de 2019, às 16:00 horas, na sala de aulas do NUPEB da UFOP, reuniu-se a Comissão examinadora da Monografia da aluna Thais Fernanda Rodrigues Bastos Mendes. A defesa pública de monografia iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e declararam a candidata aprovada, com a nota 9,5.

Membros da Banca Examinadora

Cláudia Martins Carneiro  
Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro  
Orientadora (Dep. Análises Clínicas, EF-UFOP)

Lorena Cera Bandeira  
Ms Lorena Cera Bandeira  
Examinadora (Colegio Arquidiocesano, Ouro Preto)

Dr.ª Cláudia Martins Carneiro  
Dr.ª Katia da Silva Fonseca  
Examinadora (NUPEB/UFOP)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família Pai, Mãe, Lara e Él. Sem o amor, compreensão e incentivos de vocês eu jamais teria chegado até aqui. Não existem palavras, nem medidas para descrever o tamanho do meu amor por vocês. Vocês todos são meus maiores exemplos: Pai, você é meu exemplo de empenho e profissionalismo, por onde passa deixa sua marca. Mãe, você é meu exemplo de superação, sua evolução é muito inspiradora. Él, você é meu exemplo de paixão por conhecimento, pois eu acho mágico quando você explica sobre algum assunto que gosta. Lara, você é meu exemplo de esforço, tudo o que faz é com capricho e dedicação.

Luísa, você é a melhor coorientadora do Universo! Obrigada pela paciência extrema, puxões de orelha necessários, pela noite virada na frente do HPLC pra ver se ele ia fazer alguma gracinha, pelas vezes que os equipamentos deram pau e você ficou tentando arrumar e pela boa vontade em passar todo o seu conhecimento para todos. Você é um exemplo.

Claudia, obrigada pela oportunidade de iniciação científica, pela orientação e por proporcionar esse contato com a ciência que me agregou muito conhecimento e desejo de fazer a diferença no mundo.

Gratidão às LIMPinhas Bia, Pauli e Su, que me ajudaram em todas as etapas desse projeto e pela amizade que se estendeu para além das bancadas. Vamos tomar café?

Luciana, João e Lorena, obrigada pelo auxílio durante todos esses anos no LIMP, pelos conselhos e por deixarem o ambiente de trabalho com clima de amizade.

Ao Leonardo gratidão pelas análises, por me auxiliar na compreensão de alguns dados e pelas ótimas explicações.

Agradeço, por fim, aos meus amigos de Ouro Preto: às Wândalas Gil e Jeje pelo apoio, aos meninos da Sete Pragas que me acolheram, em especial ao melhor amigo que alguém poderia ter: Fabiano (DBX), que me fez acreditar que ia dar certo.

Por fim, Dio e Day, meus primos queridos que viajaram por horas pra me ver e transformar essa etapa difícil em algo divertido.

## RESUMO

O benznidazol (BNZ) é considerado medicamento de referência no tratamento da doença de Chagas (DCh) e o único disponível no Brasil, mesmo que apresentando como limitações efeitos colaterais diversos, falta de elucidação do mecanismo de ação e eficácia dependente da cepa do *Trypanosoma cruzi*. Existem evidências de que a indução de enzimas de biotransformação e/ou transporte pelo BNZ pode aumentar o *clearance* e/ou reduzir a absorção do medicamento. Os estudos da distribuição do BNZ entre os diferentes tecidos ainda são escassos na literatura e a correta determinação da distribuição tecidual do BNZ permitirá um melhor aporte para estudos farmacológicos e toxicológicos. Nosso estudo teve como objetivo estudar a distribuição tecidual do BNZ em diferentes esquemas terapêuticos no modelo camundongo. Foram utilizados 200 camundongos *Swiss* sadios distribuídos em cinco grupos experimentais (n=40): (1) Tratado com BNZ 200 mg/kg/dia por 20 dias; (2) Tratado com BNZ 100 mg/kg/dia por 20 dias; (3) Tratado com BNZ 40 mg/kg/dia por 20 dias; (4) Tratado com BNZ 100 mg/kg/dia por 40 dias; (5) Tratado com BNZ 40 mg/kg/dia por 40 dias. Os tecidos foram coletados nos tempos 0,16; 0,33; 0,5; 1; 2; 3; 6 e 12h após a administração do BNZ. Os órgãos selecionados foram o baço, duodeno, estômago, pulmão e rim. A quantificação do BNZ em órgãos foi feito em HPLC-DAD a partir do procedimento analítico desenvolvido e validado por nosso grupo de pesquisa. As análises foram avaliadas empregando o programa NONMEN v.7.3 e o programa R, versão 3.1.2. A distribuição do BNZ não ocorre de forma uniforme e os valores de distribuição tecidual não mostraram ser dose ou tempo-dependente para os órgãos analisados nesse estudo. Nossos dados reforçam a necessidade do desenvolvimento de novas formulações do BNZ que garantam distribuição tecidual mais homogênea e maior exposição e penetração tecidual.

Palavras-chave: benznidazol, farmacocinética, distribuição tecidual, doença de Chagas, esquemas terapêuticos.

## ABSTRACT

Benznidazole (BNZ) is considered a reference drug in the treatment of Chagas disease (DCh) and the only one available in Brazil, although its limitations include several side effects, lack of elucidation of the mechanism of action and *Trypanosoma cruzi* strain-dependent efficacy. There is evidence that BNZ induction of biotransformation and / or transport enzymes may increase clearance and / or reduce drug absorption. Studies of BNZ distribution among different tissues are still scarce in the literature and the correct determination of BNZ tissue distribution against multiple dose treatments will allow a better contribution to pharmacological and toxicological studies. Our study aimed to study the tissue distribution of BNZ in different therapeutic regimens in the mouse model. 200 healthy Swiss mice were used in five experimental groups (n = 40): (1) treated with BNZ 200 mg / kg / day for 20 days; (2) Treated with BNZ 100 mg / kg / day for 20 days; (3) Treated with BNZ 40 mg / kg / day for 20 days; (4) Treated with BNZ 100 mg / kg / day for 40 days; (5) Treated with BNZ 40 mg / kg / day for 40 days. Tissues were collected at times 0.16; 0.33; 0.5; 1; 2; 3; 6 and 12h after administration of BNZ. The organs selected were the spleen, duodenum, stomach, lung and kidney. The quantification of BNZ in organs was done by HPLC-DAD from the analytical procedure developed and validated by our research group. The analyzes were evaluated using the NONMEN v.7.3 program and the R program, version 3.1.2. BNZ distribution does not occur evenly and tissue distribution values were not dose or time-dependent for the organs analyzed in this study. Our data reinforce the need for the development of new BNZ formulations that ensure more homogeneous tissue distribution and greater exposure and tissue penetration.

Keywords: benznidazole, pharmacokinetics, tissue distribution, Chagas disease, therapeutic regimens.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química do BNZ.....	5
<b>Figura 2:</b> Delineamento experimental.....	11

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Curva de calibração com os valores da concentração final em meio biológico.....13
- Tabela 2:** Parâmetros farmacocinéticos da distribuição tecidual do BNZ em camundongos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.....16

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	8
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	8
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	8
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	9
<b>3.1. Animais</b> .....	9
<b>3.2. Substâncias químicas de referência</b> .....	9
3.2.1. <i>Padrão do analito</i> .....	9
3.2.2. <i>Padrão interno</i> .....	9
3.2.3. <i>Solvente Extrator</i> .....	10
3.2.4. <i>Fases móveis</i> .....	10
<b>3.3. Delineamento experimental</b> .....	10
<b>3.4. Preparo do BNZ e esquema de tratamento</b> .....	11
<b>3.5. Necropsia e coleta de tecidos</b> .....	11
<b>3.6. Preparo das amostras</b> .....	12
3.6.1. <i>Procedimento para extração do BNZ</i> .....	12
3.6.2. <i>Análise em HPLC (high performance liquid chromatography)</i> .....	13
<b>3.7. Análise dos dados</b> .....	13
<b>4. RESULTADO</b> .....	15
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	19
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	22
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	23

## 1. INTRODUÇÃO

A descoberta da doença de Chagas (DCh) se deu em 1909, quando o médico Carlos Justiniano Ribeiro Chagas foi enviado por Oswaldo Cruz ao povoado de São Gonçalo das Tabocas, atual Lassance, em Minas Gerais, para atuar no combate ao paludismo (Malária) entre os trabalhadores da Estrada de Ferro Central do Brasil. Sua atenção foi despertada por um inseto que vivia em grande quantidade nas frestas das paredes das casas de pau-a-pique e alimentava-se do sangue de seus moradores durante a noite. O inseto ficou popularmente conhecido como “barbeiro” por atacar preferencialmente o rosto das pessoas (DIAS, 2019). Carlos Chagas detectou a presença de novos protozoários no intestino dos insetos e formulou a hipótese de que estivessem relacionados à doença que afligia a população da região, que apresentavam sintomas diversos, predominantemente cardíacos (GARCIA, 2009).

No ano de 1908 ele descreveu em um relatório, o *Trypanosoma cruzi* sendo “*cruzi*” uma homenagem a Oswaldo Cruz. O médico descobriu o protozoário no organismo de animais silvestres antes de observar em sangue humano (VERÍSSIMO, 1991). Em 1909, Chagas viu pela primeira vez o protozoário no sangue de uma menina de três anos, Berenice, em plena fase aguda, apresentando os sintomas de febre, edemas e ingurgitação linfática generalizada. Houve, dessa forma, um feito único na história da medicina: Chagas descobriu o parasito e seu ciclo evolutivo; o vetor e seus hábitos; e a doença de Chagas (FIOCRUZ, 2019).

As doenças tropicais são um conjunto de doenças causadas por vírus, bactérias ou parasitos que atingem pessoas na faixa tropical do globo, onde se concentram as populações mais vulneráveis dos países em desenvolvimento. As doenças tropicais negligenciadas são assim denominadas porque prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países e afetam mais de um bilhão de pessoas que vivem em situação de pobreza, em locais onde há problemas de acesso à água tratada, falta de saneamento básico, habitação precária e regiões onde há forte interferência do homem no meio ambiente (FIOCRUZ, 2012/ OPAS, 2019). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), de 21 doenças negligenciadas, 18 estão presentes no Brasil.

A DCh, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença tropical causada pelo parasito *T. cruzi*, considerada negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e acomete cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo. Estima-se que a DCh é responsável pela causa de 14.000 mortes por ano (DNDI, 2019). Classificada como uma antropozoonose, a DCh é uma doença que liga o homem aos animais.

O agente etiológico da Doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado que pertence à ordem Kinetoplastida e família *Trypanosomatidae* (MASSARO, REZENDE, CAMARGO, 2008). Existem diferentes tipos de cepas do *T. cruzi*, que se diferenciam quanto à morfologia, antigenicidade, patogenicidade, composição genética, infectividade (COURA, 2003) e susceptibilidade ao tratamento (FILARDI & BRENER, 1987). O *T. cruzi* infecta, em condições naturais, mais de 100 espécies de mamíferos. Dessa forma, o parasito existe naturalmente em diferentes populações de triatomíneos e mamíferos, inclusive nos seres humanos (AZAMBUJA, GARCIA, 2017). O contágio e ciclo do parasito, que pode ser iniciado quando o inseto triatomíneo, popularmente conhecido como "barbeiro", em qualquer estágio do seu ciclo de vida, pica uma pessoa ou outro animal infectado e então, suga, juntamente com o sangue, as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*, tornando-se um "barbeiro" infectado (SUCEN, 2019). O *T. cruzi* sofre mutações e multiplica-se, migrando para o intestino do inseto; o barbeiro, ao realizar a hematofagia, defeca, liberando assim o protozoário, que entra na ferida deixada pela picada no animal (MIZOGUTI, KOIAMA, PASSOS, 2018); nas células hospedeiras, as tripomastigotas metacíclicas se convertem em formas amastigotas. Após várias rodadas de fissão binária, os amastigotas se convertem em tripomastigotas flagelados. Depois, rompem a célula em que estavam alojados e vão para a circulação sanguínea. Por fim, irão infectar um novo triatomíneo, fechando assim o ciclo (ATWOOD et al., 2005).

A transmissão do *T. cruzi* para o ser humano pode ocorrer por diferentes maneiras: vetorial, transfusão de sangue, transplante de órgãos, congênita, oral e ocupacional.

A transmissão vetorial clássica ocorre quando o protozoário é transmitido no ato da alimentação dos insetos vetores (ROCHA et al., 2010; FIOCRUZ, 2013). A transfusão de sangue é uma importante forma de propagação da doença em centros

urbanos e é considerada a principal forma de transmissão em países não endêmicos (GONTIJO, SANTOS, 2008). No contágio após o procedimento de transplante de órgãos pode haver transmissão a partir do doador infectado (DIAS, NETO, LUNA, 2011). A transmissão vertical ou congênita ocorre da mãe infectada para o filho, durante a gravidez ou aleitamento materno (FIOCRUZ, 2019). A transmissão oral acontece pela ingestão de alimentos contaminados com vetores triturados ou com seus dejetos. Esta, atualmente, é considerada a mais importante forma de transmissão no Brasil, pois cerca de 72% das transmissões acontecem por via oral. Os alimentos consumidos *in natura* que causam maior número de infecções são caldo de cana e o açaí (ALVES, 2019; FIOCRUZ, 2013). A transmissão ocupacional ocorre devido a acidentes no ambiente de trabalho, envolvendo materiais cortantes infectados, materiais biológicos que possam entrar em contato direto com mucosas, com ferimentos na pele, permitindo o acesso à corrente sanguínea (BRASIL, 2004).

A doença de Chagas nos seres humanos é caracterizada por duas fases clínicas, sendo a primeira a fase aguda que dura em média 2 meses, sendo sucedida pela fase crônica que geralmente se prolonga por toda a vida do hospedeiro.

A fase aguda da doença, na maioria dos casos, produz poucos sintomas, principalmente em adultos, dificultando o diagnóstico (DIAS, DESSOY, 2009). Nos casos sintomáticos da fase aguda, os sintomas incluem febre, inflamação no local da inoculação (sinal de Romana), linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. A doença aguda grave ocorre em menos de 1 a 5% dos pacientes e inclui manifestações como miocardite aguda, derrame pericárdico e meningoencefalite (MOLINA, MOLINA, 2018). Crianças apresentam sintomas de forma mais severa durante a fase aguda sintomática na primeira década de vida, podendo levar à morte devido a complicações decorrentes de insuficiência cardíaca e processos inflamatórios que envolvem o cérebro (DIAS, DESSOY, 2009). Durante essa fase, um grande número de parasitos circula no sangue, mas na maioria dos casos os sintomas estão ausentes ou inespecíficos, como febre, dor de cabeça, palidez, dores musculares, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal ou torácica, entre outros (WHO, 2018).

Após a fase aguda e suas manifestações, o paciente passa por um longo período assintomático de 10 a 30 anos, conhecido como fase indeterminada que poderá evoluir para a forma crônica (WESTPHALEN, BISUGO, ARAÚJO, 2012).

Quando o hospedeiro desenvolve resposta imune eficaz, a parasitemia diminui e a infecção tende a se cronificar naturalmente. A fase crônica tem como característica a baixa parasitemia e o baixo parasitismo tecidual, pois ninhos de amastigotas também são escassos (NEVES, 2009; DE LANA, TAFURI, 2004). A fase crônica pode ser i) assintomática: a forma assintomática pode ser definida pela presença de infecção pelo *T. cruzi* e ausência de manifestações clínicas (RIBEIRO, OTÁVIO, ROCHA, 1998) ou ii) sintomática: a forma sintomática da DCh pode ser cardíaca, digestiva ou mista: A forma cardíaca apresenta miocardite crônica, insuficiência cardíaca e eventualmente morte súbita por arritmia cardíaca. Enquanto que a forma digestiva é caracterizada pelo aumento exagerado do cólon (megacólon) e esôfago (megaesôfago). Já a forma mista é determinada pela presença simultânea da forma cardíaca e digestiva (COURA, 2003).

O tratamento para a doença de Chagas vem sendo estudado e testado desde a descoberta da doença e, mesmo após 110 anos da descoberta, a tripanossomíase americana continua sendo um problema de saúde pública significativo e o potencial terapêutico dos medicamentos usados para o tratamento ainda é muito limitado (SOBRINHO et al, 2009). De acordo com os autores Dias et al. (2009), de 1909 até 1935, na lista dos primeiros compostos testados experimentalmente para o tratamento da doença de Chagas, logo após sua descoberta estão substâncias como o atoxil (arsênico), a fucsina (corante rosanilina) e cloreto de mercúrio. Todos sem resultados efetivos. De 1936 a 1960, houveram avaliações biológicas de inúmeros fármacos, sendo eles mais de 20 quimioterápicos e 30 antibióticos, que não apresentaram resultados conclusivos. No início da década de 70, dois fármacos obtiveram relativo sucesso para o tratamento da doença de Chagas: o nifurtimox e o benznidazol (BNZ) (Figura 1).

O nifurtimox teve sua distribuição interrompida no Brasil e alguns países da América Latina por apresentar muitos efeitos secundários severos e, conseqüentemente, levar a uma alta taxa de abandono do tratamento (SOBRINHO et al., 2009). Dentre os efeitos colaterais estão: reações de hipersensibilidade, anorexia, vômito, polineurite e depressão da produção de células pela medula óssea

(URBINA & DOCAMPO, 2003) Dessa forma, apenas o BNZ está disponível no Brasil, apesar de sua alta toxicidade e eficácia limitada, especialmente na fase crônica da doença. O Nifurtimox é indicado somente para os casos de intolerância ao BNZ (DIAS, COURA, 1997).

O BNZ (N-benzyl-2-nitro-1-imidazole-acetamide) é um medicamento nitroheterocíclico que possui atividade antiprotozoária e antibacteriana. Foi sintetizado em 1972, por Wineholt e Liebman e produzido pelo laboratório Hoffman - La Roche, na Suíça (CANÇADO, 2000; SCHOFIELD, JANNIN, SALVATELLA, 2006). Este laboratório, por sua vez, cedeu os direitos e a tecnologia de fabricação do BNZ e, atualmente o fármaco é produzido no Brasil pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe) e na Argentina pelo laboratório privado Elea (Abarax®) (CASTRO, SOEIRO, 2019).

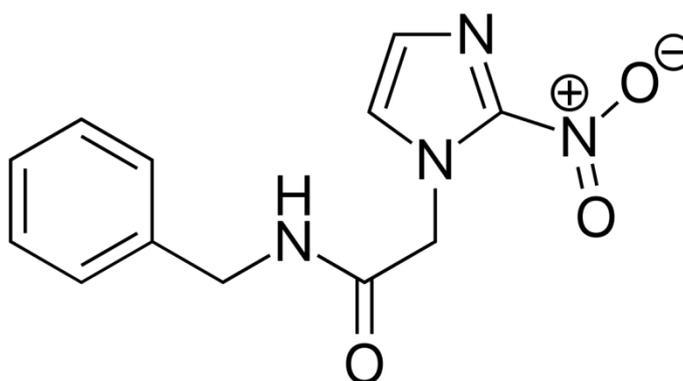


Figura 1: Estrutura química do BNZ.

De acordo com a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC), em 2018, para os indivíduos adultos, o BNZ é administrado na dose de 5 mg/kg/dia, em uma a três doses, por 60 dias. Já no uso pediátrico, a dose utilizada é de 5 a 10 mg/kg/dia, dividida em duas tomadas diárias, por 60 dias. O remédio é distribuído pelo Ministério da Saúde, gratuitamente através do Sistema Único de Saúde (SUS).

Mesmo sendo considerado como o medicamento de referência contra a doença de Chagas, o tratamento apresenta como limitações diversos efeitos colaterais. Tais reações adversas CASTRO e COURA (2002) são classificadas em três grupos: (i) dermatite com erupções cutâneas, febre edema generalizada, linfadenopatia, dor articular e muscular; (ii) depressão da medula óssea, púrpura

trombocitopênica e agranulocitose; (iii) polineuropatia, parestesia e polineurite dos nervos periféricos.

MAXIMIANO et al. (2010) afirmam que por apresentar baixa permeabilidade e solubilidade limitada, o benznidazol é um fármaco pertencente à classe IV na classificação biofarmacêutica. Administrado por via oral, o BNZ é absorvido, em grande parte, no trato gastrointestinal (TGI), mais especificamente no intestino delgado. A maior parte do fármaco absorvido no TGI entra na circulação porta e passa pelo fígado e então, é distribuído pela circulação geral. Sabe-se que a biotransformação no intestino e fígado – metabolismo de primeira passagem – acaba por limitar a eficácia de muitos medicamentos que são administrados por via oral (LARINI, 2008).

A absorção por via digestiva do BNZ é quase total e rápida, os alcances das concentrações máximas no plasma ocorrem em 3 e 4 horas. A meia-vida de eliminação plasmática ( $t_{1/2\beta}$ ) é de aproximadamente 12 horas, sendo encontrado no organismo principalmente sob a forma inalterada. Posteriormente, a eliminação ocorre em cerca de 10 horas após metabolização hepática, pela urina e pelas fezes (LAFEPE, 2019).

Embora esteja sendo disponibilizado desde a década de 70, o mecanismo de ação do benznidazol ainda não está completamente definido, acredita-se que o medicamento deve agir causando estresse oxidativo no parasito: o grupo nitro (NO<sub>2</sub>) presente no BNZ é reduzido a amino (NH<sub>2</sub>) pela ação de nitroreduases. O processo é catalisado por meio da citocromo P-450, havendo formação de radicais durante o processo, que atuam no efeito tripanocida mediante ligações covalentes com o DNA, lipídios e proteínas do *T. cruzi* (TEMPERTON et al., 1998; MAYA et al., 2007; URBINA, 2002). Para CASTRO, DE MECCA e BARTEL (2006), o efeito tripanocida do BNZ pode estar diretamente ligado aos efeitos adversos no hospedeiro .

A medida e interpretação da evolução temporal das concentrações de um fármaco no organismo relacionadas com a dose administrada são feitas por meio da farmacocinética. Os estudos farmacocinéticos dependem de técnicas analíticas sensíveis para a quantificação de fármacos em fluidos biológicos, como a cromatografia de alta eficiência (HPLC) e a espectrometria de massa. Os processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME) do fármaco no organismo são estudados pela farmacocinética, que por sua vez, vem sendo cada

vez mais utilizada nas análises clínicas com a finalidade de entender os dados pré – clínicos e toxicológicos dos medicamentos, além de identificar prováveis interações medicamentosas e estabelecer regime ou reajuste de doses. Nesses estudos é possível encontrar diferentes modos de execução do procedimento, com variáveis como proporção dos solventes na fase móvel, tempo de execução por amostra, linearidade e volume amostral (RANG & DALE, 2016; QUEIROZ & LANÇA, 2005; DAVANÇO, DE CAMPOS, PECCINI, 2015).

As técnicas mais comuns empregadas para a extração de compostos presentes em fluidos biológicos são: extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas ou líquidas. A extração líquido-líquido (ELL) pode ser efetuada de forma manual, por sistema mecanizado ou automatizado, sendo caracterizada pela transferência de solutos entre duas fases que formam um sistema heterogêneo, tendo como princípios: melhorar a seletividade de uma técnica de detecção, separando os interferentes mais significativos e aumentar a sensibilidade concentrando o analito. Como vantagens pode se considerar a possibilidade de se utilizar um grande número de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade e a chances diminutas de contaminação da coluna cromatográfica, já que as proteínas presentes nas amostras são desnaturadas. A ELL apresenta algumas desvantagens como consumo de solventes orgânicos de alta pureza, várias etapas para sua execução e exposição do laborista aos reagentes tóxicos. Porém, ainda que apresente estas desvantagens, a ELL continua sendo muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em fluidos biológicos, já que esse método possibilita a obtenção de extratos limpos a partir da alta seletividade para alguns analitos. (FACCHIN & PASQUINI, 1997; QUEIROZ, COLLINS & JARDIM, 2001; QUEIROZ & LANÇA, 2015).

Não existem muitos trabalhos na literatura que tratem sobre a biodistribuição do BNZ em diferentes órgãos. Podemos encontrar três trabalhos que descrevem esse tipo de análise, sendo eles: Workman et al. (1984), que realizaram estudos do BNZ presente no cérebro e no fígado de camundongos e cães; Morilla et al. (2003) fizeram a comparação da biodistribuição do BNZ livre com a do BNZ lipossomal no fígado, células vermelhas, pulmão, baço, rim, coração e rabo de ratos

*wistar*, enquanto que PERIN (2015) avaliou os perfis farmacocinéticos do BNZ em amostras de plasma, baço, cérebro, coração, cólon, duodeno, pulmão e rim de camundongos *swiss*.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi monitorar e avaliar os perfis de biodistribuição e dose-proporcionalidade do BNZ frente a diferentes esquemas terapêuticos. A correta determinação da distribuição tecidual do BNZ frente a tratamentos de doses múltiplas permitirá um melhor aporte para estudos farmacológicos e toxicológicos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Estudar a distribuição tecidual do BNZ em diferentes esquemas terapêuticos no modelo camundongo.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a distribuição tecidual do BNZ em camundongos tratados via oral com doses de 200 mg/Kg/dia, durante 20 dias.
- Avaliar a distribuição tecidual do BNZ em camundongos tratados via oral com doses de 100 mg/Kg/dia, durante 20 dias.
- Avaliar a distribuição tecidual do BNZ em camundongos tratados via oral com doses de 40 mg/Kg/dia, durante 20 dias.
- Avaliar a distribuição tecidual do BNZ em camundongos tratados via oral com doses de 100 mg/Kg/dia, durante 40 dias.
- Avaliar a distribuição tecidual do BNZ em camundongos tratados via oral com doses de 40 mg/Kg/dia, durante 40 dias.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos *Swiss*, com 30 dias de idade, fêmeas, pesando de 18 a 25g, nascidos no Setor de Criação do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA, UFOP), mantidos em ambiente controlado com ciclos regulares de luz, temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , disponibilidade de água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo SBCAL/COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório).

O projeto referente a este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto. Protocolos CEUA-UFOP nº: 2016/58 “Novas estratégias para o tratamento da doença de Chagas com benznidazol: farmacocinética em doses repetidas, distribuição tecidual e dose-proporcionalidade no modelo murino”.

#### **3.2. Substâncias químicas de referência**

As substâncias utilizadas nesse projeto foram selecionadas por apresentar melhores resultados nos testes feitos por PERIN, 2015.

##### *3.2.1. Padrão do analito*

Foi utilizado como padrão analítico o BNZ (97% de pureza; Lote MKBL3727V, Sigma-Aldrich®) Pois, o analito é o composto químico de interesse a ser mensurado em uma matriz (BRASIL, 2012).

##### *3.2.2. Padrão interno*

Dentre as substâncias testadas como padrão interno a que apresentou melhor resultado foi o omeprazol (OPZ). (99% de pureza, lote BCBL3570V, Sigma-Aldrich®).

### 3.2.3. Solvente Extrator

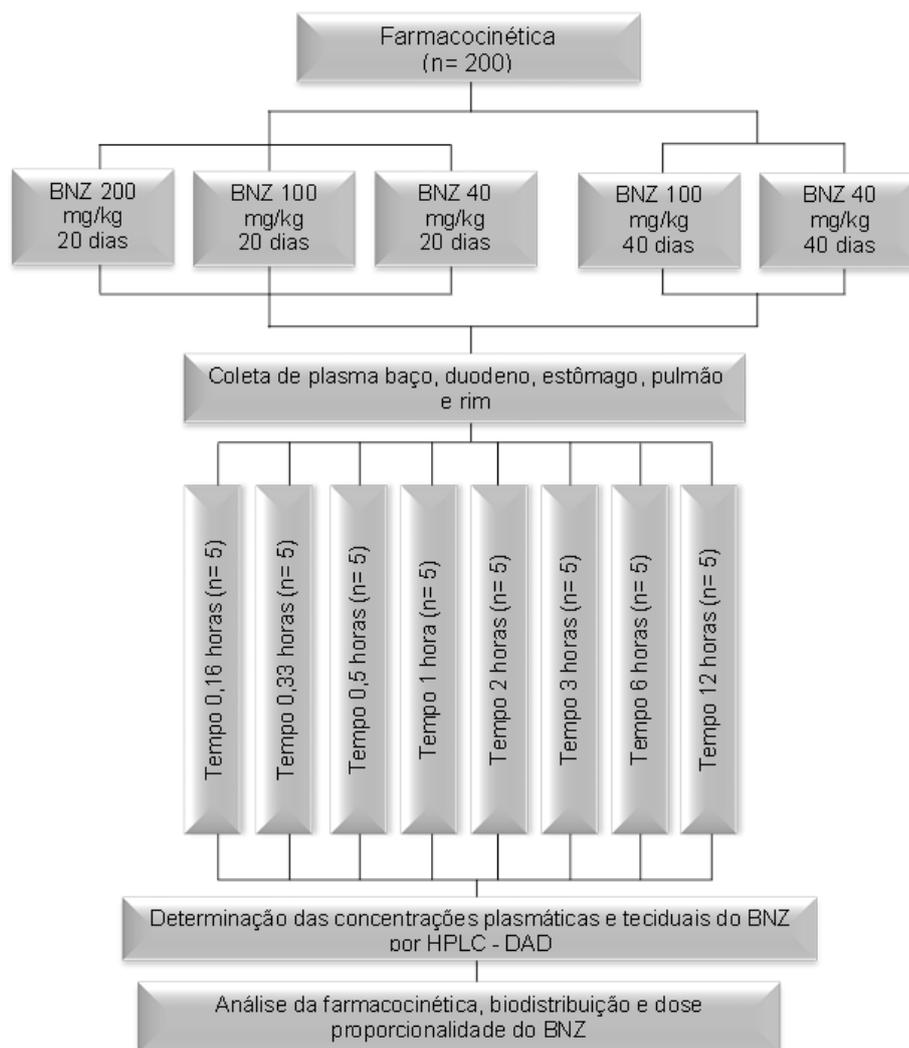
O Acetato de Etila (LABSYNTH®) foi utilizado, pois, de acordo com PERIN, (2015), possui polaridade mais próxima à do BNZ, apresentando melhores resultados na extração dos padrões na matriz biológica e gerou extratos com menos interferentes.

### 3.2.4. Fases móveis

A melhor separação e detecção dos analitos foram obtidas utilizando fase móvel composta por Acetonitrila (ACN) e água ultrapura (*Milli-Q*®), na proporção de 30:70 (v/v).

## 3.3. Delineamento experimental

Para a execução desta pesquisa, utilizou-se do seguinte delineamento experimental (Figura 2). Foram utilizados 200 camundongos *Swiss* sadios distribuídos em cinco grupos experimentais (n=40): (1) Tratado com BNZ 200 mg/kg/dia por 20 dias; (2) Tratado com BNZ 100 mg/kg/dia por 20 dias; (3) Tratado com BNZ 40 mg/kg/dia por 20 dias; (4) Tratado com BNZ 100 mg/kg/dia por 40 dias; (5) Tratado com BNZ 40 mg/kg/dia por 40 dias.



**Figura 2: Delineamento experimental**

### 3.4. Preparo do BNZ e esquema de tratamento

Os comprimidos de BNZ foram triturados manualmente em gral de porcelana e ressuspensos com solução de 0,5% Carboximetilcelulose (CMC) em 20 mL de água mineral. Após a pesagem dos camundongos, estes foram tratados por gavagem.

### 3.5. Necropsia e coleta de tecidos

Nos dias 20 e/ou 40 de tratamento, os camundongos foram eutanasiados (guilhotina) e os tecidos foram coletados nos tempos 0,16; 0,33; 0,5; 1; 2; 3; 6 e 12h

após a administração do BNZ (cinco animais por tempo). Os órgãos foram coletados *in totum* e lavados em tampão fosfato-salino (PBS/pH 7,4), secos em papel de filtro, pesados e armazenados em freezer -80°C. Para o presente projeto foram selecionados baço, duodeno, estômago, pulmão e rim.

### 3.6. Preparo das amostras

Para as análises, os tecidos foram macerados individualmente. O baço, pulmão e rim foram macerados com Qiagen® *TissueLyser* II, o duodeno e estômago foram macerados com homogeneizador de tecidos IKA® devido ao seu tamanho e/ou quantidade. Todos os tecidos foram macerados juntamente com PBS (pH 7,4) na proporção 1 grama de tecido para 2 mL de PBS e armazenados em microtubo de centrifugação *Eppendorf*® em freezer -80 °C.

#### 3.6.1. Procedimento para extração do BNZ

Foram transferidos 5 µL do padrão interno e 100 µL de tecido para microtubo de centrifugação do tipo *Eppendorf*® de 1,5 mL. Foram adicionados 500 µL de Acetato de Etila. Em seguida, todas as amostras foram agitadas em Vórtex IKA® Genius 3 durante 10 minutos e centrifugadas durante 10 minutos a 14.000 rpm; transferiu-se 400 µL do sobrenadante para outro microtubo de centrifugação *Eppendorf*® com identificação correspondente. As amostras foram colocadas no concentrador de amostras CHRIST® em temperatura de 40°C, durante 60 minutos. Quando retiradas do equipamento, as amostras secas foram ressuspensas com 100 µL de fase móvel, agitadas em Vórtex IKA® Genius 3 durante 1 minuto e centrifugadas durante 5 minutos a 14000 rpm. Em seguida, foram transferidos 80 µL do sobrenadante para os *vials* de vidro e plástico de 300 µL que, posteriormente, foram levados para o HPLC (PERIN, 2015).

O preparo das curvas de calibração foi feito a partir das soluções padrão (BNZ e OPZ) em acetonitrila nas concentrações de 0,1 a 100,0 µg/mL de BNZ para baço, duodeno, pulmão e rim e de 0,2 a 100,0 µg/mL de BNZ para estômago, Tabela 1. Todos os pontos das curvas foram adicionados com OPZ a 30,0 µg/mL. Para todos os pontos da curva de cada tecido, foram utilizadas amostras “brancas”

maceradas; que seguiram os mesmos passos descritos acima para as amostras teste.

**Tabela 1: Curva de calibração com os valores da concentração final em meio biológico.**

<b>Concentração final em meio biológico (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Amostra de controle de qualidade</b>
100	LSQ - Limite superior de quantificação
80	CQA - Controle de qualidade de alta concentração
50	-
25	CQM - Controle de qualidade de média concentração
0,5	CQB - Controle de qualidade de baixa concentração (estômago)
0,2	CQB - Controle de qualidade de baixa concentração LIQ - Limite inferior de quantificação (estômago)
0,1	LIQ - Limite inferior de quantificação

### 3.6.2. Análise em HPLC (*high performance liquid chromatography*)

O método de análise do BNZ em órgãos empregando HPLC-DAD foi desenvolvido com base no procedimento analítico desenvolvido e validado por nosso grupo de pesquisa (PERIN, 2015).

As amostras foram analisadas por HPLC (E2695; Waters, Milford, MA) com um detector de UV (Waters 2489) usando uma coluna analítica C18 (Gemini-NX; Phenomenex, Torrance, CA; 150 mm por 4,6 mm por 5 m) e um C18 guarda de coluna (modelo AJ0-4287; Phenomenex; 4 mm por 3 mm por 5 m) mantida a 40 ° C. A fase móvel foi composta por uma mistura isocrática de acetonitrila e água ultrapura (30:70, vol / vol) com uma caudal de 1,0 mL/min. A detecção foi monitorada a 324 nm e o volume de injeção foi de 20 $\mu\text{L}$ .

### 3.7. Análise dos dados

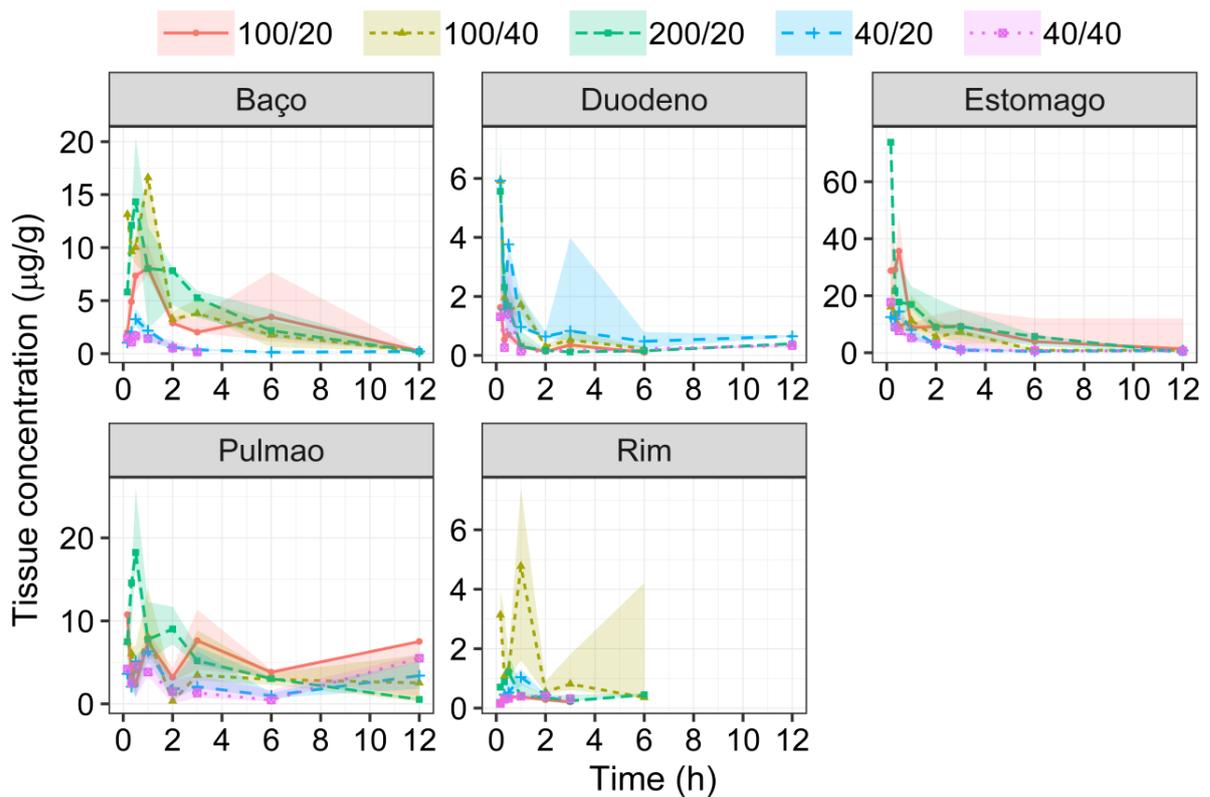
As análises foram avaliadas por modelo não linear com efeitos mistos empregando o programa NONMEN v.7.3 (ICON *Development Solutions, Ellicott City, MD, USA*) no modo de estimação condicional de primeira ordem com interação (BAUER, 2011), com compilador GNU Fortran 4.6 (*Free Software Foundation, Inc.*) e

interface PsN versão 3.5.3 (*Perlspeaks-NONMEM*, Universidade de Uppsala, Suécia) (LINDBOM, PIHLGREN, JONSSON, 2005).

O programa R, versão 3.1.2 (*R foundation for statistical computing*, Vienna, Áustria, 2014) foi utilizado para a reorganização do conjunto de dados, resumos estatísticos e elaboração de gráficos.

#### 4. RESULTADO

A Figura 3 apresenta a concentração de BNZ em relação ao tempo, após cada tratamento, no baço, duodeno, estômago, pulmão e rim. A partir destes dados foram obtidos a mediana, percentis 5%, 25%, 75% e 95% e média pelo tempo com os quais se calculou a área sob a curva (ASC), concentração máxima ( $C_{max}$ ) e tempo para a  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ), e então, foi obtida a razão de penetração ( $ASC_{0-12}$  no tecido /  $ASC_{0-12}$  no plasma), Tabela 2.



**Figura 3:** Curvas de concentração no baço, duodeno, estômago, pulmão e rim *versus* tempo do BNZ após administração de (■) 100 mg/kg/dia durante 20 dias; (■) 100 mg/kg/dia durante 40 dias; (■) 200 mg/kg/dia durante 20 dias; (■) 40 mg/kg/dia durante 20 dias; (■) 40 mg/kg/dia durante 40 dias. Linhas e pontos: medianas. Área hachurada: intervalo interquartil.

**Tabela 2: Parâmetros farmacocinéticos da distribuição tecidual do BNZ em camundongos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.**

Tratamento	Tecido	100	100	200	40	40
		mg/kg/dia 20 dias	mg/kg/dia 40 dias	mg/kg/dia 20 dias	mg/kg/dia 20 dias	mg/kg/dia 40 dias
<b>C<sub>max</sub> (µg/g)</b>	Baço	8,10 (7,57-10,34)	16,61 (11,79-16,97)	14,32 (13,08-20,43)	3,25 (2,67-4,25)	1,65 (1,59-2,01)
	Duodeno	1,63 (0,79-3,42)	5,92 (3,44-6,95)	5,56 (2,22-5,87)	5,92 (3,85-7,40)	1,41 (1,30-3,66)
	Estômago	35,59 (32,04-47,48)	16,10 (14,25-34,36)	73,82 (63,34-75,62)	14,47 (12,87- 16,38)	17,69 (16,15-22,81)
	Pulmão	10,75 (5,61-13,76)	8,06 (7,06-13,95)	18,24 (16,36-26,01)	6,33 (5,07-7,23)	5,51 (5,08-6,88)
	Rim	0,38 (0,31-0,58)	4,78 (2,79-7,41)	1,20 (1,02-1,73)	1,04 (0,77-1,31)	0,40 (0,35-0,47)
	Plasma	34,39 (28,06- 42,17)	34,36 (27,80-42,35)	59,69 (49,12-72,82)	14,24 (11,61-17,50)	13,20 (10,80-16,14)
	<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	Baço	1,00 (1,00-0,50)	1,00 (0,17-1,00)	0,50 (0,50-0,50)	0,50 (0,50-0,50)
Duodeno		0,17 (0,17-0,17)	0,17 (0,17-0,17)	0,17 (0,17-0,17)	0,17 (0,17-0,17)	0,50 (0,17-0,17)
Estômago		0,50 (0,50-0,50)	0,17 (0,17-0,17)	0,17 (0,17-0,17)	0,50 (0,50-0,50)	0,17 (0,17-0,17)
Pulmão		0,17 (1,00-0,17)	1,00 (0,17-1,00)	0,50 (0,50-0,50)	1,00 (1,00-1,00)	12,00 (12,00-1,00)
Rim		0,50 (0,50-0,17)	1,00 (0,17-1,00)	0,50 (0,50-0,50)	1,00 (1,00-1,00)	2,00 (2,00-1,00)
Plasma		0,50 (0,33-1,00)	0,50 (0,33-1,00)	0,50 (0,33-1,00)	0,50 (0,33-1,00)	0,50 (0,33-1,00)
<b>ASC<sub>0-12</sub> (µg·h/mL)</b>		Baço	32,75 (21,20-58,78)	37,81 (24,51-47,90)	41,94 (26,71-57,92)	5,68 (4,19-7,07)
	Duodeno	1,67 (1,44-2,08)	4,31 (2,96-5,72)	3,92 (3,10-4,88)	9,14 (5,98-18,15)	3,28 (2,56-4,37)
	Estômago	75,26 (53,04- 167,19)	41,50 (29,88-61,54)	81,51 (53,02- 119,13)	23,21 (17,04-26,71)	19,59 (14,51-31,53)
	Pulmão	66,00 (34,25-78,24)	37,12 (23,56-69,20)	49,66 (42,45-63,18)	27,67 (17,70-45,17)	27,91 (21,69-43,19)
	Rim	0,86 (0,73-1,02)	7,16 (4,12-17,83)	2,42 (2,16-3,50)	1,22 (0,92-1,59)	1,03 (0,91-1,18)
	Plasma	79,16 (66,98-93,17)	78,87 (66,49-93,13)	150,00 (126,93- 176,53)	32,02 (27,06-37,75)	31,08 (26,30-36,64)
	<b>ASC<sub>0-12</sub>tecido/ ASC<sub>0-12</sub>plasma</b>	Baço	0,41 (0,32-0,63)	0,47 (0,37-0,51)	0,28 (0,21-0,33)	0,17 (0,15-0,18)
Duodeno		0,02 (0,021-0,022)	0,05 (0,04-0,06)	0,02 (0,02-0,02)	0,28 (0,22-0,48)	0,1 (0,09-0,11)
Estômago		0,95 (0,80-1,79)	0,52 (0,45-0,67)	0,54 (0,41-0,67)	0,72 (0,62-0,70)	0,63 (0,55-0,86)
Pulmão		0,83 (0,51-0,83)	0,47 (0,35-0,74)	0,33 (0,33-0,35)	0,86 (0,65-1,19)	0,90 (0,82-1,17)
Rim		0,01 (0,01-0,01)	0,09 (0,06-0,2)	0,01 (0,01-0,02)	0,03 (0,03-0,03)	0,03 (0,03-0,03)

C<sub>max</sub> = concentração máxima; T<sub>max</sub> = tempo para atingir a C<sub>max</sub>; ASC<sub>0-12</sub> = área sob a curva de 0 a 12 h. ASC<sub>0-12tecido</sub> / ASC<sub>0-12plasma</sub> = razão de penetração tecidual. Os valores de plasma apresentados foram retirados do trabalho executado por PERIN (2019).

No baço, o grupo tratado com 40 mg/kg durante 20 dias apresentou concentração de BNZ até 12 horas após o tratamento ( $ASC = 5,68 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ), enquanto que os animais tratados com 40 mg/kg durante 40 dias, apresentou somente até 3 horas após o tratamento ( $ASC = 2,53 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ). A razão de penetração tecidual foi de 17 e 8%, respectivamente. Nos camundongos tratados com 100 mg/kg durante 20 dias, observou-se concentração de BNZ até 12 horas após o tratamento. Porém, o tratamento padrão apresentou menor  $C_{\text{max}}$  ( $8,10 \mu\text{g}/\text{g}$ ) em relação ao tratamento de 100 mg/kg durante 40 dias ( $16,61 \mu\text{g}/\text{g}$ ). A razão de penetração tecidual foi de 41 e 47%, respectivamente. No grupo tratado com 200 mg/kg observou-se concentração de BNZ até 12 horas após o tratamento,  $C_{\text{max}}$  menor do que o tratamento de 100 mg/kg durante 40 dias e razão de penetração tecidual de 28%.

Em relação ao duodeno, os grupos tratados com 40 mg/kg durante 20 e 40 dias apresentaram concentração de BNZ até 12 horas após o tratamento ( $ASC = 9,14$  e  $3,28 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ , respectivamente), o  $C_{\text{max}}$  de  $5,92$  e  $1,41 \mu\text{g}/\text{g}$  e razão de penetração de 28 e 10%. Os grupos tratados com 100 mg/kg durante 20 e 40 dias apresentaram concentração de BNZ até 6 horas após o tratamento, o  $C_{\text{max}}$  do tratamento de 100 mg/kg durante 20 dias foi de  $1,63 \mu\text{g}/\text{g}$ , o  $ASC$  foi de  $1,67 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  e razão de penetração de 2%. Enquanto que o  $C_{\text{max}}$  do tratamento de 100 mg/kg durante 40 dias foi igual ao do tratamento de 40 mg/kg durante 20 dias. Porém todos os outros dados diferem.

No estômago observou-se que os camundongos tratados com 40 mg/kg durante 20 dias apresentaram  $ASC = 23,21 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ , enquanto que os animais tratados com 40 mg/kg durante 40 dias, apresentou  $ASC = 19,59 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ . A razão de penetração tecidual foi de 72 e 63%, respectivamente. Nos camundongos tratados com 100 mg/kg durante 20 dias, notou-se maior  $C_{\text{max}}$  ( $35,59 \mu\text{g}/\text{g}$ ) em relação ao tratamento de 100 mg durante 40 dias ( $16,10 \mu\text{g}/\text{g}$ ). A razão de penetração tecidual ocorreu em 95 e 52%, respectivamente. O grupo tratado com 200 mg/kg durante 20 dias, apresentou  $ASC$  maior que os demais tratamentos ( $81,51 \mu\text{g}/\text{g}$ ),  $C_{\text{max}}$  de  $73,82 \mu\text{g}/\text{g}$  e razão de penetração tecidual de 54%.

No pulmão todos os tratamentos apresentaram concentração de BNZ até 12 horas. No grupo de camundongos tratados com 40 mg/kg durante 40 dias, o valor de  $ASC = 27,91 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  e  $27,67 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  para 40 mg/kg durante 20 dias. Apesar de

apresentarem valores parecidos de ASC, o  $C_{max}$  do tratamento com 40 mg/kg durante 20 dias foi um pouco maior (6,33  $\mu\text{g/g}$ ), comparado com 40 mg/kg durante 40 dias (5,51  $\mu\text{g/g}$ ). A razão de penetração tecidual foi de 86 e 90%, respectivamente. Nos camundongos tratados com 100 mg/kg durante 20 dias, observou-se  $ASC = 66,00 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  e o grupo tratado durante 40 dias obteve  $ASC = 37,12 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ , já o  $C_{max}$  encontrado para ambos foi relativamente próximo, 10,75 e 8,06  $\mu\text{g/g}$  e a razão de penetração tecidual com grande diferença, 83 e 47%, respectivamente. O grupo tratado com 200 mg/kg durante 20 dias, apresentou  $C_{max}$  maior que os tratamentos com 100 mg (18,24  $\mu\text{g/g}$ ),  $ASC$  maior que o tratamento de 100 mg durante 40 dias (49,66  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ) e razão de penetração menor do que todos os outros grupos, com 33%.

Nos rins, ambos os tratamentos com 40 mg/kg apresentaram concentrações baixas, foi possível detectar BNZ até 3 horas após a administração do fármaco. Assim como o tratamento de 100 mg/kg durante 20 dias. Os demais tratamentos foram detectados até 6 horas após o tratamento. O rim foi o órgão que apresentou valores mais baixos em todos os parâmetros farmacocinéticos, em relação aos demais, equiparando-se apenas ao duodeno, porém, a maior razão de penetração tecidual observada foi de 9% no tratamento de 100 mg/kg durante 40 dias.

## 5. DISCUSSÃO

Segundo Perdomo et al. (2013), existem evidências de que a indução de enzimas de biotransformação e/ou transporte pelo BNZ pode aumentar o *clearance* e/ou reduzir a absorção do medicamento. Além disso, investigar a farmacocinética pré-clínica de diferentes esquemas terapêuticos torna-se imprescindível para elucidação de aspectos relevantes envolvidos na atual quimioterapia da doença de Chagas (Perin, 2019).

Como já mencionado, o método de extração e cromatográfico utilizado foi anteriormente desenvolvido e validado pelo nosso grupo de pesquisa, seguindo as diretrizes do guia da *European Medicines Agency – Science Medicines Health (EMA)* do ano de 2011 (PERIN et al., 2017). É ainda importante ressaltar que os animais fizeram parte do doutorado da Dr<sup>a</sup>. Luísa Perin que avaliou a farmacocinética do BNZ e a distribuição tecidual em outros órgãos. Um modelo monocompartimental, com absorção e eliminação de primeira ordem, caracterizou a farmacocinética do BNZ, a partir desse modelo foi determinada as relações entre os parâmetros farmacocinéticos e diferentes regimes terapêuticos do BNZ e os valores de distribuição tecidual.

Os modelos animais camundongo e rato são de fácil manejo e manutenção. O modelo rato tem como vantagem a possibilidade de executar coleta seriada, o que acarretaria em dados com menor variabilidade. Entretanto, não é ideal para pesquisas relacionadas a doença de Chagas porque apresentam resistência ao desenvolvimento da doença. Enquanto que os camundongos são considerados organismos já conhecidos para testes com triagem de drogas, são mais adequados ao estudo de eficácia terapêutica e muito utilizados em pesquisas com doença de Chagas (MELO & MACHADO, 2001; CHATELAIN, 2015).

Nosso estudo demonstrou que o BNZ se distribui nos tecidos analisados de forma aleatória, com razão de penetração entre 1-95% no baço, duodeno, estômago, pulmão e rim, dependendo do tratamento realizado (Figura 3 e Tabela 2).

Ao analisarmos as concentrações plasmáticas do BNZ no baço encontramos  $C_{m\acute{a}x}$  variando entre 1,65-16,61  $\mu\text{g/g}$ . Já a  $ASC_{0-12}$  variou entre 2,53-41.94  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . Os valores de  $C_{m\acute{a}x}$  e  $ASC_{0-12}$  encontrados não foram proporcionais a dose administrada, nem há uma relação direta com o tempo de tratamento. O baço é

um órgão de alta capacidade filtrante (MEBIUS & KRAAL, 2005), dessa forma esperava-se uma concentração de BNZ elevada devido sua elevada vascularização. A aleatoriedade dos dados é observada, também, ao analisarmos as razões de penetração que variam entre 8-47%. Poucos são os estudos que avaliaram a distribuição tecidual do BNZ e, quando realizada, a análise se limitou a poucos grupos. Infelizmente, o único trabalho que analisou a distribuição do BNZ no baço foi Perin et al. (2017), porém esse trabalho foi realizado em dose única, com tempo de coleta de 6h, o que dificulta uma comparação em relação a ASC.

No duodeno, o  $C_{m\acute{a}x}$  variou entre 1,41-5,92  $\mu\text{g/g}$ ; a  $ASC_{0-12}$  entre 1,67-9,14  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  e a razão de penetração entre 0,02-0,28. Enquanto que no estômago o  $C_{m\acute{a}x}$  variou entre 14,47-73,82  $\mu\text{g/g}$ ; a  $ASC_{0-12}$  entre 19,59-81,51  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  e a razão de penetração entre 0,63-0,95. Novamente, os valores encontrados mostraram uma distribuição tecidual aleatória. Assim como reportado por Perin et al (2017), de maneira geral, o estômago apresentou elevada presença de BNZ em detrimento do duodeno. A disparidade na concentração de BNZ no estômago pode estar relacionada à forma como o órgão foi lavado no dia da necropsia, é habitual que estes órgãos sejam lavados em água corrente e PBS, mas os resultados nos levam a acreditar que a lavagem foi realizada de forma ineficiente e, possivelmente, o BNZ não foi completamente removido da parede do tecido.

No pulmão, por sua vez, o  $C_{m\acute{a}x}$  variou entre 5,51-18,24  $\mu\text{g/g}$ ; a  $ASC_{0-12}$  entre 27,67-49,66  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  e a razão de penetração entre 0,33-0,90. Como já mencionado anteriormente, os valores de distribuição tecidual do BNZ não mostraram ser dose ou tempo-dependente para os órgãos analisados nesse estudo. Os valores altos de ASC e razão de penetração tecidual de BNZ no pulmão se deve a característica de dupla circulação pulmonar e brônquica, capaz de distribuir sangue para todo o órgão, sendo considerado um órgão bem perfundido (BERNARDI, et al, 2016).

No rim, o  $C_{m\acute{a}x}$  variou entre 0,38-4,78  $\mu\text{g/g}$ ; a  $ASC_{0-12}$  entre 0,86-7,16  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  e a razão de penetração entre 0,01-0,09. Esses resultados estão em concordância com estudo anterior de Perin et al. (2017) que também relatou baixa penetração tecidual nos rins. Morilla e cols. (2003) utilizando ratos *Wistar* tratados com 0,2 mg/Kg de BNZ por via intravenosa, encontraram nos rins uma relação de 0,63% da dose administrada. O BNZ, administrado oralmente, é metabolizado no

fígado pelo sistema enzimático citocromo P450 gerando como metabólitos o 2-amino-imidazol (redução metabólica do grupo nitro) e o 2-hidroxi-imidazol (substituição hidrolítica do grupo nitro) que são excretados na urina (RAETHER & HANEL, 2003; WORKMAN *et al.*, 1984). Isso poderia reduzir a quantidade de BNZ presente em alguns órgãos, como os rins, mas para esclarecer se o metabolismo pode interferir nesta quantificação seria necessário a dosagem dos metabólitos nesse órgão.

Por fim, nosso grupo de pesquisa encontrou relação da  $ASC_{0-6}$  dos tecidos/plasma com tratamento de 100 mg/kg por 20 dias tratados com dose única, os seguintes valores em ordem decrescente de concentração: pulmão 62,2%; baço 27,4%; estômago 23,2%, duodeno 11% e rim 8% (PERIN *et al.*, 2017). Neste projeto, para o tratamento de 100 mg/kg por 20 dias (doses múltiplas), os valores para a relação a  $ASC_{0-12}$  dos tecidos/plasma, também em ordem decrescente para fins comparativos, são: estômago 95%; pulmão 83%, baço 41%; duodeno 2%; e rins 1% (Tabela 1). Apesar dos valores diferentes, nota-se a semelhança entre os tecidos que apresentam maior e menor concentração de BNZ no tratamento de 100 mg/kg/dia durante 20 dias.

## **6. CONCLUSÃO**

A distribuição do BNZ não ocorre de forma uniforme e os valores de distribuição tecidual não mostraram ser dose ou tempo-dependente para os órgãos analisados. Nossos dados reforçam a necessidade do desenvolvimento de novas formulações do BNZ que garantam distribuição tecidual mais homogênea, maior exposição e penetração tecidual.

## 7. REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, J. P. O.; TESTON A. P. M.; JUNIOR, G. Z. **Tratamento etiológico da doença de Chagas: um antigo problema de saúde.** Revista UNINGÁ. Vol.20,n.2,pp.91-96. 2014.

ALVES, R. V. **Doença de Chagas: uma nova realidade de enfrentamento.** Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/index.php/promocao-da-saude/53710-doenca-de-chagas-uma-nova-realidade-de-enfrentamento>>. Acesso em 09 de Outubro de 2019.

ARAÚJO - JORGE, T. **Doença de Chagas: Panorama geral da doença no Brasil.** 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>>. Acesso em 26 de Agosto de 2019.

ATWOOD, J. A., et al. **The *Trypanosoma cruzi* Proteome.** Science 309, 473 (2005).

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S. **Ciclo evolutivo.** Portal da Doença de Chagas - FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/ciclo-evolutivo/>>. Acesso em: 11 de Setembro de 2019.

BERNARDI, F. C, et al. **Pulmões/Pleura.** In: BRASILEIRO-FILHO, G. Bogliolo Patologia, 8º ed., Guanabara Koogan, p. 383-441, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue.** Série A. Normas e Manuais Técnicos Tiragem: 1.ª edição – 2004.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos** . Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE\\_899\\_2003\\_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b)>. Acesso em 03 de Fevereiro de 2019

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção.** 2019.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.27, de 17 de maio de 2012.** Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.pdf/c6e deb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf/c6e deb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3)>. Acesso em 03 de Fevereiro de 2019.

CALDAS, I. S.; SANTOS, E. G.; NOVAES, R.,D. **An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic, expert opinion on pharmacotherapy.** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31456439>>. Acesso em 17 de Setembro de 2019.

CASTRO, J.; DE MECCA, M.; BARTEL, L. **Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (*American trypanosomiasis*)**. Hum Exp Toxicol, v. 25, n. 8, p. 471–479, 2006.

CASTRO, S. L. & SOEIRO, M. N. C. **Drogas tripanossomicidas: Estudos pré-clínicos da doença de Chagas**. 2017.

CASTRO, J., A.; MECCA, M., M.; BARTEL, L., C. **Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (*American trypanosomiasis*)**. Human & Experimental Toxicology (2006).

CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in chagas disease drug development: A review. Drug Design, Development and Therapy, v. 9, p. 4807–4823, 2015.

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas**. Relatório de Recomendação. 2018. Disponível em: <[http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Relatorio\\_PCDT\\_Doenca\\_de\\_Chagas.pdf](http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Relatorio_PCDT_Doenca_de_Chagas.pdf)>. Acesso em 19 de Setembro de 2019.

COURA, J. R. **Tripanosomose, doença de Chagas**. ENDEMIAS /ARTIGOS. 2003.

DAVANÇO, M. G. **Farmacocinética do benzonidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada**. UNESP 2015. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/132571>>. Acesso em: 28 de Agosto de 2019.

DIAS, J. C. P., et al. **Descoberta da Doença de Chagas – O macaco, o gato e o tatu e o doutor Carlos Chagas**. 2019. Disponível em: <<http://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/descoberta-da-doenca-de-chagas-o-macaco-o-gato-e-o-tatu-e-o-doutor-carlos-chagas/>>. Acesso em: 16 de Agosto de 2019.

DE LANA & TAFURI. **Parasitologia Humana**. 11 ed. Pg. 88. São Paulo: Atheneu, 2004.

DIAS, J. C. P; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/nf9bn/pdf/dias-9788575412435-20.pdf>>. Acesso em: 17 de Setembro de 2019.

Drugs for Neglected Diseases *initiative* - DNDi. **O que é a Doença de Chagas**. 2019. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>. Acesso em 27 de Agosto de 2019.

Drugs for Neglected Diseases *initiative* - DNDi. **Doença de Chagas: tratamentos atuais**. 2019. Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/tratamentos-atuais/>>. Acesso em 27 de Agosto de 2019.

EMA (European Medicines Agency – Science Medicines Health). **Guideline on Bioanalytical Method Validation**. 2011. Acesso em 23 de Janeiro de 2019. Disponível em: <[https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)>. Acesso em 23 de Janeiro de 2019.

FACCHIN, I.; PASQUINI, C. **Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo**. Quím. Nova vol.21 no.1. 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000100010>>. Acesso em: 20 de Outubro de 2019.

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. **Conheça as principais doenças tropicais negligenciadas**. 2012. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1585&sid=32>>. Acesso em: 10 de Agosto de 2019.

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. **Doença de Chagas**. Agencia Fiocruz de Notícias. 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>>. Acesso em: 28 de Junho de 2019.

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. **Carlos Chagas**. 2019. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=109&sid=7>. Acesso em: 27 de Agosto de 2019.

GARCIA, S. B. **Doença de Chagas: os 100 anos da descoberta e a atualidade do pensamento do seu descobridor**. v. 46 – no.4 – out./dez. 2009.

GONTIJO, E. D.; SANTOS, S. E., **Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=25%3e>. Acesso em: 03 de Novembro de 2019.

DIAS, J. C. P., NETO V. A., LUNA, E. J. A., **Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2011

LARINI, L. **Fármacos e medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

MASSARO, D. C.; REZENDE, D. S.; CAMARGO, L. M. A. **Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil**. Rev Bras Epidemiol 2008; 11(2): 228-40.

MAYA, J. D. et al. **Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host**. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 146, n. 4, p. 601–620, 2007.

MAXIMIANO, F. P.; COSTA, G. Y. C.; SOUZA, J.; CUNHA-FILHO, M.S.S. **Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol**. Química Nova, v. 25, p. 1-6, 2010.

MEBIUS, R. E. & KRAAL, G. **Structure and function of the spleen.** Nature Review Immunology, v. 5, p. 606-16, Aug 2005.

MELO, R. C.; BRENER, Z. **Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains.** The Journal of parasitology, v. 64, n. 3, p. 475–482, 1978.

MIZOGUTI, I. L.; KOIAMA, J. R.; PASSOS, J. S. **Doença de Chagas: A culpa é do Açaí?** Boletim Informativo: 2018 v. 1, n. 1. 2018.

MOLINA, P., J., A.; MOLINA, I. **Chagas disease.** The Lancet, 391(10115), 82–94. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)>. Acesso em: 19 de Setembro de 2019.

NEVES. **Parasitologia Dinâmica.** 3ª ed. Pg151. São Paulo: Atheneu, 2009.

Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS. **Doenças tropicais negligenciadas.** 2019. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_joomlabook&view=topic&id=37&Itemid=232](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=37&Itemid=232)>. Acesso em 10 de Agosto de 2019.

PERDOMO, V. G. et al. Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4894–4902, 2013.

PEREIRA, D.G. **Importância do metabolismo no planejamento de fármacos.** Quim. Nova, Vol. 30, No. 1, 171-177, 2007.

PERIN, L. **Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para estudos de farmacocinética e biodistribuição do fármaco anti-chagásico benznidazol em modelo murino.** 2015. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/8542>>. Acesso em: 21 de Janeiro de 2019

PERIN, L. et al. **Pharmacokinetics and tissue distribution of benznidazole after oral administration in mice.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 61, n. 4, 2017.

PERIN, L. et al. **Population Pharmacokinetics and Biodistribution of Benznidazole in Mice.** 2019.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H. & JARDIM, I. C. F. S. **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica.** Quím. Nova. 2001, vol.24, n.1, pp.68-76. ISSN 0100-4042.

QUEIROZ, M. E.; LANÇAS, F. M. **Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência.** Quim. Nova, Vol. 28, No. 5, 880-886, 2005.

RIBEIRO, A. L. P. & ROCHA, M. O. C. **Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31(3):301-314, mai-jun, 1998.

ROCHA, M. R et al. **Vias de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil**. FIEP Bulletin. v 80 (2010).

SBCAL/COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório). **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos** - DBCA. Disponível em: <[https://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID\\_CONTEUDO=65](https://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65)>. Acesso em: 01 de Fevereiro de 2019.

SCHOFIELD, C., J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. **The future of Chagas disease control**. TRENDS in Parasitology Vol.22 No.12. October 2006.

SOBRINHO, J. L. S., et al. **Doença de Chagas: 100 anos de descoberta**. Rev. Bras. Farm., 90(4): 283-289, 2009 283.

SILVA, M. C. O.; ALVES, M. C. P.; BATISTA, C. C. C. **Farmacocinética clínica de antidepressivos, antipsicóticos e ansiolíticos**. V. 4, N. 2 (2017).

SOY, D., et al. **Population Pharmacokinetics of Benznidazole in Adult Patients with Chagas Disease**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. May 2015, 59 (6) 3342-3349;

SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias. **Doença de Chagas**. Secretaria de Estado de Saúde. 2019. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/doenca-de-chagas/doenca>>. Acesso em: 18 de Setembro de 2019.

TEMPERTON, N. J.; WILKINSON, S. R.; MEYER, J.; KELLY, M. **Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole**. Molecular and Biochemical Parasitology. V 96, 1998.

URBINA, J., A. **Chemotherapy of Chagas Disease**. Current Pharmaceutical Design, 2002.

URBINA, J. A. & DOCAMPO R. **Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances**. Tendências Parasitol. 2003.

VERÍSSIMO, S. **Carlos Chagas: História sem fim**. 1991. Disponível em: <<https://super.abril.com.br/saude/carlos-chagas-historia-sem-fim/>>. Acesso em 11 de Agosto de 2019.

WESTPHALEN, E. V. N.; BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L. **Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano**. Portal de Revistas -SES. 2012. Disponível em:

<<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/bepa/v9n105/v9n105a02.pdf>>. Acesso em: 28 de Junho de 2019.

WILKINSON, S. R. et al. **A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, n. 13, p. 5022–7, 2008.

WAGNER, J. G. **Farmacocinética clínica**. Editorial Reverté, S. A. 1983

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (*American trypanosomiasis*)**. 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 27 de agosto de 2019.