

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Rodrigo Moreira da Silva

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE BENZONIDAZOL E ITRACONAZOL NO
TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CLONES DE
TRYPANOSOMA CRUZI DE GRUPOS GENÉTICOS DISTINTOS: EFICÁCIA
TERAPÊUTICA E FARMACOCINÉTICA**

OURO PRETO/MG
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Rodrigo Moreira da Silva

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE BENZONIDAZOL E ITRACONAZOL NO
TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CLONES DE
TRYPANOSOMA CRUZI DE GRUPOS GENÉTICOS DISTINTOS: EFICÁCIA
TERAPÊUTICA E FARMACOCINÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Ouro Preto, para obtenção
do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marta de Lana
Co-orientadora: Profa. Dra. Jacqueline de Souza

OURO PRETO/MG

2011

COLABORAÇÃO

Este trabalho contou com a colaboração de:

- Profa. Dra. **Helen Rodrigues Martins** do Departamento de Farmácia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nas caracterizações moleculares dos clones de *Trypanosoma cruzi*.
- Profa. Me. **Líliam Teixeira Oliveira** do Laboratório Multiusuário do CiPharma (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, nas análises e discussões dos testes de CLAE.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais (Marília e Itamar Moreira) e irmãos (Renata e Rogério Moreira) por toda a torcida, cuidado e apoio neste período, por terem compreendido minhas ausências e estarem sempre ao meu lado apesar da distância física que nos separam.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Prof. **Marta de Lana** por toda sua orientação durante a execução deste trabalho. O seu exemplo de profissionalismo, competência e ética inspiram grande parte das minhas escolhas e interesse pela vida acadêmica;

À Prof. **Jacqueline de Souza** pela sua co-orientação, pelos momentos de aprendizado e pela convivência durante estes anos, fundamental para o meu crescimento profissional;

Às professoras e amigas **Helen Rodrigues Martins** e **Líliam Teixeira Oliveira** pela colaboração incansável no desenvolvimento deste trabalho. Sem a ajuda de vocês o caminho teria sido bem mais difícil;

Um agradecimento especial à **Jaqueline Valamiel, Girley Francisco, Victor do Bem, Evandro Marques, Maykon Tavares** e **Renata Branquinho**, aos alunos de iniciação científica e a todos os colegas do Laboratório de Doença de Chagas do NUPEB, minha “casa” desde o início de minha graduação nesta universidade e aos colegas do Laboratório de Pesquisas Clínicas e do Laboratório de Controle de Qualidade de Insumos, Fármacos e Medicamentos do CiPharma;

A todos os professores dos demais laboratórios do CiPharma, especialmente as professoras **Vanessa Mosqueira, Neila Barcellos** e **Cláudia Carneiro**, sempre de braços abertos para ajudar nas várias etapas do desenvolvimento deste trabalho;

A todos os professores do DEFAR, pelas experiências compartilhadas durante este período, especialmente a **Rosângela Barbosa, Vanja Veloso** e **Barichello** com quem pude trabalhar diretamente e vivenciar a incrível experiência docente com ética e responsabilidade;

Aos funcionários da UFOP, pelo suporte, apoio, atenção e amizade: **Mirela, Leonardo** e **John** do CiPharma, **Erika, Cristina** e **Hugo** do CCA, **Ana Salomé** do LDC, **Marcelo** da Tóxico e **Délio** do Controle de Qualidade da Escola de Farmácia;

Aos eternos amigos de Ouro Preto **Hélcio Marcondes** e **Patrícia Goto** pela união, companheirismo e por participarem destes momentos importantes da minha vida. À minha segunda família: **Regina** e **João, Val** e **William, Vanessa, Fernanda, Sulamita, Marlon, André, Marcos** e **Well** pelo carinho, preocupação, incentivo e presença constante. Ao **Wal**, pela amizade insuperável e pelos nossos sonhos que me deram impulso para o que hoje é real.

A Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma) pela oportunidade de realizar este trabalho.

RESUMO

O perfil de resistência de clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a grupos genéticos distintos em relação ao benzonidazol (BNZ) e itraconazol (ITC) foi anteriormente demonstrado em camundongos. Considerando que a associação de fármacos tem sido mais eficiente no tratamento de diversas infecções, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação BNZ + ITC na quimioterapia experimental da doença de Chagas, considerando a variabilidade genética do parasito e sua correlação com a resistência ao tratamento etiológico. Foram utilizados camundongos *Swiss* infectados via IP com 10×10^3 tripomastigotas sanguíneos de três estoques clonais pertencentes aos grupos genéticos TcI (P209 Cl1), TcV (BUG2149 Cl10) e TcII (IVV Cl4). Dez dias pós-inoculação e confirmação da infecção, os animais foram tratados via oral com 100 mg/Kg de cada composto durante 20 e 60 dias para o BNZ e ITC respectivamente, inclusive na associação dos fármacos. A avaliação da eficácia terapêutica foi feita por até 110 dias pós-tratamento por exame de sangue a fresco (ESF), hemocultura (HC), PCR e ELISA. Foram considerados curados os animais que apresentaram todos os exames negativos. O tratamento com BNZ + ITC reduziu significativamente a parasitemia além de outros parâmetros a ela relacionados nos três grupos experimentais. Os índices de cura entre os grupos tratados com BNZ, ITC e BNZ + ITC foram comparados. O tratamento com BNZ + ITC resultou em eficácia terapêutica significativamente maior em relação ao BNZ e ITC isoladamente nos animais infectados pelos três clones estudados. Os índices de cura seguiram a mesma tendência dos tratamentos isolados e apresentaram correlação com a distância filogenética entre os clones de *T. cruzi* estudados. Um método bioanalítico empregando CLAE com detecção UV precedido de extração líquido-líquido do BNZ e ITC contidos em amostras plasmáticas de animais tratados foi desenvolvido pela primeira vez. O método foi validado de acordo com as especificações do FDA e ANVISA, mostrando-se adequado para ser aplicado ao monitoramento farmacocinético no modelo murino. Os perfis plasmáticos dos fármacos administrados simultaneamente em regime de dose única revelaram significativa diminuição da concentração plasmática máxima (C_{max}) do BNZ e significativo aumento do seu tempo de meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) em comparação à monoterapia. Estes resultados sugerem que o aumento da eficácia do BNZ + ITC não se limita apenas aos distintos mecanismos de ação dos fármacos, mas também à interação farmacocinética entre eles, na qual o ITC potencializa o efeito do BNZ por prolongar sua meia-vida e conseqüentemente aumentar sua biodisponibilidade para melhor ação terapêutica.

ABSTRACT

The resistance profiles of *Trypanosoma cruzi* clonal stocks from different genetic groups in relation to benznidazole (BNZ) and itraconazole (ITC) were previously demonstrated in mice. Taking into account that the drug combination has been more effective on treatment of various infections, the aim of this study was to evaluate the association BNZ + ITC in experimental chemotherapy of Chagas disease, considering the genetic variability of the parasite and its correlation with the therapeutic resistance to etiological treatment. Swiss mice infected via IP with 10,000 blood trypomastigotes of three clonal stocks from the genetic groups TcI (P209 CL1) TcV (BUG2149 CL10) and TcII (IVV CL4) were used. Ten days after inoculation the infected animals were orally treated with 100 mg/kg of each compound for 20 and 60 days for the BNZ and ITC, respectively, including the scheme of drug association. The evaluation of treatment efficacy was carried out until 110 days post-treatment by fresh examination (ESF), hemoculture (HC), PCR and ELISA. Animals that showed all negative examinations were considered cured. The treatment with BNZ + ITC reduced significantly the parasitemia and other related parameters of the three experimental groups. The index of cure obtained with BNZ, ITC and BNZ + ITC treatments were compared. The treatment with BNZ + ITC resulted in significant higher therapeutic efficacy in relation to BNZ and ITC administered separately in the groups infected with the three clones studied. The index of cure followed the same tendency of the isolated treatments and showed correlation with the phylogenetic distance between the clones of *T. cruzi* studied. A bioanalytical method using HPLC-UV with liquid-liquid extraction of the drugs in the plasmatic samples from animals treated was first developed. This method was validated according to the specifications of FDA and ANVISA and was suitable for its application in pre-clinical monitoring in murine model. The pharmacokinetic profiles of the drugs simultaneously administered in single dose regimen showed significant decrease of maximum plasma concentration (C_{max}) of BNZ and its significant increase of half-life of elimination ($t_{1/2\beta}$) in relation to monotherapy. These results suggest that the increase of the effectiveness of the associated chemotherapy (BNZ + ITC) is not limited only to the distinct mechanisms of action of the drugs involved, but also due to the pharmacokinetic interaction between them, in which the ITC enhances the effect of BNZ and its half-life time and thereby increasing its bioavailability for better therapeutic action.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula estrutural do benzonidazol..... 18
- Figura 2.** Fórmula estrutural do itraconazol. 20
- Figura 3.** Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl) de *Trypanosoma cruzi* tratados com benzonidazol (BNZ) e não tratados..... 56
- Figura 4.** Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl) de *Trypanosoma cruzi* tratados com itraconazol (ITC) e não tratados..... 56
- Figura 5.** Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl) de *Trypanosoma cruzi* tratados com a associação de benzonidazol e itraconazol (BNZ + ITC) e não tratados. 57
- Figura 6.** Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone BUG2149 Cl10 (TcV) de *Trypanosoma cruzi* tratados com benzonidazol (BNZ) e não tratados. . 58
- Figura 7.** Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone BUG2149 Cl10 (TcV) de *Trypanosoma cruzi* tratados com itraconazol (ITC) e não tratados. 58
- Figura 8.** Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone BUG2149 Cl10 (TcV) de *Trypanosoma cruzi* tratados com a associação de benzonidazol e itraconazol (BNZ + ITC) e não tratados..... 59
- Figura 9.** Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone IVV Cl4 (TclI) de *Trypanosoma cruzi* tratados com benzonidazol (BNZ) e não tratados. 60
- Figura 10.** Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone IVV Cl4 (TclI) de *Trypanosoma cruzi* tratados com itraconazol (ITC) e não tratados. 60
- Figura 11.** Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone IVV Cl4 (TclI) de *Trypanosoma cruzi* tratados com a associação benzonidazol e itraconazol (BNZ + ITC) e não tratados. 61
- Figura 12.** Cromatogramas do BNZ, ITC e PI nas concentrações de 100µg/mL extraídos a 324 e 263 nm utilizando acetonitrila e água na proporção de 60:40 (v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, e temperatura de 40°C. 65
- Figura 13.** Cromatogramas superpostos referentes às análises de amostra de plasma branco obtida de animal sadio sem a administração de BNZ e ITC comparado ao perfil cromatográfico do padrão analítico extraído a 324 nm, utilizando acetonitrila e água na proporção de 60:40 (v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, e temperatura de 40°C. 66

Figura 14. Cromatogramas superpostos referentes às análises de amostra de plasma branco obtida de animal sadio sem a administração de BNZ e ITC comparado ao perfil cromatográfico do padrão analítico extraído a 263 nm, utilizando acetonitrila e água na proporção de 60:40 (v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, e temperatura de 40°C.	67
Figura 15. Curvas de calibração do método analítico para quantificação de (A) BNZ e (B) ITC em plasma por cromatografia a líquido de alta eficiência utilizando acetonitrila e água na proporção de 60:40 (v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, e temperatura de 40°C.	68
Figura 16. Cromatogramas da determinação de BNZ e ITC em amostras de plasma de animais tratados com 5 mg de cada fármaco coletadas em (A) 0,5; 1 e 2 horas após administração e (B) 1, 3 e 5 horas após administração.....	74
Figura 17. Perfil médio das concentrações plasmáticas de BNZ administrado separadamente e em associação com ITC em camundongos (n = 5) após dose oral única de 5 mg de cada fármaco.	78
Figura 18. Perfil médio das concentrações plasmáticas de ITC administrado separadamente e em associação com BNZ em camundongos (n = 5) após dose oral única de 5 mg de cada fármaco.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura das linhagens do <i>Trypanosoma cruzi</i> , 1999.	11
Tabela 2. Nomenclatura para a classificação das linhagens do <i>Trypanosoma cruzi</i> a partir de 2009.	12
Tabela 3. Interações medicamentosas do itraconazol.	17
Tabela 4. Seleção dos clones de <i>Trypanosoma cruzi</i> pertencentes aos genótipos principais baseada no perfil de resistência ao BNZ e ITC (Toledo <i>et al.</i> , 2003).	32
Tabela 5. Preparo das amostras de plasma padrão utilizadas na curva de calibração da quantificação do benzonidazol e itraconazol em plasma de camundongo.	42
Tabela 6. Preparo das amostras de plasma de controle de qualidade utilizadas para a quantificação do benzonidazol e itraconazol em plasma de camundongo.	43
Tabela 7. Parâmetros de parasitemia médio em camundongos Swiss (n = 8) infectados com diferentes grupos genéticos do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com benzonidazol e itraconazol empregados separadamente e em associação.	63
Tabela 8. Índice de cura e porcentagem de falha terapêutica acumulada detectada no diagnóstico de infecção pelo <i>T. cruzi</i> empregando os métodos de avaliação parasitológicos e sorológico.	64
Tabela 9. Recuperação média (n = 5) do procedimento de purificação das amostras de plasma de controle de qualidade adicionadas de BNZ e ITC (padrões) e diazepam (padrão interno).	67
Tabela 10. Parâmetros relativos à linearidade do método analítico para quantificação de BNZ e ITC em plasma de camundongo por cromatografia líquida de alta eficiência.	68
Tabela 11. Resultados de precisão e exatidão intra e inter-ensaios referentes ao método analítico para quantificação de BNZ e ITC em plasma de camundongo por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados expressam a média da análise de seis amostras para precisão e exatidão intra-ensaio e seis determinações por dia, durante 3 dias, para precisão e exatidão inter-ensaios.	69
Tabela 12. Estabilidade do BNZ em amostras de plasma de camundongo, analisadas após permanência à temperatura ambiente por 4 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações. .	70
Tabela 13. Estabilidade do ITC em amostras de plasma de camundongo, analisadas após permanência à temperatura ambiente por 4 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações. .	70

Tabela 14. Estabilidade do BNZ em amostras de plasma de camundongo mantidas à temperatura de -20°C e submetida a um, dois e três ciclos de congelamento e descongelamento e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações.	71
Tabela 15. Estabilidade do ITC em amostras de plasma de camundongo mantidas à temperatura de -20°C e submetida a um, dois e três ciclos de congelamento e descongelamento e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações.	71
Tabela 16. Estabilidade do BNZ em amostras de plasma de camundongo purificadas e mantidas a temperatura ambiente por 48 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações.....	71
Tabela 17. Estabilidade do ITC em amostras de plasma de camundongo purificadas e mantidas a temperatura ambiente por 48 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações.....	72
Tabela 18. Estabilidade do BNZ em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas 120 dias após o preparo e armazenadas a - 20°C e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de três determinações.	72
Tabela 19. Estabilidade do BNZ em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas 120 dias após o preparo e armazenadas a - 20°C e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de três determinações.	73
Tabela 20. Parâmetros farmacocinéticos do BNZ administrado em camundongos após dose oral única de 5 mg.	75
Tabela 21. Parâmetros farmacocinéticos do ITC administrado em camundongos após dose oral única de 5 mg.	75
Tabela 22. Parâmetros farmacocinéticos do BNZ após administração de sua associação com ITC, ambos em dose oral única de 5 mg.	76
Tabela 23. Parâmetros farmacocinéticos do ITC após administração de sua associação com BNZ, ambos em dose oral única de 5 mg.	76
Tabela 24. Parâmetros farmacocinéticos médios do BNZ e ITC administrados em camundongos, separadamente e em associação, após dose oral única de 5 mg de cada fármaco (média ± desvio padrão de cinco curvas farmacocinéticas).	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASC	Área sob a curva
BNZ	Benzonidazol
BNZ + ITC	Benzonidazol + Itraconazol
CCA	Centro de Ciência Animal
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
C_{max}	Concentração Máxima
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CV	Coefficiente de variação
CYP	Citocromo P450
DP	Desvio padrão
DPMP	Dia do pico máximo de parasitemia
DTU	Discrete Typing Unity
EDTA	Ácido etilenodietildinitrotetracético
ELISA	Enzyme Linked-Immuno-sorbent Assay
ESF	Exame de sangue à fresco
Guanidina-HCl	Cloridrato de guanidina
HC	Hemocultura
IC	Índice de cura
IgG	Imunoglobulina G total
ITC	Itraconazol
LD	Limite de detecção
Log P	Coefficiente de partição
LQ	Limite de quantificação
PI	Padrão interno
PMP	Pico máximo de parasitemia
PP	Período patente
PPP	Período pré-patente
T_{½β}	Meia-vida de eliminação
T_{max}	Tempo de concentração máxima
UV	Ultravioleta
λ_z	Coefficiente de eliminação
µg	Microgramas (10 ⁻⁶ gramas)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Quimioterapia da Doença de Chagas	6
2.2. A Variabilidade Genética do <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
2.2.1. Estrutura Populacional	9
2.2.2. Influência Genética nos Mecanismos de Resistência e Suscetibilidade a Quimioterapia.....	12
2.3. A Politerapia como Estratégia Terapêutica.....	14
2.3.1. Sinergismo por Diferentes Mecanismos de Ação	15
2.3.2. Interações Farmacocinéticas.....	16
2.4. Características Farmacoquímicas e Propriedades Farmacocinéticas	17
2.4.1. Benzonidazol.....	18
2.4.2. Itraconazol	20
2.5. Monitoramento Farmacocinético	23
2.5.1. Desenvolvimento de Método Bioanalítico	23
2.5.2. Validação	25
2.5.3. Parâmetros Farmacocinéticos.....	25
3. JUSTIFICATIVA.....	28
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivo Geral.....	30
4.2. Objetivos Específicos	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
PARTE I – Avaliação da Eficácia Terapêutica dos Tratamentos com BNZ, ITC e BNZ + ITC em Camundongos Infectados com Clones de <i>T. cruzi</i> de Diferentes Grupos Genéticos	32

5.1. Amostras de <i>T. cruzi</i>	32
5.2. Animais.....	33
5.3. Confirmação da Infecção	33
5.3.1. Exame de Sangue a Fresco (ESF)	33
5.3.2. Hemocultura (HC).....	33
5.4. Esquema de Tratamento	34
5.5. Parâmetros Empregados na Avaliação da Eficácia Terapêutica.....	34
5.5.1. Avaliação da Mortalidade.....	34
5.5.2. Avaliação da Parasitemia (PAR)	35
5.5.2.1. Parâmetros Derivados da Curva de Parasitemia (PPP, PP, PMP, DPMP)	35
5.5.3. Avaliação Parasitológica	35
5.5.3.1. Exame de Sangue a Fresco (ESF).....	35
5.5.3.2. Hemocultura (HC).....	35
5.5.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	36
5.5.4. Avaliação Sorológica pela ELISA.....	36
5.6. Critério de Cura	37
5.7. Análises Estatísticas	37
5.8. Delineamento Experimental I	38
PARTE II – Desenvolvimento e Validação do Método Bioanalítico para Quantificação de BNZ e ITC.....	39
5.9. Substâncias Químicas de Referência	39
5.10. Reagentes e Instrumentos	39
5.11. Equipamentos	40
5.12. Desenvolvimento de Método Bioanalítico para Quantificação de Benzonidazol e Itraconazol em Plasma de Camundongo.....	40

5.13. Condições Cromatográficas	40
5.14. Purificação das Amostras de Plasma de Camundongo para Quantificação de Benzonidazol e Itraconazol	41
5.15. Preparo dos Padrões de Calibração.....	42
5.16. Preparo dos Padrões de Controle de Qualidade	43
5.17. Preparo de Amostras de Plasma Branco.....	43
5.18. Validação do Método para Quantificação do Benzonidazol e Itraconazol em Plasma de Camundongo	43
5.18.1. Especificidade.....	44
5.18.2. Recuperação	44
5.18.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação Inferior.....	45
5.18.4. Linearidade	45
5.18.5. Precisão	46
5.18.6. Exatidão	47
5.18.7. Estabilidade.....	47
5.18.7.1. Estabilidade de Curta Duração	48
5.18.7.2. Estabilidade em Ciclos de Congelamento e Descongelamento	48
5.18.7.3. Estabilidade Pós-Processamento.....	48
5.18.7.4. Estabilidade de Longa Duração	48
5.18.7.5. Estabilidade das Soluções Padrão	49
5.19. Delineamento Experimental II	49
PARTE III – Avaliação Farmacocinética de Camundongos Tratados com BNZ, ITC e BNZ + ITC	50
5.20. Fármacos	50
5.21. Animais.....	50
5.22. Esquema de Tratamento	50

5.23. Coleta, Processamento e Armazenamento das Amostras de Plasma.....	51
5.24. Quantificação do Benzonidazol e Itraconazol nas Amostras de Plasma de Camundongo	51
5.25. Determinação dos Parâmetros Farmacocinéticos.....	52
5.26. Análises Estatísticas.....	53
5.27. Delineamento Experimental III	53
6. RESULTADOS	55
PARTE I – Avaliação da Eficácia Terapêutica dos Tratamentos com BNZ, ITC e BNZ + ITC em Camundongos Infectados com Clones de <i>T. cruzi</i> de Diferentes Grupos Genéticos	55
6.1. Confirmação da Infecção	55
6.2. Parâmetros Empregados na Avaliação da Eficácia Terapêutica.....	55
6.2.1. Avaliação da Mortalidade.....	55
6.2.2. Avaliação da Parasitemia.....	55
6.2.2.1 Parâmetros Derivados da Curva de Parasitemia	62
6.2.3. Avaliação da Eficácia Terapêutica	63
PARTE II – Desenvolvimento e Validação do Método Bioanalítico para Quantificação de BNZ e ITC.....	65
6.3. Desenvolvimento do Método Bioanalítico	65
6.3.1. Condições Cromatográficas	65
6.3.2. Purificação das Amostras de Plasma de Camundongo para Quantificação de Benzonidazol e Itraconazol	66
6.4. Validação do Método para Quantificação do Benzonidazol e Itraconazol em Plasma de Camundongo	66
6.4.1. Especificidade	66
6.4.2. Recuperação	67
6.4.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação Inferior.....	67
6.4.4. Linearidade	68

6.4.5. Precisão	68
5.4.6. Exatidão	69
6.4.7. Estabilidade	70
6.4.7.1. Estabilidade de Curta Duração	70
5.4.7.2. Estabilidade em Ciclos de Congelamento e Descongelamento	70
6.4.7.3. Estabilidade Pós-Processamento.....	71
6.4.7.4. Estabilidade de Longa Duração	72
6.4.7.5. Estabilidade das Soluções Padrão	73
PARTE III – Avaliação Farmacocinética de Camundongos Tratados com BNZ, ITC e BNZ + ITC	74
6.5. Quantificação do Benzonidazol e Itraconazol nas Amostras de Plasma de Camundongo.	74
6.6. Avaliação Farmacocinética	74
7. DISCUSSÃO	80
PARTE I – Avaliação da eficácia terapêutica dos tratamentos com BNZ, ITC e BNZ+ITC em camundongos infectados com clones de <i>T. cruzi</i> de diferentes grupos genéticos.....	80
PARTE II – Desenvolvimento e Validação do Método Bioanalítico para Quantificação de BNZ e ITC.....	86
PARTE III – Avaliação Farmacocinética de Camundongos Tratados com BNZ, ITC e BNZ + ITC	89
8. CONCLUSÕES	94
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
10. ANEXOS	119

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descoberta e descrita pelo médico sanitário Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909). Trata-se de uma infecção causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, cuja transmissão exige a participação de um vetor, o triatomíneo, conhecido popularmente pelos nomes de barbeiro, fincão, chupança e classificado biologicamente como um artrópode da classe Insecta, ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (Gaunt & Miles, 2000). As espécies de maior importância epidemiológica na América do Sul são *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (WHO, 2007).

Durante muitos anos, o *T. cruzi* fez parte de um ecossistema exclusivamente americano, extensivamente disperso no continente desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile (Dias *et al.*, 2002). No entanto, devido à intensificação das migrações internacionais, a doença de Chagas também pode ser encontrada em regiões consideradas não endêmicas, como em alguns países da Europa e Japão (Sztajzel *et al.*, 1996), Austrália e Ásia (Schmunis, 2007). O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastidae e família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência de um único flagelo e do cinetoplasto, uma estrutura que corresponde a uma condensação de DNA mitocondrial, denominado kDNA. As formas evolutivas do parasito abrangem as tripomastigotas (forma infectante), epimastigotas (formas de multiplicação no vetor e em culturas) e amastigotas (formas que se multiplicam dentro das células do hospedeiro vertebrado).

A maior parte dos casos de infecção ocorre pela via vetorial. Mesmo com a instituição de programas de controle da doença que objetivam a eliminação dos triatomíneos domiciliados, como a Iniciativa dos Países do Cone Sul (1991) e o Programa de Controle da América Central (1997), a descontinuidade de tais intervenções por parte da Vigilância Epidemiológica favoreceu a reinfestação das áreas abrangidas pelos programas de controle e a colonização de novas áreas onde a ação antrópica aproxima o homem dos vetores silvestres (Coura *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2002). Além da via vetorial, também são epidemiologicamente importantes a via transfusional sanguínea, a transmissão por órgãos transplantados e a transmissão vertical ou via congênita (Blanco *et al.*, 2000; Prata, 2001; WHO, 1991). Outra via de

transmissão descrita como microepidemia de casos agudos na região da Bacia Amazônica brasileira é a infecção por via oral através de alimentos contaminados com fezes do vetor infectado (Dias, 2006).

A doença de Chagas pode ser dividida em fase aguda e fase crônica. A fase aguda ocorre logo após a infecção e um subsequente período de incubação. Trata-se de uma fase de curta duração, caracterizada por febre, miocardite, linfadenopatia e hepato-esplenomegalia, ou podendo passar despercebida, visto que os sintomas são semelhantes aos de várias outras infecções. No entanto, a ocorrência dos sinais de porta de entrada tais como o sinal de Romaña (Romaña, 1935) e o chagoma de inoculação (Mazza & Freire, 1940) auxiliam muito na suspeita clínica desta infecção. Com a instalação da resposta imune do hospedeiro, as manifestações da fase aguda regridem e instala-se gradativamente a fase crônica, caracterizada por um parasitismo escasso, que pode perdurar durante toda a vida do indivíduo. A fase crônica da doença de Chagas pode ocorrer sob a forma indeterminada, na qual o paciente não apresenta sintomatologia do ponto de vista clínico, e/ou sob as formas cardíaca e/ou digestiva, decorrentes da evolução clínica tardia da doença (10 a 20 anos ou mais), causando manifestações clínicas graves e irreversíveis (Prata, 2001). A forma cardíaca, devido a fenômenos de autoimunidade do organismo que podem resultar em lesões, destruição das fibras do miocárdio e produção de fibrose, leva a quadros de miocardite grave e cardiomegalia, que podem apresentar prognóstico e evolução variáveis, desde pequenas alterações eletrocardiográficas até insuficiência cardíaca, ou progredindo para uma eventual morte súbita. Quando se instala a forma digestiva, esta apresenta dilatações (megaesôfago e megacólon) e alterações funcionais do trato gastrintestinal, devido a lesões no sistema nervoso autônomo intramural, parasitismo tecidual e resposta imune do hospedeiro (Coura *et al.*, 1983; Tafuri, 1987; Dias 1992).

Durante anos, as estimativas apontavam a infecção de 20 milhões de pessoas pelo parasito além de outros 100 milhões que se encontravam em risco de contrair a doença na America Latina. Em 2009, após ter se alcançado um estado de controle efetivo dessa endemia, ainda era estimada a existência de aproximadamente 10 milhões de indivíduos infectados no mundo, sendo três milhões destes somente no Brasil. Atualmente, a doença de Chagas é responsável pela ocorrência de mais de 10.000 mortes por ano e mais de 25 milhões de pessoas

estão em risco de infecção (WHO, 2010).

No entanto, os esforços no sentido de controlar a doença de Chagas na maioria dos países endêmicos para a redução da prevalência de pessoas infectadas (Schofield *et al.*, 2006) não serão capazes de atingir a erradicação da doença se não forem constantes. A falta de interesse político pelas regiões consideradas epidemiologicamente importantes, muitas destas isoladas como comunidades rurais e outras, apesar de urbanizadas, compostas por populações pobres, muitas vezes com infra-estrutura sanitária precária e atendimento médico escasso, impedem o sucesso no controle da doença.

Além da manutenção do combate aos vetores locais que evitariam a reincidência de epidemias, o diagnóstico e tratamento dos pacientes infectados são ações primordiais para melhorar o prognóstico e a evolução clínica da doença. Neste sentido, os avanços no conhecimento sobre o ciclo de vida e metabolismo do *T. cruzi* adquirido e os avanços nos conhecimentos da tecnologia farmacêutica têm sido grandes aliados no longo processo da descoberta de uma possível cura para a doença de Chagas.

O interesse em realizar pesquisas científicas relacionadas à quimioterapia da doença de Chagas tem crescido significativamente no Brasil e em países vizinhos em razão do grande número de pessoas infectadas. Um fator agravante desse quadro tem sido o fato de os grandes centros mundiais não se interessarem pela produção de medicamentos que não proporcionem altos lucros e vendas. Exemplo disso foi o que ocorreu em março de 2003, quando o grupo farmacêutico suíço *Roche* anunciou a doação ao governo brasileiro do direito de patente e de uso da tecnologia do medicamento Rochagan[®] (benzonidazol). O governo brasileiro concedeu ao Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) o direito de sua produção e, atualmente este é o único laboratório no mundo a produzir um medicamento destinado ao tratamento específico da doença de Chagas. Além de ser o único tratamento disponível para a população infectada, o benzonidazol não apresenta resultados satisfatórios devido à reduzida eficácia na fase crônica da infecção, além de baixa segurança quanto aos efeitos colaterais observados.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Quimioterapia da Doença de Chagas

A busca por uma terapia medicamentosa adequada ao tratamento da doença de Chagas continua a ser um desafio para muitos pesquisadores desde a descoberta da moléstia em 1909 (Chagas, 1909). Os primeiros compostos empregados não possuíam resultados efetivos contra o parasito. Foram testados compostos a base de arsênio (atoxil), antimonial trivalente (tártaro emético) e cloreto de mercúrio, empregados experimentalmente por Mayer & Rocha Lima em 1912 (Coura & Castro, 2002).

Somente no final da década de 60 e início da década de 70 é que dois fármacos obtiveram relativo sucesso para o tratamento da doença de Chagas. Em 1967, foi introduzida na terapêutica a classe de fármacos dos nitrofuranos (Bock *et al.*, 1969). Entre estes, o nifurtimox, um 5-nitrofurano, revelou-se o mais efetivo. Em 1972, o derivado 2-nitroimidazólico denominado benzonidazol, mostrou-se ainda mais eficaz no tratamento da doença de Chagas (Schofield *et al.*, 2006).

O nifurtimox e o benzonidazol apresentam atividade significativa na fase aguda da doença, com curas parasitológicas de até 80% em pacientes tratados, sendo esta cura definida como um resultado negativo para todos os testes parasitológicos e sorológicos (Rassi *et al.*, 2000). Sua eficácia pode variar de acordo com a área geográfica, provavelmente como consequência das diferenças na suscetibilidade ao fármaco entre cepas do *T. cruzi* (Coura *et al.*, 1997).

Durante 20 anos, o tratamento específico com nifurtimox ou benzonidazol foi indicado apenas para a fase aguda da doença. Acreditava-se que a resposta autoimune do hospedeiro fosse responsável pelas lesões cardíacas, e conseqüentemente, pelo desenvolvimento das manifestações clínicas mais severas (Cunha-Neto *et al.*, 1995). O tratamento só passou a ser indicado também para a fase crônica no final da década de 90, quando ficaram evidentes os benefícios do tratamento no prognóstico da doença, uma vez que a presença do parasito é o principal fator que desencadeia os mecanismos de desenvolvimento das lesões e sua evolução clínica (Andrade *et al.*, 1989; 1991; Segura *et al.*, 1994).

Em 2005 foi investigada a eficácia do benzonidazol em camundongos infectados com *T. cruzi* na fase crônica e observou-se que ocorria diminuição da parasitemia e da miocardite no

grupo tratado quando comparado ao grupo não tratado. Estes resultados mostraram que o tratamento com benzonidazol na fase crônica da infecção, foi capaz prevenir o desenvolvimento de cardiopatia chagásica crônica severa, mesmo sem a completa eliminação dos parasitos (Garcia *et al.*, 2005).

No entanto, questões relativas ao uso do nifurtimox e benzonidazol muitas vezes inviabilizavam a terapêutica: ambos os fármacos são utilizados em esquemas de tratamento prolongados e apresentam importantes reações adversas, sendo os efeitos colaterais indesejáveis o seu principal inconveniente na manutenção do tratamento (Urbina, 2001; Coura & Castro, 2002; Guedes *et al.*, 2006).

Os efeitos colaterais mais frequentemente observados com o uso de nifurtimox são anorexia, perda de peso, alteração psíquica, excitação ou alteração do sono e manifestações digestivas como náuseas, vômitos, cólicas e diarreia. No caso do benzonidazol, as reações adversas incluem manifestações cutâneas, como hipersensibilidade e dermatite com erupções, além de edema generalizado, febre, linfadenopatia, dor articular e muscular, em função da ocorrência de depressão da medula óssea e polineuropatia (Castro *et al.*, 2006).

Mais de um século se passou, diversas moléculas foram sintetizadas e estudadas, mas o fármaco ideal para o tratamento etiológico da doença de Chagas ainda não foi descoberto. Desde a década de 1980, o nifurtimox (Lampit, Bayer[®]) teve sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul. Isto se deu em razão da resistência apresentada pelas cepas e, sobretudo, pelo desinteresse do laboratório farmacêutico em continuar a produção de um medicamento não lucrativo (Coura & Castro, 2002). Atualmente, o benzonidazol é o único medicamento que se encontra disponível para o tratamento humano.

O desenvolvimento de fármacos mais seletivos, eficazes e menos tóxicos requer melhor conhecimento do ciclo de vida e do metabolismo do *T. cruzi*. A busca por alvos mais específicos, baseadas em diferenças fisiológicas, bioquímicas e moleculares entre o parasito e o hospedeiro, bem como os estudos de moléculas envolvidas nos mecanismos de infecção, virulência e nas vias metabólicas essenciais do parasito, podem ser alvos promissores para o desenvolvimento racional de novos fármacos. Além disso, a utilização de fármacos já existentes e comercializados para outros fins terapêuticos que levam a uma resposta terapêutica desejada

contra o parasito pode ser útil para o controle da doença à medida que impacta na sua transmissão (Urbina, 2001; Coura & Castro, 2002; Guedes *et al.*, 2006).

Outros alvos explorados que apresentaram atividade “*in vitro*” e/ou “*in vivo*” foram os inibidores da biossíntese de nucleotídeos, inibidores de fosfatidilcolina e esfingomiéline, inibidores da via glicolítica, inibidores da DNA topoisomerase II e inibidores da via do ergosterol (Guedes *et al.*, 2006; Maya *et al.*, 2007).

Ainda outra vertente explora a potencial ação anti-*T. cruzi* presente em extratos de plantas e produtos naturais, o que levou à investigação de diversas classes de compostos responsáveis pela atividade antiparasitária, como naftoquinonas, terpenóides, isoflavonas e alcalóides (Bernardes *et al.*, 2006). Os naftoimidazóis, substâncias extraídas da árvore do gênero *Tabebuia* (os ipês) e testadas em camundongos infectados com *T. cruzi*, foram bastante efetivos contra todas as formas do parasito. Sua toxicidade pode ser reduzida através de modificações moleculares, mas apenas três dos 60 derivados naftoimidazólicos são capazes de inibir o crescimento dos parasitos em 50% (Furtado, 2006).

Dentre os diversos fármacos com mecanismos de ação distintos testados nos últimos anos e que mostraram atividade anti-*T. cruzi* “*in vitro*” e/ou “*in vivo*” destacam-se os inibidores de enzimas da via do ergosterol. Estudos realizados na Venezuela e no Brasil mostraram que estes fármacos possuem potencial ação tripanocida “*in vitro*”. Entre os comercialmente disponíveis, estão aqueles aplicados com sucesso no tratamento de fungos, como o cetoconazol, o fluconazol e o itraconazol (Urbina, 2002).

Mais recentemente, outros triazóis, tais como o ravuconazol (Bristol-Myers Squibb), com potente atividade antifúngica “*in vitro*” e “*in vivo*”, tiveram resultados comparáveis ou superiores a outros triazóis, tais como posaconazol e variconazol. Também o TAK-187 (Takeda Companhia Química) e o UR-9825 (Grupo Uriach), potentes agentes anti-*T. cruzi* “*in vitro*” e “*in vivo*”, inclusive contra cepas resistentes ao nifurtimox e benzonidazol, produziram elevados índices de cura parasitológica na quimioterapia experimental, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença de Chagas (Urbina *et al.*, 2003).

O uso promissor dos inibidores da biossíntese do ergosterol para o tratamento da doença de Chagas estimulou pesquisas realizadas com estes compostos por repetidas vezes. No entanto, os resultados na quimioterapia experimental observados tanto por diferentes grupos

de pesquisadores, como pelos mesmos grupos em diferentes ocasiões, mostram-se contraditórios. Uma possível explicação proposta para os casos onde ocorreu falha terapêutica tem sido as variações naturais da suscetibilidade aos fármacos entre as várias cepas de *T. cruzi*. Por esse motivo, vários estudos têm tentado estabelecer correlações entre as diferentes propriedades biológicas do parasito, como a resistência a quimioterapia empregada em relação a variabilidade genética (Andrade & Magalhães *et al.*, 1997; Toledo *et al.*, 2002).

2.2. A Variabilidade Genética do *Trypanosoma cruzi*

2.2.1. Estrutura Populacional

O *T. cruzi* apresenta elevada heterogeneidade intraespecífica, sendo constituída por várias sub-populações que circulam nos ambientes silvestre e doméstico e entre os seres humanos, animais, reservatórios e vetores. Essas diferenças foram primeiramente demonstradas através de caracterização biológica. Brener & Chiari (1963) iniciaram uma divisão dos isolados em grupos que apresentavam formas tripomastigotas sanguíneas delgadas ou largas e posteriormente passaram a considerar características biológicas relacionadas à virulência do parasito em estudos experimentais *in vivo* (Brener, 1969). Posteriormente Andrade (1974) dividiu as populações do parasito em três tipos biológicos (tipos I, II e III), considerando o perfil da curva de parasitemia, mortalidade, tropismo tecidual e resistência aos fármacos convencionalmente utilizados no tratamento da doença de Chagas (benzonidazol e nifurtimox), que por sua vez apresentaram correlação com o perfil eletroforético de isoenzimas que agrupou as cepas do parasito estudadas por Andrade & Magalhães (1997) em Biodemas I, II e III, respectivamente. Também foi demonstrado (Andrade e Magalhães, 1997) que parasitos do Tipo I eram altamente suscetíveis ao tratamento, enquanto que os do Tipo II exibiram moderada a alta suscetibilidade e os do Tipo III foram altamente resistentes a ambos os fármacos, confirmando assim, que a suscetibilidade ao BNZ estava associada às diferenças morfológicas e biológicas das populações do parasito.

A partir da década de 70 e 80, com o advento de metodologias bioquímicas (MLEE -

Multilocus Enzyme Electrophoresis) e da biologia molecular, respectivamente, e a introdução de diferentes marcadores para as populações de *T. cruzi*, deu-se início aos estudos filogenéticos das populações em busca de diferentes marcadores que pudessem correlacionar a sua diversidade genética com suas propriedades biológicas, fatores clínicos e dados epidemiológicos da doença. As denominações de Zimodemas e Esquizodemas foram então criadas para os diferentes agrupamentos de parasitos considerando os perfis de isoenzimas e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Miles *et al.* 1977, 1978, 1981; Morel *et al.*, 1980; Carneiro *et al.*, 1990).

Mais tarde, Tibayrenc e Ayala (1988) fizeram um estudo ampliado com 121 amostras de *T. cruzi* isoladas de diferentes regiões, em diversos países endêmicos, abrangendo hospedeiros vertebrados e invertebrados do ciclo silvestre e doméstico da doença de Chagas e identificaram a presença de quatro zimodemas ubíquos, com a maior frequência de distribuição geográfica encontrada até então, constituindo mais de 50% dos isolados (Tibayrenc & Brenière, 1988) e por isso denominados Genótipos Principais 19, 20, 32 e 39 deste parasito (Tibayrenc, 1995). Devido à descoberta de sua importância epidemiológica, estes quatro zimodemas ubíquos se tornaram o principal alvo de estudos biológicos e epidemiológicos a eles relacionados. A avaliação do polimorfismo do DNA genômico destas populações, detectadas através de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) apresentou elevado grau de homologia com o perfil de isoenzimas, o que caracteriza e fortalece o caráter clonal das populações de *T. cruzi* (Steindel *et al.*, 1993).

Com o contínuo avanço nos estudos filogenéticos das populações do *T. cruzi*, vários marcadores foram explorados na caracterização molecular, entre eles, os Ribodemas, ou os perfis eletroforéticos da subunidade 18S do RNA ribossomal e da subunidade 24S α do DNA ribossomal, (Souto *et al.*, 1996; Souto & Zingales, 1993), o DNA fingerprint (Vago *et al.*, 1996) e o perfil de microsátélites (Oliveira *et al.*, 1998).

Assim, no decorrer de anos de pesquisa, os subgrupos das populações do *T. cruzi* receberam diferentes designações correspondentes entre si, fato este fortemente indicativo de um parasito que apresenta estrutura e evolução clonal (Tibayrenc, 1998). A primeira padronização com a finalidade de agrupar os isolados em apenas dois grandes grupos que relacionavam marcadores moleculares (protéicos e genéticos) e imunológicos comuns foi

realizada por Tibayrenc em 1993, que instituiu a classificação DTU (Discrete Typing Unity 1 e 2) com alta correspondência aos padrões anteriormente descritos, grande especificidade epidemiológica e larga distribuição geográfica.

Posteriormente, num encontro internacional para a comemoração dos 90 anos da descoberta da doença de Chagas em 1999, no Rio de Janeiro, um comitê de pesquisadores especialistas estabeleceu a convergência da nomenclatura de todas as linhagens do *T. cruzi* (Anonymous, 1999) em dois maiores grupos denominados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Um terceiro grupo, denominado simplesmente *T. cruzi*, essencialmente composto pelos isolados que apresentaram caráter genético híbrido ou inconclusivo, permaneceu com esta nomenclatura até que pudesse ser mais bem estabelecida sua relação filogenética com os demais grupos –

Tabela 1.

Tabela 1. Nomenclatura das linhagens do *Trypanosoma cruzi*, 1999.

Grupos Genéticos	Classificações correlacionadas	Referência
<i>T. cruzi</i> I	Zimodema I	Miles <i>et al.</i> , 1978
	DTU 1	Tibayrenc, 1993
	Genótipos 19 e 20	Tibayrenc, 1995
<i>T. cruzi</i> II	Zimodema 2	Miles <i>et al.</i> , 1978
	DTU 2	Tibayrenc, 1993
	Genótipo 32	Tibayrenc, 1995
<i>T. cruzi</i>	Zimodema 3	Miles <i>et al.</i> , 1978
	DTU 2	Tibayrenc, 1993
	Genótipo 39	Tibayrenc, 1995

Mais de uma década se passou e com o desenvolvimento de novos marcadores multilocos para o estudo da diversidade genética do *T. cruzi*, novas subdivisões e classificações surgiram. Em 2000, Brisse e colaboradores fragmentaram a classificação das DTUs proposta por Tibayrenc em 1993, a fim de entender melhor a estrutura populacional do grupo *T. cruzi* II, e por isso, subdividiu a DTU 2 em cinco sub-linhagens, sendo IIa, IIb, IIc, IId e IIe. Destas, IIa e IIc apresentaram padrão de *T. cruzi* I, somente IIb foi considerado como linhagem pura para o padrão de *T. cruzi* II e as linhagens IId e IIe foram consideradas produtos de eventos de hibridização entre *T. cruzi* I e IIb (Sturm *et al.*, 2003).

Em 2006 surge o grupo *T. cruzi* III, proposto por Freitas e colaboradores, representado pela linhagem *T. cruzi* IIc. Esta classificação estabelecida com base em análises de microssatélites e marcadores mitocondriais subdividiu as populações do *T. cruzi* em TcI, TcII, TcIII e híbridos.

Finalmente, num Segundo Encontro Satélite que aconteceu em Agosto de 2009, em Búzios, promovido pelo Congresso Internacional de Parasitologia, Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia e Encontro Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, o comitê de especialistas reconheceu que a nomenclatura para as linhagens do *T. cruzi* deveria ser classificada em seis DTUs: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (Zingales *et al.*, 2009). O rearranjo entre a classificação anterior e a atual foi padronizado de acordo com a **Tabela 2**.

Tabela 2. Nomenclatura para a classificação das linhagens do *Trypanosoma cruzi* a partir de 2009.

Classificação atual	Correspondências anteriores
TcI	<i>T. cruzi</i> I e DTU I
TcII	<i>T. cruzi</i> II e DTU IIb
TcIII	<i>T. cruzi</i> III e DTU IIc
TcIV	DTU IIa
TcV	DTU IId
TcVI	DTU IIe

2.2.2. Influência Genética nos Mecanismos de Resistência e Suscetibilidade a Quimioterapia

A teoria da evolução clonal é admitida para o *T. cruzi* pelo fato deste parasito apresentar reprodução predominantemente assexuada (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc & Ayala, 1988) com ocorrência rara de fenômenos de hibridização (Machado & Ayala, 2001), consequentemente com fluxo genético limitado (reprodução assexuada), o que faz com que o parasito evolua de forma independente em áreas geográficas isoladas, como clones naturais estáveis, que acumulam mutações e adquirem características próprias. Esta característica pressupõe sua estabilidade genética no tempo e no espaço.

A hipótese decorrente da teoria clonal para o *T. cruzi* permite concluir que existe correlação entre a variabilidade genética do parasito e suas propriedades biológicas de

virulência, patogenicidade e epidemiologia (Tibayrenc & Brenière, 1988), uma vez que os genes que controlam tais propriedades se acumulam entre os descendentes (Tibayrenc *et al.*, 2003). Esta correlação tem sido confirmada por diversos trabalhos em infecções experimentais em camundongos (Lana *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2002), vetores (Lana *et al.*, 1998) e “*in vitro*” (Revollo *et al.*, 1998).

Levando em conta os parâmetros mais relacionados ao interesse deste trabalho, foi demonstrado que de um modo geral, as populações pertencentes ao grupo TcI (*T. cruzi* I) apresentaram maior habilidade de infectar e completar seu ciclo de vida no vetor da espécie *Triatoma infestans* (Lana *et al.*, 1998), maior capacidade de diferenciação em tripomastigotas sanguíneos e maior capacidade de multiplicação no hospedeiro vertebrado (Andrade *et al.*, 1983; Andrade & Magalhães, 1997; Laurent *et al.*, 1997) do que as populações do grupo TcII (*T. cruzi* II). Clones pertencentes às classificações híbridas (TcIII, TcIV, TcV e TcVI), e conseqüentemente com perfil de maior variabilidade nas propriedades biológicas, vez por outra apresentam um comportamento, ora semelhante ao grupo TcI, ora semelhante ao grupo TcII.

Especificamente em relação à resposta a quimioterapia, alguns autores relatam que cepas do grupo TcI (*T. cruzi* I) apresentam elevado grau de resistência, enquanto as cepas do grupo TcII (*T. cruzi* II) são mais suscetíveis (Andrade *et al.*, 1985; Andrade & Magalhães, 1997; Toledo *et al.*, 2003). No que se refere a quimioterapia com nifurtimox e benzonidazol, a sensibilidade do grupo TcI (*T. cruzi* I) é menor em relação aos clones do grupo TcII (*T. cruzi* II), que apresentam menor capacidade de crescimento em cultura celular e acelular e são menos virulentos em camundongos. Clones pertencentes aos grupos híbridos, devido às suas características genéticas intermediárias entre os grupos, apresentam diferentes padrões de resposta a esses fármacos e maior desvio padrão, em relação aos grupos TcI e TcII (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II) que apresentaram valores mais elevados e menores, respectivamente, para os mesmos parâmetros biológicos (Revollo *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2003).

Ao investigar essa associação entre a divergência filogenética e resposta à quimioterapia, Toledo e cols. (2003, 2004) observaram importantes diferenças na sensibilidade ao benzonidazol e ao itraconazol em infecções experimentais em camundongos BALB/c. Os resultados demonstraram clara correlação entre a genética do parasito e a suscetibilidade à

quimioterapia com esses fármacos, corroborando correlações já descritas anteriormente para as demais propriedades biológicas (Revollo *et al.*, 1998; Lana *et al.*, 1998). Foi observado que clones pertencentes ao grupo TcI (*T. cruzi* I) foram os mais resistentes ao tratamento com benzonidazol, enquanto clones dos grupos híbridos apresentaram diferentes padrões de resposta, alguns sensíveis, outros resistentes ao tratamento. Clones pertencentes ao grupo TcII (*T. cruzi* II) apresentaram um típico padrão de suscetibilidade ao benzonidazol.

Em relação ao tratamento com itraconazol, os resultados seguiram a mesma tendência de correlação entre a distância genética e a sensibilidade a quimioterapia. Clones pertencentes ao grupo TcI (*T. cruzi* I) também apresentaram maior resistência ao tratamento (100% em ambas as fases da infecção), enquanto clones pertencentes ao grupo TcII (*T. cruzi* II) apresentaram menor resistência (Toledo *et al.*, 2003). Os clones dos grupos híbridos apresentaram diferentes padrões de resposta ao tratamento com este fármaco com perfis variando de resistência a suscetibilidade.

Estes resultados foram confirmados por estudos realizados em humanos no Chile (Rozas *et al.*, 2007). Cepas de *T. cruzi* obtidas de indivíduos infectados foram isoladas e caracterizadas. Os resultados do tratamento mostraram que as cepas pertencentes ao grupo TcI (*T. cruzi* I) foram mais resistentes tanto ao alopurinol quanto ao itraconazol, enquanto aquelas pertencentes ao grupo TcII (*T. cruzi* II) foram mais suscetíveis ao itraconazol.

2.3. A Politerapia como Estratégia Terapêutica

Em 1998, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estipulou as exigências que devem ser atendidas para um fármaco ser considerado ideal para o tratamento da doença de Chagas: cura parasitológica de casos agudos e crônicos, ação eficaz com uma única dose ou poucas doses, acessibilidade aos pacientes com baixo custo, reduzidos efeitos colaterais e ausência de efeitos teratogênicos, nenhuma necessidade de hospitalização para o tratamento e nenhuma indução de resistência.

Visando atingir a maioria desses objetivos, as associações medicamentosas estão sendo amplamente promovidas como terapêutica de primeira linha em programas de acesso a diversos tratamentos (Farias *et al.*, 2006) em que classes variadas de fármacos são associadas. Essas combinações podem ser apresentadas em uma única forma farmacêutica, o que melhora

a comodidade do tratamento e facilita a adesão do paciente. Outra possibilidade é realizar associações com formas farmacêuticas separadas, em diferentes esquemas posológicos de utilização, visando melhorar a eficácia terapêutica e resultar em melhor tolerabilidade em relação aos efeitos adversos intrínsecos de uma quimioterapia específica.

Os benefícios advindos da utilização de uma associação terapêutica podem estar relacionados tanto ao sinergismo de diferentes mecanismos de ação, quanto a modificações em propriedades farmacocinéticas resultantes de uma associação.

2.3.1. Sinergismo por Diferentes Mecanismos de Ação

Diversas doenças severas, como a tuberculose, hanseníase e AIDS somente são controladas se forem tratadas com uma combinação de fármacos com diferentes mecanismos de ação. Assim, uma combinação bem planejada pode, além de aumentar a ação dos diferentes compostos terapêuticos por sinergismo, ajudar a evitar o desenvolvimento de resistência dos agentes infecciosos aos quimioterápicos, sejam eles bactérias, vírus ou protozoários (Bass Jr *et al.*, 1994; Majori, 2004; Mbuagbaw *et al.*, 2010).

No caso da doença de Chagas, uma extensa distribuição da forma intracelular amastigota dos parasitos nos tecidos e células, durante as fases aguda e crônica da doença, é o fator que causa maior dificuldade para a ação de um fármaco específico (Croft, 1999). Mas a combinação com um fármaco que apresente características farmacológicas capazes de atingir os parasitos extra-circulantes poderia trazer resultados mais satisfatórios para a terapêutica atual.

Algumas propostas de tratamento combinatório de fármacos como nova estratégia para o tratamento da doença de Chagas foram sugeridas por Coura (2009), incluindo sempre o nifurtimox ou benznidazol, como fármaco específico, em associação com um inibidor da via do ergosterol (cetoconazol, fluconazol ou itraconazol). Esses derivados azólicos são comercializados no mercado nacional e sua aplicação terapêutica é indicada com sucesso no tratamento antifúngico. Como o *T. cruzi*, assim como os fungos, requer esteróis específicos para a proliferação e a viabilidade de suas células em todos os estágios de seu ciclo, o tratamento da doença de Chagas com inibidores da biossíntese de esteróis pode resultar em relativa eficácia

(Urbina, 2001).

Mesmo havendo um número expressivo de compostos triazólicos com esse tipo de ação tripanocida demonstrada até o momento, somente três foram submetidos a ensaios clínicos: cetoconazol, itraconazol e alopurinol, apresentando todos eles resultados contraditórios. Apesar de não terem sido capazes de erradicar a infecção em animais ou humanos, sabe-se que o seu mecanismo de ação certamente produz profundas alterações no protozoário. Especificamente, a terapêutica com o itraconazol mostrou resultados promissores na regressão e prevenção da evolução clínica da doença de Chagas em pacientes infectados (Apt *et al.*, 2003, 2005).

A politerapia para o tratamento da doença de Chagas foi primeiramente testada na infecção experimental em camundongos (Araújo *et al.*, 2000), e foi demonstrado o efeito sinérgico positivo da combinação do benzonidazol com cetoconazol para as cepas Y e Cl, parcialmente resistente e sensível, respectivamente, ao nitroderivado. Assim, a associação do benzonidazol com fármacos inibidores da biossíntese do ergosterol pode contribuir para a terapêutica atual da doença de Chagas.

2.3.2. Interações Farmacocinéticas

A administração simultânea de fármacos requer muita cautela, considerando a possibilidade da ocorrência de interações medicamentosas que podem resultar em efeitos farmacológicos inesperados, com aumento ou diminuição da absorção, metabolismo e eliminação do fármaco, ocasionando potencialização ou perda da eficácia terapêutica (Fuhr, 2000; Oga *et al.*, 2002; Hardman & Limbird, 2003).

Em relação ao benzonidazol, não há relatos sobre a sua interação com outros medicamentos que poderiam aumentar ou diminuir a concentração plasmática máxima ou prolongar o tempo do pico de concentração (Raether & Hanel, 2003).

Em relação ao itraconazol, fármacos que reduzem a acidez do estômago, como antimuscarínicos, antiácidos, inibidores da bomba de prótons e antagonistas do receptor H2 de histamina, podem reduzir sua absorção (Martindale, 2005). Além disso, tanto o itraconazol como o seu principal metabólito, hidroxí-itraconazol, são inibidores do sistema enzimático

citocromo P450 (CYP) 3A4, podendo diminuir a eliminação de fármacos metabolizados por essa enzima e resultar em concentrações plasmáticas aumentadas destes, prolongando os efeitos terapêuticos e adversos, quando administrados concomitantemente. Em contrapartida, as concentrações plasmáticas de itraconazol também podem ser aumentadas ou diminuídas por outros fármacos que apresentam capacidade de alterar sua absorção, ou ainda de induzir ou inibir as enzimas do sistema citocromo P450 (CYP) 3A4 (Janssen-Ortho Inc[®]) – **Tabela 3**.

Tabela 3. Interações medicamentosas do itraconazol.

Fármacos cuja concentração plasmática é aumentada pelo itraconazol	
Anticonvulsivantes	Carbamazepina
Antimicobactericidas	Rifabutin
Antineoplásicos	Busulfan, docetaxel, alcalóides da vinca
Antipsicóticos	Pimozide
Benzodiazepínicos	Alprazolam, diazepam, midazolam, triazolam
Bloqueadores de Canais de Cálcio	Diidropiridinas (incluindo nisoldipina), verapamil
Alcalóides do Ergot	Diidroergotamina, ergometrina (ergonovina), ergotamina,
Agentes de Motilidade Gastrointestinal	Cisapride
Glicocorticoesteróides	Budesonida, dexametasona, metilprednisolona, fluticasona
Inibidores da HMG-CoA Redutase	Atovastatina, cerivastatina, lovastatina, sinvastatina
Agonistas de Receptores 5-HT ₁	Eletriptan
Imunossupressores	Ciclosporina, tacrolimos, sirolimos
Hipoglicemiantes Orais	Repaglinida
Inibidores de Protease	Indinavir, ritonavir, saquinavir
Anticoagulantes Orais	Warfarina
Fármacos que diminuem a concentração plasmática do itraconazol	
Antimicobactericidas	Ionized, rifabutin, rifampin
Neutralizadores de Ácido Gástrico	Antiácidos, agonistas de receptor H ₂ , inibidores da bomba de prótons
Inibidores da Transcriptase Reversa	Nevirapina
Fármacos que aumentam a concentração plasmática do itraconazol	
Antibióticos Macrolídeos	Claritromicina, eritromicina
Inibidores de Protease	Indinavir, lopinavir/ritonavir, ritonavir

2.4. Características Farmacoquímicas e Propriedades Farmacocinéticas

As características farmacoquímicas e propriedades farmacocinéticas do BNZ e ITC empregados na quimioterapia associada de camundongos infectados com clones de *T. cruzi* pertencentes a grupos genéticos distintos, estão descritas a seguir:

2.4.1. Benzonidazol

Nome químico: N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida (Martindale, 2005).

Fórmula molecular: $C_{12}H_{12}N_4O_3$ (Martindale, 2005).

Fórmula estrutural:

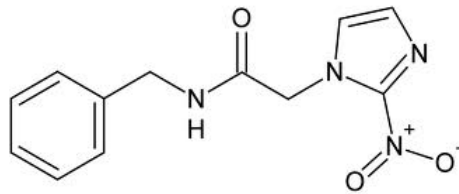


Figura 1. Fórmula estrutural do benzonidazol.

Massa molecular: 260,2 g/mol (Martindale, 2005).

Ponto de fusão: 189°C (United States National Library of Medicine).

Solubilidade: o BNZ é praticamente insolúvel em água. 0,4 mg dissolve em 1 mL de água, em pH 6,5 e à 37°C (Kasim *et al.*, 2004; Lamas *et al.*, 2006).

Coeficiente de partição: o BNZ apresenta valor de log P igual a 0,7 (Maximiano *et al.*, 2010), o que não garante a imediata permeação da molécula, que só ocorreria com substâncias com Log P_{ow} superiores a 1,3 (Kasim *et al.*, 2004).

Sistema de Classificação Biofarmacêutica: classe 4 – baixa solubilidade e baixa permeabilidade (Maximiano *et al.*, 2010).

Formas farmacêuticas disponíveis: comprimidos de 100mg, frasco com 100 unidades (Roche®).

Excipientes: os excipientes usados na formulação do BNZ produzido pela Roche Companhia

Farmacêutica, de nome comercial Rochagan®, incluem amido de milho, lactose, talco e estearato de magnésio (Roche®).

Posologia: na quimioterapia experimental utilizando o modelo murino, o BNZ é administrado por via oral em doses diárias de 100 mg/Kg durante 20 dias. Em humanos, o BNZ é administrado por via oral em doses diárias de 5 a 7 mg/kg de peso corporal, devendo ser dividida em duas tomadas, com intervalo aproximado de 12 horas entre elas. O tratamento é mantido usualmente por 60 dias consecutivos. Crianças com menos de doze anos de idade podem receber doses maiores (até o máximo de 10 mg/kg de peso corporal) durante os primeiros dez a vinte dias de tratamento, dividido em duas doses diárias (Martindale, 2005).

Absorção: estudos realizados em humanos revelam que a absorção oral do BNZ é rápida e praticamente total, com concentrações plasmáticas máximas alcançadas entre 2 a 4 horas (Roche®). Voluntários saudáveis que receberam uma dose de 100 mg via oral tiveram picos de níveis plasmáticos de 2,2–2,8 µg/mL em cerca de 3–4 h após a administração (Raaflaub & Ziegler, 1979; Raether & Hanel, 2003). Em estudos de múltiplas doses em pacientes que receberam 7 mg/kg do BNZ, as concentrações foram semelhantes aos valores calculados no estudo de dose única. Em todos os pacientes, as concentrações de equilíbrio amostradas no décimo dia de tratamento variou entre 5,4 a 16,4 mg/mL e foram superiores à concentração tripanocida (3–6 mg/L) eficaz *in vitro*.

Distribuição: a biodisponibilidade absoluta e o volume aparente de distribuição relatados são de 92% e 0,56 L/kg, respectivamente. Sua ligação às proteínas plasmáticas é moderada (44%). Os valores de área sob a curva de concentração plasmática em função do tempo (ASC) demonstram pouca variação interindividual (Raaflaub & Ziegler, 1979).

Metabolismo e excreção: a meia-vida de eliminação plasmática observada em humanos varia de 10,5 a 13,6 horas, com média de aproximadamente 12 horas (Raaflaub & Ziegler, 1979). Em cães, os valores de meia-vida de eliminação variam entre 9 e 11 horas (Workman *et al.*, 1984). O BNZ é primariamente eliminado por biotransformação no fígado com apenas 20% da dose

excretada na urina sob a forma inalterada. A caracterização dos metabólitos produzidos em ratos, cães, macacos e seres humanos utilizando BNZ radiomarcado com C_{14} na posição 2 no anel imidazol, possibilitaram a identificação, em todas as quatro espécies avaliadas, de dois metabólitos presentes na urina: 2-amino-imidazol (redução metabólica do grupo nitro) e 2-hidroxi-imidazol (substituição hidrolítica do grupo nitro) (Raether & Hanel, 2003).

2.4.2. Itraconazol

Nome químico: (\pm) -*cis*-4-[4-[4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]-1-piperazinil]-fenil]-2,4-diidro-2-(1-metilpropil)-3*H*-1,2,4-triazol-3-ona) (United States National Library of Medicine).

Fórmula molecular: $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$ (United States National Library of Medicine).

Formula Estrutural:

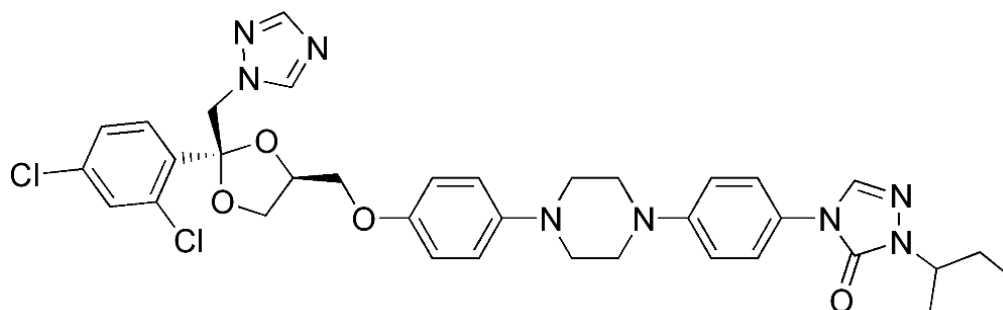


Figura 2. Fórmula estrutural do itraconazol.

Massa molecular: 705,64 g/mol (United States National Library of Medicine).

Ponto de fusão: 165 - 169°C (Peeters *et al.*, 2002).

Solubilidade: praticamente insolúvel em água e em soluções ácidas diluídas. A solubilidade aquosa do composto é estimada em aproximadamente 1 ng/mL no pH neutro e aproximadamente 4 μ g/mL em pH 1 (Peeters *et al.*, 2002). O maior valor de solubilidade

encontrado foi de 6 µg/mL em solução de HCl 0,1 N e pH 1 (Verreck *et al.*, 2003). É possível obter soluções em concentrações maiores que 10 mg/mL em solventes orgânicos como dimetilsulfóxido e polietileno glicóis acidificados (PEGs). Soluções aquosas de 5 mg/mL requer adição de 5% de dimetil-β-ciclodextrina (Archibald & Axel, 2005).

Coeficiente de partição: ITC apresenta alto coeficiente de partição em octanol e água, com valor maior que 5 em pH 6, sendo 5,66 em solução tampão pH 8,1 (Janssen-Ortho Inc[®]). O log P calculado é 6,2 (Beule, 1996; Kapsi & Ayres, 2001; Peeters *et al.*, 2002).

Sistema de Classificação Biofarmacêutica: classe 2 – baixa solubilidade e alta permeabilidade.

Formas farmacêuticas disponíveis: ITC está atualmente disponível em duas apresentações farmacêuticas sob o nome comercial Sporanox[®] (Janssen Pharmaceutica, Orlando, Nova Jersey): cápsulas de gelatina dura contendo 100 mg do fármaco revestido em esferas de açúcar e solução oral (10 mg/mL), contendo 400 mg/mL de hidroxipropil-β-ciclodextrina.

Excipientes: a forma farmacêutica sólida comercial de ITC (Sporanox[®]) contém revestimento com esferas de açúcar, gelatina, hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol, amido, sacarose e dióxido de titânio (Janssen-Ortho Inc[®]; Woo *et al.*, 2008).

Absorção: em humanos, as concentrações plasmáticas máximas são alcançadas entre 1,5 e 5 horas após administração via oral (cápsulas ou solução). A concentração plasmática máxima no estado de equilíbrio é atingida em 15 dias de tratamento e chega a cerca de 2 µg/mL após doses diárias de 200 mg (Martindale, 2005). ITC é uma substância lipofílica, praticamente insolúvel em água. É provável que a solubilidade seja o passo limitante na absorção. Assim, para facilitar a solubilização é aconselhável que a administração da forma farmacêutica sólida oral seja logo após as refeições. Por se tratar de uma base fraca (pKa = 3,7), ITC é ionizado e solubilizado em água somente em pH com valores baixos. Por isso, a acidez gástrica é necessária para a dissolução e absorção adequada do fármaco. Absorção diminuída é observada em jejum (até 40% menor) e em pacientes com baixa acidez gástrica devido à

hipocloridria ou outras complicações gástricas observadas em pacientes infectados por HIV (até 50% menor) (Koks *et al.*, 2002). O principal sítio de absorção do ITC é o trato intestinal delgado proximal (Miller *et al.*, 2008).

Distribuição: o volume de distribuição aparente do ITC é 11 L/Kg em humanos e 17 L/Kg em cães. A ligação às proteínas plasmáticas, principalmente albumina, é de 99,8% para o ITC e 99,5% para o hidroxí-itraconazol, seu principal metabólito, altamente ativo (Janssen-Ortho Inc[®]). Alguns estudos mostram que o ITC apresenta significativa variabilidade nos níveis plasmáticos de pacientes e que, muitas vezes a dosagem deve ser ajustada individualmente (Van Peer *et al.*, 1989; Rifai *et al.*, 1995). As concentrações do referido fármaco no sangue total é cerca de 60% das encontradas no plasma (Paula *et al.*, 2009). Tecidos como a pele, unhas, músculos e fígado acumulam grandes concentrações do fármaco, enquanto fluidos corporais, tais como cerebrospinal, humor aquoso, saliva e escarro contém níveis indetectáveis (Koks *et al.*, 2002).

Metabolismo e excreção: ITC é metabolizado principalmente no fígado pelo sistema enzimático P450 (CYP) 3A4 em um grande número de metabólitos. O metabólito principal é o hidroxí-itraconazol, que tem uma atividade antifúngica comparável à do ITC. As principais vias metabólicas identificadas são as vias de oxidação do anel dioxolano, oxidação alifática no 1-metilpropil substituinte, N-desalquilação do 1-metilpropil substituinte, degradação oxidativa da piperazina e cisão do triazol (Janssen-Ortho Inc[®]). A excreção fecal do fármaco inalterado varia entre 3 a 18% da dose. A excreção renal é menor que 0,03%, mas após uma semana de tratamento, esta aumenta para 35% e a fecal para 54% da dose. Pequenas quantidades são eliminadas no estrato córneo e cabelo. Além disso, o ITC não pode ser removido por diálise (Martindale, 2005). A eliminação do ITC em humanos é bifásica, com uma meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) no plasma de aproximadamente 20 horas após uma única dose de 100 mg. No estado de equilíbrio, o $t_{1/2\beta}$ aumenta para 30 h, indicando que ocorre saturação do mecanismo de excreção (Martindale, 2005; Koks *et al.*, 2002).

2.5. Monitoramento Farmacocinético

A integração entre os conceitos de biofarmácia, farmacocinética e farmacodinâmica permite a compreensão dos fenômenos decorrentes da exposição de um determinado organismo a um fármaco. A administração de um medicamento provoca o aparecimento de um efeito farmacoterapêutico, cujas duração e intensidade dependem da concentração do princípio ativo no local de ação. As variações desta concentração nos fluidos corporais em função do tempo dependem da disponibilização (fase biofarmacêutica - liberação e dissolução do fármaco) e da transformação do princípio ativo no organismo (fase farmacocinética).

Para uma determinada dose, as concentrações plasmáticas de um fármaco administrado pela via intravenosa variam segundo a amplitude da sua distribuição e da sua velocidade de eliminação. No caso de uma administração extravascular, as concentrações plasmáticas dependem, além disso, da disponibilização e da absorção. O ajustamento de um regime posológico para obter concentrações plasmáticas flutuantes dentro de um desvio terapêutico necessita da determinação de parâmetros farmacocinéticos. (LeBlanc *et al.*, 1997).

A crescente utilização de conceitos farmacocinéticos ainda pode auxiliar os estudos de associação de fármacos pela interpretação de dados obtidos de um monitoramento farmacocinético. Este monitoramento, durante o estágio pré-clínico, utiliza modelos animais para a avaliação preditiva de atividade intrínseca, toxicidade e posologia (Meibohm & Derendorf, 2002).

A avaliação farmacocinética envolve aspectos experimentais e teóricos. Os aspectos experimentais incluem o desenvolvimento de técnicas de amostragem biológica, métodos bioanalíticos para a quantificação de fármacos e seus metabólitos e procedimentos que facilitam a coleta e manipulação de dados. Já o principal aspecto teórico trata-se do desenvolvimento de um modelo farmacocinético que prevê o destino do fármaco após sua administração.

2.5.1. Desenvolvimento de Método Bioanalítico

Apesar do amplo uso de associações medicamentosas na terapêutica, as interações que

podem ocorrer como resultado dessas associações nem sempre são satisfatoriamente elucidadas de maneira a garantir a segurança dessa utilização. Para tanto, é necessário padronizar um método bioanalítico capaz de quantificar com precisão e exatidão as concentrações plasmáticas dos fármacos oriundos de uma associação medicamentosa, a fim de determinar os parâmetros farmacocinéticos e realizar o monitoramento terapêutico.

O desenvolvimento de métodos bioanalíticos é complexo, e envolve a avaliação e otimização de condições, incluindo etapas de preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação. Este desenvolvimento baseia-se em vários fatores, que incluem a estrutura e características físico-químicas dos fármacos, grau de pureza, quantidade de amostra e finalidade da análise, bem como a disponibilidade de equipamentos e reagentes (Causon, 1997).

A análise cromatográfica de fármacos presentes em matriz biológica requer um pré-tratamento da amostra, devido à existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a baixa concentração das substâncias a serem analisadas. Assim, as técnicas de extração e pré-concentração podem ser consideradas etapas limitantes do processo de análise de fármacos em matrizes biológicas. Estas podem ser executadas por diferentes procedimentos como extração em fase sólida, precipitação de proteínas, extração líquido-líquido, extração com fluido supercrítico ou com membranas sólidas (diálise e ultra-filtração) ou líquidas (Queiroz *et al.*, 2001). A meta final é a obtenção de uma fração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada em um tempo razoável de análise. Mais de um tipo de técnica pode ser utilizada para o preparo de determinada amostra, mas a escolha da técnica deve levar em conta a simplicidade, rapidez, baixo custo, alta recuperação, fornecimento de extratos relativamente livre de interferentes e boa exatidão e precisão para os analitos de interesse (Lanças, 2004; Gonçalves, 2005).

Na literatura existem vários métodos cromatográficos descritos para quantificação do itraconazol e seu metabólito, hidroxí-itraconazol, em plasma. Alguns utilizam o sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector UV (CLAE-UV) (Gubbins *et al.*, 1998; Compas *et al.*, 1996) ou de fluorescência (Srivatsan *et al.*, 2004) e outros utilizam Cromatografia Líquida acoplada a Espectômetro de Massas (CL-EM) (Carrier & Parent, 2000).

Para o benzonidazol, os métodos desenvolvidos empregam CLAE-UV (Workman, 1984; Morilla *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2007). Os procedimentos de extração plasmática descritos para ambos os fármacos empregam precipitação de proteínas, extração em fase sólida e extração líquido-líquido. Não existem relatos de métodos bioanalíticos para quantificação dos fármacos associados.

2.5.2. Validação

Todas as etapas envolvidas no desenvolvimento de um método bioanalítico devem ser descritas detalhadamente. Esse cuidado tem sido amplamente recomendado pelos pesquisadores da área devido a significativas dificuldades em obter resultados reprodutíveis pelos métodos publicados (Souza, 2005) e visam facilitar a conformidade do método desenvolvido à normatização da legislação brasileira que requer o estabelecimento de evidências objetivas da confiabilidade e adequação do seu uso através da validação.

Validação de um método é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (NBR ISO 9000). Dessa forma a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que a metodologia desenvolvida atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequada para o seu propósito, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (Mullett, 2007). Representantes da comunidade científica, das indústrias e agências reguladoras do Brasil, EUA e Europa apresentam excelentes discussões sobre estratégias e modelos experimentais a serem adotados na validação de métodos bioanalíticos publicados como guias (US-FDA, 2001; Brasil, 2003) onde os parâmetros fundamentais incluem avaliação da especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção, recuperação e estabilidade do fármaco na matriz biológica. A descrição detalhada de como executar cada um destes testes pode ser encontrada na resolução RE n°. 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Brasil, 2003).

2.5.3. Parâmetros Farmacocinéticos

A obtenção de parâmetros farmacocinéticos auxilia na compreensão da ocorrência de efeitos inesperados, informando dados sobre metabolização, vias de transporte de fármacos, determinação da dose ideal e previsão de eventos que podem ocorrer devido à mudança da posologia (Tozer & Rowland, 2009).

Para o estudo farmacológico de uma droga, devem ser levados em conta alguns fatores essenciais relacionados a ação transportadora do sangue, primordial sob o ponto de vista fisiológico. Esta cinética de distribuição progressiva de um fármaco se caracteriza, entre outros aspectos, pela construção de modelos que representam um sistema de compartimentos no organismo e nos quais se supõe que o fármaco se distribui depois de administrado. Após sua introdução na corrente sanguínea, por um processo de absorção, o fármaco se distribui nesses compartimentos e entra em estado de equilíbrio com os fluidos, tecidos ou órgãos de distribuição. Como consequência deste equilíbrio, as trocas de concentração do fármaco no sangue indicam trocas de concentração em outros compartimentos. (Cárcamo, 1982).

Dentre os processos farmacocinéticos a absorção é aquela na qual um fármaco deixa seu local de administração e alcança o fluxo sanguíneo. A absorção pode ser avaliada a partir da construção de uma curva da concentração do fármaco em função do tempo, sendo os principais parâmetros relacionados: C_{max} (concentração plasmática máxima), T_{max} (tempo para atingir a concentração plasmática máxima) e ASC (área sob a curva de concentração plasmática pelo tempo). Após a absorção o fármaco é distribuído pelo organismo, sendo o VD (volume de distribuição) o parâmetro que melhor representa esta etapa, seguida da eliminação representada pela biotransformação e/ou excreção. A biotransformação, ou metabolismo, geralmente mediado por enzimas, converte o fármaco em um composto diferente do originalmente administrado por meio de reações químicas. O parâmetro farmacocinético que representa a velocidade na qual este processo ocorre é o $T_{1/2\beta}$ (meia-vida de eliminação), que reflete o tempo gasto para que a concentração plasmática do fármaco se reduza à metade. Finalmente, a excreção transporta o fármaco, inalterado ou metabolizado, da circulação sanguínea para o meio externo, efetivando sua remoção do sistema biológico. A depuração, ou *clearance*, é o parâmetro farmacocinético que representa a taxa de eliminação de um fármaco do organismo (Boroujerdi, 2002).

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que a associação de fármacos pode resultar em melhor eficácia terapêutica e que a resistência/sucetibilidade do *Trypanosma cruzi* ao tratamento é relacionada à distância filogenética de suas populações, este trabalho se justifica ao estudar a associação do benzonidazol e itraconazol em parasitos de três grupos genéticos distintos e explicar os mecanismos possivelmente envolvidos nesta associação medicamentosa mediante o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico aplicado ao seu monitoramento farmacocinético em modelo murino.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Verificar a eficácia terapêutica da associação de benzonidazol e itraconazol no tratamento de camundongos infectados com clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes a grupos genéticos distintos, bem como investigar os efeitos de interações farmacocinéticas entre estes fármacos.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Avaliar a eficácia da associação de benzonidazol e itraconazol no tratamento da infecção chagásica aguda utilizando como indicadores de cura exames parasitológicos (exame de sangue a fresco, hemocultura e PCR) e sorológico (ELISA) e comparar os resultados obtidos com a eficácia de cada um dos compostos isoladamente;

4.2.2. Desenvolver e validar um método bioanalítico capaz de quantificar com precisão e exatidão o benzonidazol e o itraconazol, bem como a associação entre estes fármacos, em amostras plasmáticas de camundongos;

4.2.3. Utilizar o método desenvolvido no monitoramento e avaliação dos perfis farmacocinéticos da associação de benzonidazol e itraconazol e comparar os resultados obtidos com o perfil de cada um dos compostos isoladamente.

Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

PARTE I – Avaliação da Eficácia Terapêutica dos Tratamentos com BNZ, ITC e BNZ + ITC em Camundongos Infectados com Clones de *T. cruzi* de Diferentes Grupos Genéticos

Nesta primeira parte do trabalho o tratamento da infecção experimental pelo *T. cruzi* em modelo murino foi avaliado com o benzonidazol (BNZ) e o itraconazol (ITC) isoladamente e em associação (BZ + ITC).

5.1. Amostras de *T. cruzi*

Foi utilizado um estoque clonal do genótipo 20 (grupo *T. cruzi* I), um estoque clonal do genótipo 32 (grupo *T. cruzi* II) e um do genótipo 39 (grupo *T. cruzi*), selecionados com base na propriedade de maior virulência e resistência ao BNZ e ITC, previamente avaliadas em camundongos BALB/c por Toledo e colaboradores (2003). Os clones de *T. cruzi* foram caracterizados previamente pelo perfil eletroforético de 22 diferentes loci de isoenzimas e por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Tibayrenc *et al.*, 1993). De acordo com a mais recente nomenclatura proposta durante um simpósio com especialistas (Zingales *et al.* 2009) o clone do genótipo 20 (Tibayrenc & Ayala, 1988) está incluído no grupo TcI, enquanto o clone do genótipo 32 (Tibayrenc & Ayala, 1988) corresponde ao grupo TcII e o clone do genótipo 39 (Tibayrenc & Ayala, 1988) no grupo TcV (**Tabela 4**).

Tabela 4. Seleção dos clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais baseada no perfil de resistência ao BNZ e ITC (Toledo *et al.*, 2003).

Clones mais resistentes e virulentos	Genótipos Principais	Grupo Genético	Classificação atual (DTU)
P209 Cl1	20	<i>T. cruzi</i> I	TcI
BUG2149 Cl10	39	<i>T. cruzi</i>	TcV
IVV Cl4	32	<i>T. cruzi</i> II	TcII

DTU: Discrete Typing Unit (Zingales *et al.*, 2009)

5.2. Animais

Foi escolhido o modelo murino e o projeto foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo 2010/08 – Anexo). Foram utilizadas fêmeas de camundongos *Swiss*, com 28-30 dias de idade, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto e ali mantidos segundo as diretrizes estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram divididos em três grupos experimentais infectados por via intraperitoneal com um inóculo total de 10.000 tripomastigotas sangüíneos dos clones P209 Cl1 (Tcl), BUG2149 Cl10 (TCV) e IVV Cl4 (Tcll) do *T. cruzi* por animal, obtidos de camundongos previamente infectados, e quantificado segundo a técnica de Brener (1962).

5.3. Confirmação da Infecção

5.3.1. Exame de Sangue a Fresco (ESF)

Para a confirmação da infecção foi realizado o ESF entre o 4^o e 10^o dia após a inoculação. Para este exame, amostras de sangue foram coletadas diariamente da veia caudal do animal e examinadas ao microscópio óptico para pesquisa exaustiva de formas tripomastigotas sangüíneas.

5.3.2. Hemocultura (HC)

Nos animais cuja infecção não foi comprovada por meio do ESF, foram realizadas hemocultura 10 dias após a inoculação. Para tal foi coletado 0,5 mL de sangue do seio venoso retro-orbital dos camundongos, e este volume de sangue distribuído em dois tubos Falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio de cultura LIT, segundo a técnica de Filardi & Brener (1987). As hemoculturas foram incubadas a 28°C e homogeneizadas a cada 48 horas. Para detecção do parasito, uma gota do sedimento da hemocultura foi examinada ao microscópio óptico no 30^o,

60^o e 90^o dias após cultivo.

5.4. Esquema de Tratamento

Cada grupo experimental de animais infectados com os clones P209 Cl1 (Tcl), BUG2149 Cl10 (TcV) e IVV Cl4 (TclI) foi composto por quatro sub-grupos com 8 animais cada: animais tratados com BNZ, animais tratados com ITC, animais tratados com a associação BNZ + ITC e um grupo controle não tratado.

Os tratamentos foram iniciados no 10^o dia de infecção (fase aguda), utilizando uma dose diária de 100 mg por quilo de peso corporal. O BNZ (Rochagan[®], comprimidos de 100 mg) foi pulverizado em grau de porcelana e administrado na forma de suspensão em goma arábica. O ITC (Sporanox[®], cápsulas de 100 mg) foi pulverizado e levado ao banho ultrassônico até a obtenção de uma suspensão homogênea. A preparação da mistura de BNZ e ITC foi realizada da mesma maneira que a preparação do ITC isoladamente. Os fármacos foram administrados pela via oral, por gavagem, durante 20 dias consecutivos para o BNZ e 60 dias consecutivos para o ITC (Toledo *et al.*, 2003). A terapia associada manteve a mesma posologia em relação à monoterapia.

5.5. Parâmetros Empregados na Avaliação da Eficácia Terapêutica

Os animais tratados e não tratados foram avaliados pelos seguintes parâmetros:

5.5.1. Avaliação da Mortalidade

Os animais foram acompanhados diariamente e a mortalidade observada e registrada até o 110^o dia após a infecção. A taxa de mortalidade foi calculada considerando a mortalidade cumulativa no período avaliado e expressa em porcentagem. Os dados foram comparados entre as os grupos tratados com BNZ, ITC, BNZ +ITC e não tratados.

5.5.2. Avaliação da Parasitemia (PAR)

As curvas de parasitemia foram traçadas utilizando a média diária da parasitemia dos animais pertencentes a cada grupo experimental.

5.5.2.1. Parâmetros Derivados da Curva de Parasitemia (PPP, PP, PMP, DPMP)

Os parâmetros derivados da curva de parasitemia tais como período pré-patente (PPP), período patente (PP), pico máximo de parasitemia (PMP) e dia do pico máximo de parasitemia (DPM) também foram determinados e comparados.

5.5.3. Avaliação Parasitológica

5.5.3.1. Exame de Sangue a Fresco (ESF)

O ESF foi empregado na avaliação da infecção e da eficácia terapêutica e realizado segundo a técnica de Brener (1962). A contagem da parasitemia foi realizada diariamente, a partir do quarto dia de infecção até a negatificação por cinco dias consecutivos. Estas avaliações permitiram traçar a curva de parasitemia observada nos grupos experimentais tratados e não tratados.

A avaliação da eficácia terapêutica foi feita diariamente e por até 110 dias após infecção (D.A.I.) de acordo com o perfil da curva de parasitemia observada nos diferentes grupos experimentais.

5.5.3.2. Hemocultura (HC)

As hemoculturas foram realizadas 30 dias após o tratamento e examinadas no 30º, 60º e 90º dias após a incubação, como descrito no item 5.3.2.

5.5.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada em paralelo com a HC (30 dias após o tratamento). Um volume de 300 µL de sangue foi coletado do plexo venoso retro-orbital dos animais e conservado em solução de cloridrato de guanidina (Guanidina-HCl) 6M / ácido etilenodietildinitrotetracético (EDTA) 0,2 M; pH 8,0 (1:1), como descrito por Ávila e cols. (1991). Após 7 dias, esta mistura de sangue e guanidina foi fervida a 100⁰ C durante 7 minutos, para desnaturação do DNA e homogeneização da amostra.

A partir de 100 µL do lisado de sangue, mantido à temperatura ambiente, o DNA foi extraído utilizando o kit WizardTM Genomic DNA Purification (Promega[®]). A amplificação foi realizada utilizando os primers S35 (5'AAATAATGTACGGGKAGATGCATGA3'), S36 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA3') (Invitrogen[®], São Paulo, SP, Brasil), e a enzima *Taq Platinum DNA Polimerase* (Invitrogen[®], São Paulo, Brasil) em termociclador PTC-150 (MJ Research, Ramsey, MA, EUA). Controles positivos, negativos e de reagentes foram incluídos em cada um dos ensaios realizados.

O DNA amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% revelado pela prata (Santos *et al.*, 1993).

5.5.4. Avaliação Sorológica pela ELISA

A avaliação sorológica foi realizada em microplacas de 96 poços para detecção de Imunoglobulina G total (IgG) de acordo com a metodologia de Voller e cols. (1976). As amostras de soro foram coletadas nove meses após o tratamento e armazenadas a -20⁰ C. Os soros foram diluídos a 1:80 em solução salina tamponada (PBS), o antígeno alcalino foi diluído em tampão carbonato pH 9,6 (4,0 µg/mL) e o conjugado anti-IgG marcado com peroxidase diluído em Tween 20/PBS (0,5 % v/v) na diluição 1/4000. A leitura da reação foi realizada em leitor de ELISA com filtro de 490 nm. A absorbância discriminante de soros reativos e não reativos foi calculada pela média de dez soros não reativos somada ao dobro do desvio padrão. Em cada placa, foram adicionadas amostras de soro controles obtidas de animais infectados e não infectados pelo *T. cruzi*.

Estas avaliações laboratoriais foram feitas na sequência (ESF, HC, PCR, ELISA) e apenas naqueles animais que apresetavam negatificação do parâmetro precedente, exceto no caso da PCR e ELISA.

5.6. Critério de Cura

A suscetibilidade ou resistência ao tratamento com BNZ, ITC e BNZ + ITC foi definida de acordo com os resultados obtidos pela combinação dos métodos de avaliação da eficácia terapêutica. Foram considerados tratados e curados somente os animais que apresentaram resultados negativos em todos os testes realizados (ESF, HC, PCR e ELISA).

Um índice de cura (IC) foi calculado para cada grupo de infecção experimental e em cada esquema de tratamento empregado, considerando a porcentagem dos animais tratados curados.

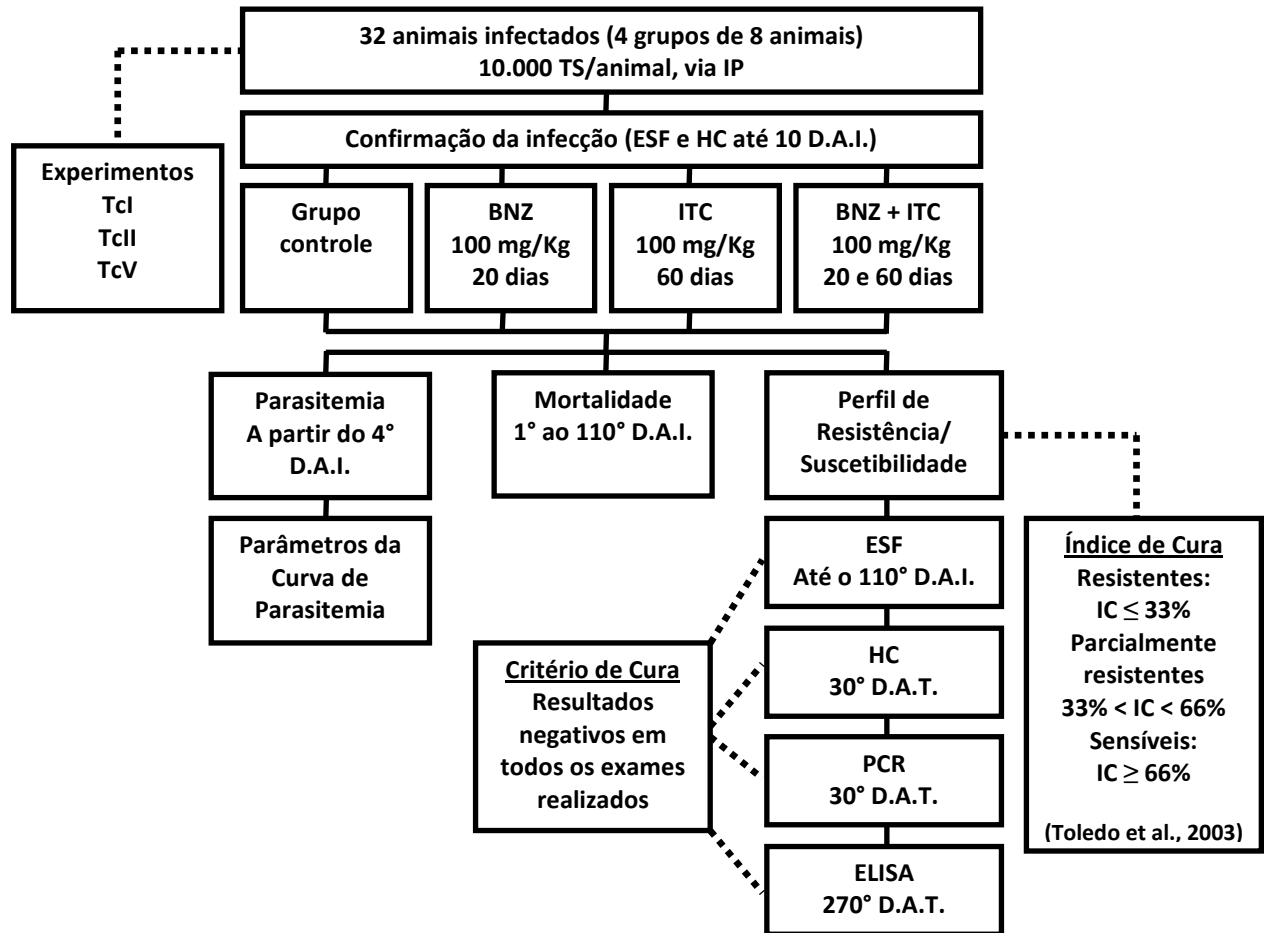
Uma vez determinados os índices de cura, os clones de *T. cruzi* estudados foram classificados segundo o critério de Filardi & Brener (1987) modificado por Toledo e cols. (2003) em: resistentes (índice de cura $\leq 33\%$), parcialmente resistentes ($33\% < \text{índice de cura} < 66\%$) e suscetíveis (índice de cura $\geq 66\%$) ao esquema de tratamento empregado.

5.7. Análises Estatísticas

A análise comparativa dos dados obtidos entre os animais infectados com os diferentes grupos genéticos empregando os diferentes esquemas de tratamento foi realizada utilizando o programa Graph Pad Prism[®], versão 5.0.

Os parâmetros derivados das curvas de parasitemia (PAR, PPP, PP, PMP e DPMP) e os dados relativos aos índices de cura foram analisados pelo teste não paramétrico de Mann Whitney. As diferenças foram consideradas como significativas quando o nível de significância foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

5.8. Delineamento Experimental I



Delineamento experimental com a distribuição dos camundongos *Swiss* inoculados com clones de *Trypanosoma cruzi* tratados com benzonidazol, itraconazol, benzonidazol + itraconazol e não tratados. TS: tripomastigotas sanguíneos; BNZ: benzonidazol; ITC: itraconazol; ESF: exame de sangue a fresco; HC: hemocultura; PCR: reação em cadeia da polimerase; D.A.I.: dias após infecção; D.A.T.: dias após tratamento; IC: índice de cura.

PARTE II – Desenvolvimento e Validação do Método Bioanalítico para Quantificação de BNZ e ITC

Nesta parte do trabalho foi desenvolvido um método bioanalítico para a determinação das concentrações de BNZ e ITC em amostras de plasma de camundongos visando sua aplicação no monitoramento pré-clínico da associação proposta (BNZ + ITC) e avaliação de possíveis interações farmacocinéticas.

5.9. Substâncias Químicas de Referência

O benzonidazol, N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida ($C_{12}H_{12}N_4O_4$) CAS 22994-85-0, (Lote: MKD7270V / Fabricação: 29.10.2010 / Validade: 28.11.2015), com teor de pureza de 97,0 % e o itraconazol, (\pm)-1-sec-butil-4-[p-[4-[p[[[(2R,4S)-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-imetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]-1-piperazinil]fenil-D2-1,2,4-triazolin-5-ona ($C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$), CAS 84625-61-6, (Lote 097K1156V / Fabricação: 30.09.2007 / Validade: 26.12.2012), com teor de pureza de 98,0 %, foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). O diazepam, (Lote: I068010-5 / Fabricação: 04.2010 / Validade: 04.2012) foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudo e Desenvolvimento Analítico-Farmacêutico (CEDAFAR) da UFMG.

5.10. Reagentes e Instrumentos

Água ultra pura foi obtida no laboratório por destilação e subsequente purificação em Sistema Simplicity MilliQ (Millipore, Belford, EUA). Acetonitrila e metanol grau cromatográfico foi comprada da Tedia (São Paulo, SP, Brasil). Éter etílico, acetato de etila, hexano, dimetilsulfóxido e outros reagentes graus P.A. foram comprados da Merk (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Foram utilizadas pipetas automáticas Eppendorf de volume variável (5-50, 10-100, 20-200, 100-1000 μ L), seringas de vidro (B-D Yale) de 10 mL e unidades filtrantes Millipore, tipo HV Millex em polietileno com membrana Durapore com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 μ m.

Para o preparo das soluções foram usadas vidrarias calibradas, comuns de laboratório.

5.11. Equipamentos

- Balança AUX220 Shimadzu
- Agitador tipo vórtex IKA Genius 3
- Centrífuga 5415D Eppendorf
- Concentrador TE019 Tecnal
- Banho Ultra-som USC-4800A Unique
- pHmetro pH/mv meter 21 Hanna
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters Alliance e2695 (Waters, Manchester, UK) composto por bomba, injetor automático de amostras, forno de coluna e detector UV Waters (2489).
- Coluna analítica C18 Phenomenex®, modelo Gemini-NX (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)
- Pré-coluna C18 Phenomenex®, modelo AJ0-4287, (4mm x 3mm x 5 µm)

5.12. Desenvolvimento de Método Bioanalítico para Quantificação de Benzonidazol e Itraconazol em Plasma de Camundongo

A literatura descreve diversos métodos para quantificação de BNZ e ITC separadamente a partir de diferentes matrizes biológicas, como sangue, plasma, urina e ultrafiltrado, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Workman *et al.* 1984; Hardin *et al.* 1988; Gubbins *et al.* 1998; Morilla *et al.* 2003; Wong *et al.* 2003; Shin *et al.* 2004; Lohitnavy *et al.* 2005; Uno *et al.* 2006; Silva *et al.* 2007; Park *et al.* 2007; Woo *et al.* 2008; Ghazal *et al.* 2009). O desenvolvimento de um método bioanalítico partiu da avaliação das condições já descritas na literatura, ajustando-as as características do laboratório, como equipamentos e materiais, visando reduzir o tempo de análise e consequentemente os custos.

5.13. Condições Cromatográficas

Foram realizados testes utilizando diversas preparações de fases móveis, compostas por água, metanol, acetonitrila e tampão fosfato em diferentes concentrações e valores de pH,

como: metanol/água 80:20, 40:60, 75:25 (v/v), além de sistema gradiente; acetonitrila/água 80:20, 40:60, 75:25 (v/v) e sistema gradiente e acetonitrila/tampão fosfato 0,05 M e 0,02 M com pH 3,0 e 6,0; 50:50, 75:25 e 25:75 (v/v). Todas as fases móveis testadas foram filtradas em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Para degaseificar, levou-se a solução ao banho ultrassônico por 40 minutos.

Para a obtenção da melhor resolução dos picos cromatográficos, variou-se a temperatura do forno de coluna cromatográfica entre a faixa de 30 e 40° C. Para a detecção no UV, realizou-se uma varredura entre 190 e 500 nm com extração dos cromatogramas nos seguintes comprimentos de onda: 324, 320, 300, 290, 270, 260, 263, 240, 220 e 210 nm. Foram avaliados vários candidatos a padrão interno (PI) para possibilitar melhor monitoramento das condições de recuperação durante o procedimento de extração.

5.14. Purificação das Amostras de Plasma de Camundongo para Quantificação de Benzonidazol e Itraconazol

Foram avaliadas diferentes condições de extração empregando os métodos de precipitação de proteínas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida a partir de um volume de 270 µL de plasma contaminado com 10 µL de cada um dos padrões analíticos e do PI.

A precipitação de proteínas foi testada com diferentes solventes, como metanol, acetonitrila, metanol/dimetilsulfóxido (1:1) e acetonitrila/dimetilsulfóxido (1:1), acrescentando à amostra plasmática volumes de uma a duas vezes superior ao volume de plasma. Foram testados diferentes tempos de extração por homogeneização em vórtex (10, 15 e 20 minutos), além de repetições do procedimento por até três vezes para se obter a melhor recuperação possível dos analitos.

As extrações líquido-líquido foram realizadas de forma semelhante, diferenciando apenas os solventes testados: diclorometano, tricloroetano, hexano, clorofórmio, acetato de etila, éter etílico e mistura de acetato de etila/dimetilsulfóxido (1:1), acetonitrila/acetato de etila (1:1), éter etílico/acetato de etila (1:1) e éter etílico/acetato de etila/ácido tricloroacético (2:2:1). Também foram testadas extrações duplas com volumes até 10 vezes maiores que o volume de plasma, visando reduzir o tempo de agitação em vórtex, além de procedimentos de

separação das fases por centrifugação e/ou congelamento.

Em todos os métodos de extração testados, a fase orgânica obtida foi filtrada em membrana de 0,45 μm de poro e evaporada à vácuo até a secura. As amostras foram suspensas em 300 μL de fase móvel e transferidas para vials com insert de capacidade de 300 μL .

5.15. Preparo dos Padrões de Calibração

Estando o método desenvolvido, a cada dia de análise foram preparadas curvas de calibração a partir das soluções-padrão preparadas em dimetilsulfóxido nas concentrações de 0,5 a 100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o BNZ e de 1,0 a 75,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o ITC, adicionadas ao plasma. Para tal, 270 μL de plasma foram transferidos para tubos de polipropileno contendo 10 μL da solução do PI (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 10 μL de cada uma as soluções de BNZ e ITC preparadas em diferentes concentrações, conforme descrito na **Tabela 5**. As amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex por 15 segundos, e submetidas ao procedimento de purificação imediatamente após o preparo.

Tabela 5. Preparo das amostras de plasma padrão utilizadas na curva de calibração da quantificação do benzonidazol e itraconazol em plasma de camundongo.

Volume de plasma branco ($\mu\text{g}/\text{MI}$)	Concentração da solução padrão ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Volume da solução padrão (μL)			Concentração final presente na curva de calibração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	BNZ	ITC	PI	BNZ	ITC	PI	BNZ	ITC	PI
270	15	30	1800	10	10	10	0,5	1,0	60
270	30	75	1800	10	10	10	1,0	2,5	60
270	150	150	1800	10	10	10	5,0	5,0	60
270	300	300	1800	10	10	10	10,0	10,0	60
270	750	450	1800	10	10	10	25,0	15,0	60
270	1500	750	1800	10	10	10	50,0	25,0	60
270	2250	1500	1800	10	10	10	75,0	50,0	60
270	3000	3000	1800	10	10	10	100,0	75,0	60

BNZ: benzonidazol

ITC: itraconazol

PI: padrão interno

5.16. Preparo dos Padrões de Controle de Qualidade

As amostras de plasma padrão de controle de qualidade em baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) concentração também foram preparadas diariamente a partir das soluções padrão de BNZ e ITC da mesma maneira que foram preparadas as amostras de plasma padrão da curva de calibração para atingir as concentrações finais de 1,0; 25,0 e 75,0 µg/mL de BNZ e 2,5; 15,0 e 50,0 µg/mL de ITC, conforme descrito na **Tabela 6**.

Tabela 6. Preparo das amostras de plasma de controle de qualidade utilizadas para a quantificação do benzonidazol e itraconazol em plasma de camundongo.

Controle de Qualidade	Volume de plasma branco (µg/mL)	Concentração da solução padrão (µg/mL)			Volume da solução padrão (µL)			Concentração final presente na curva de calibração (µg/mL)		
		BNZ	ITC	PI	BNZ	ITC	PI	BNZ	ITC	PI
CQB	270	30	75	1800	10	10	10	1,0	2,5	60
CQM	270	750	450	1800	10	10	10	25,0	15,0	60
CQA	270	2250	1500	1800	10	10	10	75,0	50,0	60

CQB: controle de qualidade em concentração baixa

CQM: controle de qualidade em concentração média

CQA: controle de qualidade em concentração alta

5.17. Preparo de Amostras de Plasma Branco

Para as amostras de plasma “branco”, adicionaram-se 290 µL de plasma a tubos de polipropileno contendo 10 µL de solução de PI (diazepam) em dimetilsulfóxido, na concentração de 60 µg/mL, homogeneizando-se em vórtex por 15 segundos.

5.18. Validação do Método para Quantificação do Benzonidazol e Itraconazol em Plasma de Camundongo

A validação da metodologia para a quantificação simultânea do BNZ e ITC em plasma de camundongo foi realizada por meio da determinação dos parâmetros de especificidade,

recuperação, limite de detecção, limites de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade conforme o Guia para Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (United States, 2001) e Resolução nº 899 de março de 2003 da ANVISA (Brasil, 2003)

5.18.1. Especificidade

A especificidade é definida como a capacidade do método em distinguir a substância analisada de qualquer outra presente na amostra (Causon, 1997). Na análise de amostras biológicas, interferentes potenciais incluem componentes endógenos, metabólitos ou produtos de decomposição (United States, 2001), além dos anticoagulantes, quando utilizados.

Tal parâmetro foi investigado pela análise de seis amostras de plasma branco (plasma obtido de animais saudáveis, isento de BNZ, ITC e PI), sendo quatro plasmas normais e dois plasmas hemolisados para verificação da existência de interferência por parte de componentes endógenos (Brasil, 2003). A amostra de plasma hemolisado foi obtida por congelamento do sangue e posterior centrifugação por 10 minutos a 3100 rpm.

5.18.2. Recuperação

A recuperação indica a eficiência do procedimento de purificação das amostras estabelecido no método e possibilita a quantificação do fármaco extraído após a amostra de plasma ser processada. Assim, este parâmetro de validação avalia se as condições empregadas no método são adequadas o suficiente para minimizar os contaminantes ou interferentes na amostra.

A recuperação corresponde ao resultado obtido após análise da amostra de plasma “branco” acrescida de padrão, submetida à pré-tratamento, expresso como porcentagem do resultado obtido após análise de padrão puro, não submetido à pré-tratamento (Causon, 1997).

Esse parâmetro foi determinado comparando-se resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao processo de purificação com os resultados de análises das amostras de plasma branco submetidas ao processo de purificação e posteriormente contaminadas com as soluções padrão nas mesmas concentrações das

amostras de controle de qualidade. A resposta das amostras brancas submetidas ao processo de purificação e posteriormente contaminadas representa a quantidade total de fármaco presente na amostra de plasma, ou seja, 100%. A resposta das amostras submetidas ao processo de purificação representa a porcentagem recuperada.

Este parâmetro foi investigado em três diferentes concentrações (concentrações das amostras de plasma padrão de controle de qualidade) e cinco repetições, conforme recomendado pelos guias oficiais (Brasil, 2003).

5.18.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação Inferior

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (Brasil, 2003). O limite de quantificação inferior (LQ) deve representar a menor concentração do analito que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis.

O LD foi estabelecido por meio da análise de 5 réplicas de amostras contendo concentrações conhecidas e decrescentes dos fármacos, até o menor nível detectável sendo calculado pela equação:

$$LD = \frac{3,3\alpha}{S}, \text{ onde:}$$

α = desvio padrão do intercepto com o eixo Y observado para cinco curvas de calibração;

S = média dos valores de inclinação obtidos das mesmas cinco curvas de calibração.

O LQ foi determinado utilizando-se cinco amostras de concentrações decrescentes e conhecidas dos fármacos até o menor nível determinável, com precisão e exatidão aceitáveis. A exatidão deve estar entre ± 15 % do valor nominal da concentração, com coeficiente de variação de, no máximo, 20 % (Bressolle *et al.*, 1996).

5.18.4. Linearidade

A linearidade indica a relação entre concentração do analito e a resposta do método,

representada neste estudo, pela área do sinal cromatográfico.

A linearidade é obtida através da construção da curva de calibração, que representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Na construção da curva de calibração utilizaram-se amostras de plasma padrão da curva de calibração em oito concentrações diferentes de BNZ e ITC e em cinco repetições. Avaliou-se a correlação linear entre as concentrações e as razões entre as áreas dos sinais cromatográficos do padrão analítico sob o padrão interno. Os parâmetros de correlação foram estimados através do método dos mínimos quadrados, onde a concentração é considerada variável independente (x) e a razão do padrão analítico sobre o PI é considerada variável dependente (y).

5.18.5. Precisão

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância dos resultados obtidos quando um procedimento analítico é aplicado repetidamente, sendo expressa como coeficiente de variação (CV) dessas medidas. A precisão intra-dia refere-se ao CV obtido por repetição do método com o mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes, em curto intervalo de tempo (por exemplo, no mesmo dia). A precisão inter-dias é obtida por meio de alteração de condições, como mudanças de analista ou reagentes, e utilização do método durante várias semanas ou meses (Causon, 1997).

Este parâmetro foi determinado analisando-se amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações diferentes e em cinco réplicas no mesmo dia (precisão intra-dia) e em dias consecutivos (precisão inter-dias), e foi calculado segundo a equação:

$$CV(\%) = \frac{DP}{C_{média}} \times 100, \text{ onde:}$$

$CV(\%)$ = coeficiente de variação em porcentagem

DP = desvio padrão

$C_{média}$ = concentração média determinada

5.18.6. Exatidão

A exatidão de métodos bioanalíticos é uma medida do erro sistemático e é definida como concordância entre o valor determinado e o valor real (Causon, 1997). O referido parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações e em cinco repetições em um mesmo dia (exatidão intra-dia) e em dias diferentes (exatidão inter-dias), e foi calculado segundo a equação:

$$Exatidão = \frac{C_{média}}{C_{teórica}} \times 100, \text{ no qual:}$$

C_{média} = concentração média determinada

C_{teórica} = concentração teórica ou nominal

5.18.7. Estabilidade

A determinação da estabilidade de um fármaco numa matriz biológica depende de vários fatores, tais como propriedades químicas do fármaco, condições de armazenamento da amostra, tipo de matriz biológica e material de acondicionamento (United States, 2001).

A determinação da estabilidade de uma amostra é fundamental para garantir que a concentração da substância a ser analisada não sofreu alteração entre a sua coleta e o momento da análise (Causon, 1997).

Assim, é importante que se determine a estabilidade das amostras de plasma em temperatura ambiente, em ciclos de congelamento e descongelamento e após longos períodos de armazenamento sob refrigeração. A avaliação da estabilidade pós-processamento das amostras permite que amostras processadas possam ser avaliadas após longos períodos de espera no autoinjeter do sistema cromatográfico. Além disso, o monitoramento da estabilidade das soluções-padrão é fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos das análises das amostras de plasma.

Conforme recomendado pelos guias oficiais adotados neste trabalho, foram determinadas as estabilidades descritas a seguir.

5.18.7.1. Estabilidade de Curta Duração

Foram utilizadas três amostras de plasma padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas a descongelamento natural, mantidas à temperatura ambiente durante 4 horas e submetidas ao processo de purificação. Os resultados foram comparados com amostras descongeladas e imediatamente analisadas.

5.18.7.2. Estabilidade em Ciclos de Congelamento e Descongelamento

Foram utilizadas três amostras de plasma padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas às seguintes condições: congelamento a -20°C por, no mínimo, 24 horas, descongelamento e recongelamento por, no mínimo, 24 horas e assim sucessivamente até se completarem três ciclos. As concentrações dos fármacos nas amostras de plasma padrão de controle de qualidade foram determinadas nos três ciclos, inclusive no tempo zero, correspondente à preparação das amostras de plasma de controle de qualidade e análise das mesmas sem submetê-las ao congelamento.

5.18.7.3. Estabilidade Pós-Processamento

Foram utilizadas três amostras de plasma padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas a descongelamento natural, a temperatura ambiente, e analisadas nas mesmas temperatura e condições em que foram analisadas as amostras de plasma dos animais.

A avaliação deste parâmetro contemplou o período máximo de espera das amostras processadas no autoinjeter do cromatógrafo (até 48 horas).

5.18.7.4. Estabilidade de Longa Duração

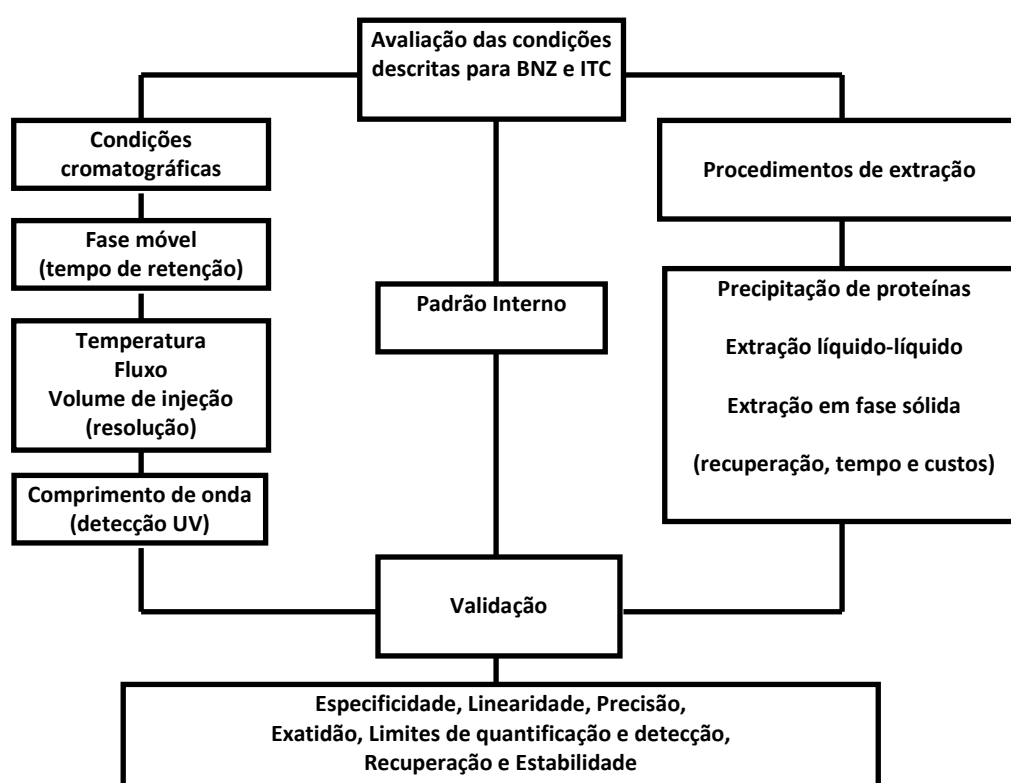
Amostras de plasma padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta) foram mantidas a -20°C por um período correspondente ao tempo em que as

amostras de plasma dos animais ficariam armazenadas. Estas amostras foram analisadas no dia de sua preparação e após 60 dias, em triplicata.

5.18.7.5. Estabilidade das Soluções Padrão

Para avaliar a estabilidade das soluções-padrão em dimetilsulfóxido, estas foram analisadas diariamente durante as etapas de validação e análise de amostras de plasma dos animais, com monitoramento diário dos sinais cromatográficos obtidos. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de soluções-padrão recém-preparados.

5.19. Delineamento Experimental II



Delineamento experimental do desenvolvimento das condições cromatográficas, procedimentos de purificação das amostras e validação da metodologia bioanalítica.

PARTE III – Avaliação Farmacocinética de Camundongos Tratados com BNZ, ITC e BNZ + ITC

Nesta parte do trabalho, um monitoramento pré clínico foi conduzido comparando os perfis farmacocinéticos do BNZ e ITC administrados separadamente com o perfil farmacocinético exibido pela associação proposta (BNZ + ITC) avaliados sob as mesmas condições padronizadas.

5.20. Fármacos

Rochagan® (benzonidazol, Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos) comprimidos de 100 mg (lote RJ0359, fabricação 05.2006, validade 05.2012) e Sporanox® (itraconazol, Janssen-Cilag Farmacêutica) cápsulas de 100mg (lote NCL101, fabricação 02.2010, validade 02.2013) foram adquiridos comercialmente.

5.21. Animais

Foram utilizados fêmeas jovens adultas de camundongos albinos *Swiss*, com idade de 4 meses, pesando entre 45 a 50 g obtidos do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto e mantidos em ambiente controlado com ciclos regulares de luz, temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e disponibilidade de água e alimento *ad libitum*, de acordo com o guia estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Esta etapa do experimento também está aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, sob o protocolo nº 2010/08.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais de acordo com o tratamento empregado: animais tratados com BNZ, animais tratados com ITC e animais tratados com BNZ + ITC.

5.22. Esquema de Tratamento

Todos os animais receberam uma dose única de 5 mg dos respectivos fármacos

envolvidos no esquema terapêutico, correspondendo a aproximadamente 100 mg por quilo de peso corporal. O BNZ foi pulverizado em grau de porcelana e administrado na forma de suspensão em goma arábica. O ITC foi pulverizado e levado ao banho ultrassônico até a obtenção de uma suspensão homogênea. A preparação da mistura de BNZ e ITC foi realizada da mesma maneira que a preparação do ITC isoladamente.

5.23. Coleta, Processamento e Armazenamento das Amostras de Plasma

Para realizar a quantificação dos fármacos no plasma dos animais tratados foram usados tubos de polipropileno heparinizados para a coleta de aproximadamente 600 µL de sangue obtidos do seio venoso retro orbital em diferentes períodos após o tratamento. Por se tratar de animais de pequeno porte foi necessário a utilização de um único animal para cada tempo de coleta. Assim, o tratamento e a coleta das amostras foram realizadas em quintuplicata nos três grupos experimentais.

Os tempos de coleta das amostras para a avaliação farmacocinética foram: 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 36 e 48 horas após o tratamento. O plasma foi separado por centrifugação a 3100 rpm e congelado a -20°C até a realização das análises de quantificação dos fármacos.

5.24. Quantificação do Benzonidazol e Itraconazol nas Amostras de Plasma de Camundongo

A quantificação de BNZ e ITC nas amostras de plasma de camundongo foi realizada utilizando a metodologia bioanalítica desenvolvida e validada.

Amostras de plasma dos animais tratados com BNZ, ITC e BNZ + ITC foram analisadas paralelamente às curvas de calibração com oito pontos e junto às amostras em triplicata de plasma de controle de qualidade em três concentrações (alta, média e baixa):

- Controle de qualidade baixo (CQB): 0,5 µg/mL de BNZ e 1,0 µg/mL de ITC;
- Controle de qualidade médio (CQM): 25,0 µg/mL de BNZ e 15,0 µg/mL de ITC;
- Controle de qualidade alto (CQA): 75,0 µg/mL de BNZ e 50,0 µg/mL de ITC.

As curvas de calibração e as amostras de controle de qualidade representam amostras de plasma padrão de concentração conhecida, preparadas com a matriz biológica em estudo. A análise concomitante das amostras padrão de controle de qualidade com as amostras de plasma dos animais tratados garante a qualidade e a estabilidade destas durante todo procedimento analítico empregado.

Para ajustar as concentrações dos fármacos determinadas no plasma dos camundongos que apresentaram uma variação de até 5 g, assumiu-se que o volume total de plasma de cada animal corresponde a 4,9% do seu peso corporal (Auletta, 1995).

5.25. Determinação dos Parâmetros Farmacocinéticos

Neste estudo os parâmetros farmacocinéticos foram determinados com base no modelo não compartimental porque este tipo de tratamento permite estimar os parâmetros cinéticos sem a necessidade de ajustar os dados experimentais a um modelo determinístico (Yamaoka *et al.*, 1978). Esta abordagem modelo independente baseia-se na aplicação da teoria dos momentos estatísticos à análise das curvas concentração x tempo. Este tratamento estatístico assume que o movimento individual das moléculas do fármaco no organismo é aleatório, de tal forma que após a administração de uma determinada dose de fármaco, algumas moléculas são eliminadas de imediato, enquanto outras permanecem no sistema biológico durante um período de tempo. Este tratamento farmacocinético assume que a eliminação do fármaco segue um processo cinético de primeira ordem, devendo, por isso, obter-se um número suficiente de dados para definir a fase de eliminação terminal da curva e possibilitar a extrapolação da área sob a curva até ao infinito (Berrozpe & Viladrosa, 1997).

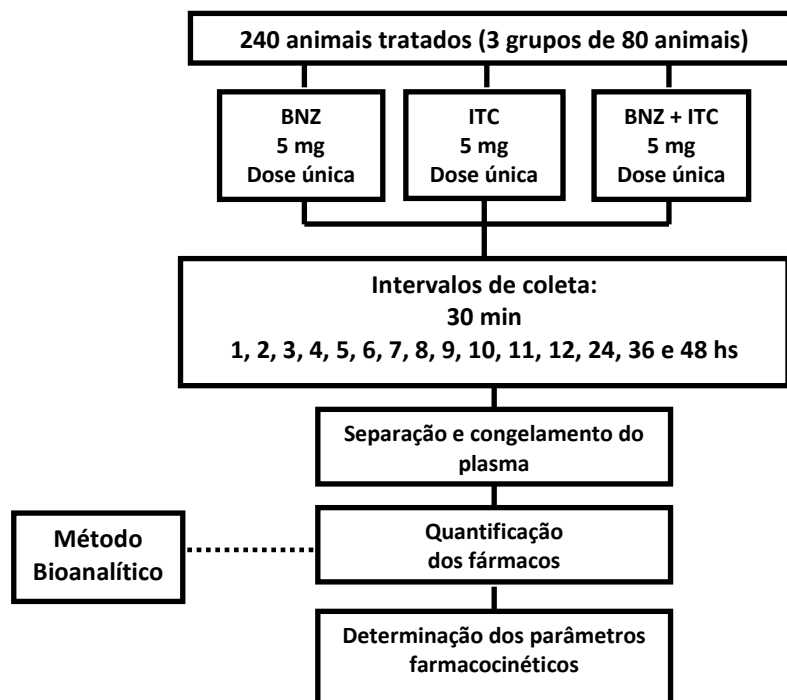
A velocidade de absorção dos fármacos foi determinada pela estimativa das concentrações máximas (C_{max}) observadas no plasma e pelo tempo necessário para atingi-la (T_{max}). Estes valores foram obtidos diretamente a partir dos dados das médias das curvas plasmáticas de concentração em função do tempo. A quantidade de fármaco absorvido foi determinada pelo cálculo da área sob a curva (ASC), utilizando o método dos trapezóides durante todo o período em que as concentrações permaneceram acima do limite de quantificação analítica (ASC_{0-t}) e extrapolada ao infinito ($ASC_{0-\infty}$), respeitando o limite de 20%.

Dados relativos à velocidade do processo de eliminação também foram calculados. Constante de eliminação (λ_z) é a constante de primeira ordem associada à parte terminal da curva plasmática de concentração em função do tempo e foi estimada via regressão linear da relação entre o tempo e o logaritmo da concentração. A meia vida de eliminação foi determinada pelo cálculo de $\ln 2 / \lambda_z$.

5.26. Análises Estatísticas

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos em cada grupo experimental foram expressos como termos de média \pm desvio padrão (D.P.) e as diferenças significativas dos valores médios foram avaliados por análise de variância ANOVA Oneway usando o programa Graph Pad Prism[®]. Em todas as análises o critério de significação foi $p < 0.05$.

5.27. Delineamento Experimental III



Delineamento experimental com a distribuição dos camundongos *Swiss* tratados com 5 mg de BNZ, ITC e BNZ + ITC em regime de dose única e intervalos de coleta das amostras plasmáticas para a obtenção dos parâmetros farmacocinéticos.

Resultados

6. RESULTADOS

PARTE I – Avaliação da Eficácia Terapêutica dos Tratamentos com BNZ, ITC e BNZ + ITC em Camundongos Infectados com Clones de *T. cruzi* de Diferentes Grupos Genéticos

6.1. Confirmação da Infecção

Todos os animais infectados com os diferentes clones estudados apresentaram ESF positivos (parasitemia patente), sendo assim comprovada a infecção antes do início do tratamento, não sendo necessária a realização da HC.

6.2. Parâmetros Empregados na Avaliação da Eficácia Terapêutica

6.2.1. Avaliação da Mortalidade

Dos animais infectados com os diferentes grupos genéticos do *T. cruzi* apenas o grupo não tratado e infectado com o clone P209 Cl1 (Tcl) apresentou taxa de mortalidade de 25%.

6.2.2. Avaliação da Parasitemia

O tratamento empregando o BNZ separadamente promoveu redução significativa da parasitemia dos camundongos infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl). Conforme ilustrado na **Figura 3**, a infecção se tornou subpatente poucos dias após o início do tratamento, mas apresentou reativação no 59º dia de infecção, ou seja, 29º dia após o final do tratamento.

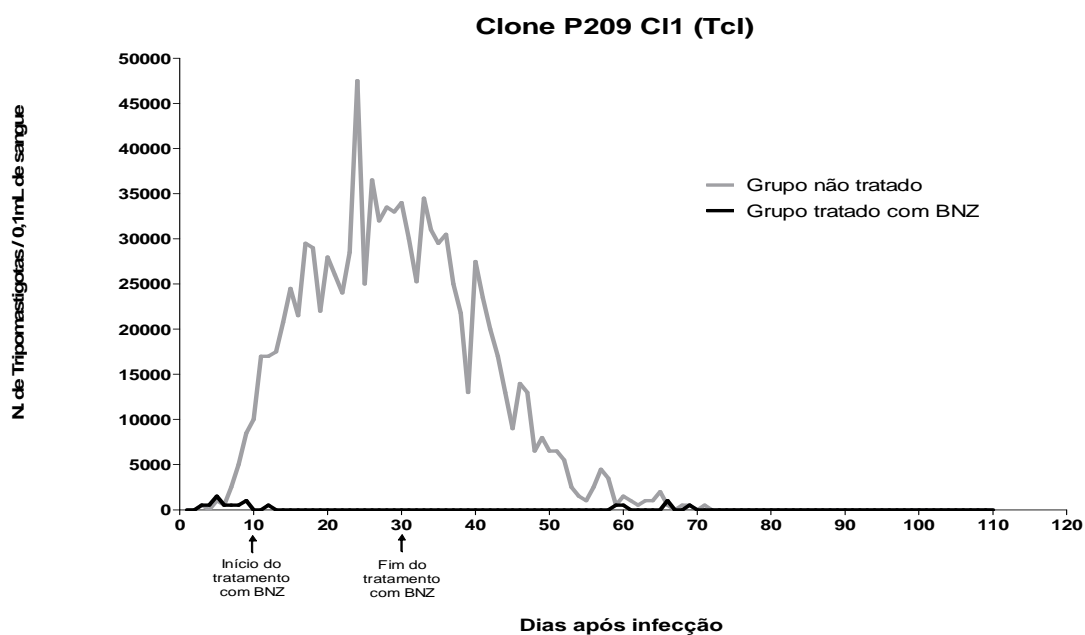


Figura 3. Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* ($n = 8$) infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl) de *Trypanosoma cruzi* tratados com benzonidazol (BNZ) e não tratados.

O tratamento dos camundongos infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl), empregando ITC separadamente, não foi capaz de suprimir a parasitemia. Apesar da redução significativa da parasitemia, esta permaneceu patente durante todo o período de tratamento e por até 27 dias após o seu encerramento – **Figura 4.**

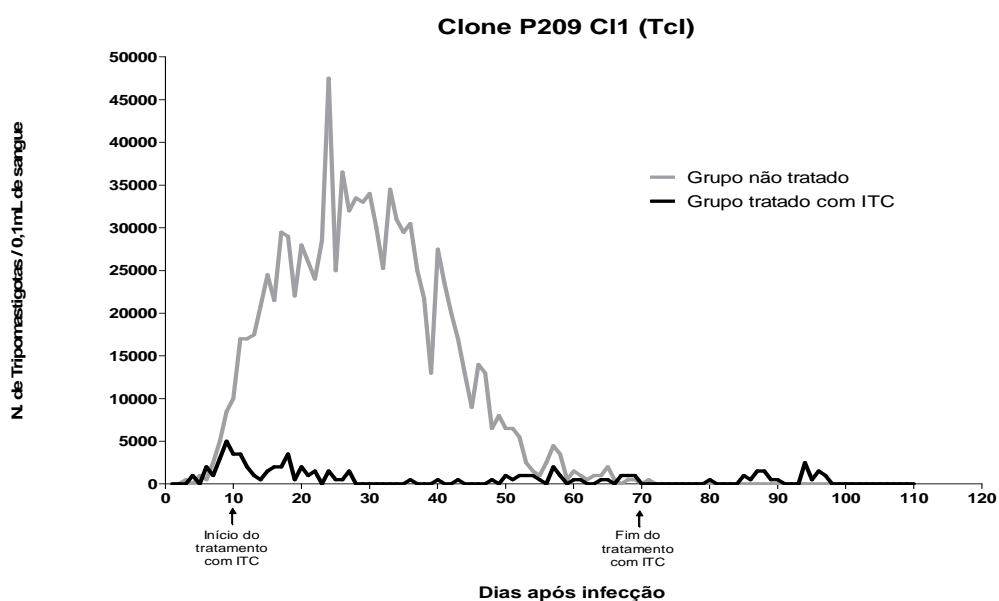


Figura 4. Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* ($n = 8$) infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl) de *Trypanosoma cruzi* tratados com itraconazol (ITC) e não tratados.

O tratamento empregando a associação BNZ + ITC resultou em supressão total da parasitemia dos camundongos infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl) poucos dias após o início do tratamento e não foi observada a ocorrência de reativação da infecção até o 110º dia de infecção, ou seja, até 40 dias após o final do tratamento – **Figura 5**.

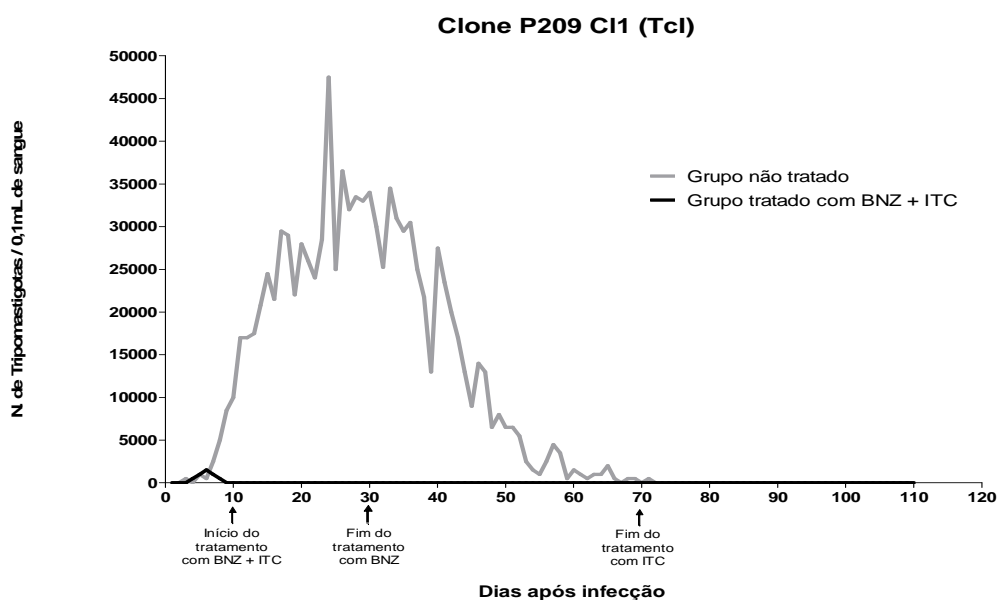


Figura 5. Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl) de *Trypanosoma cruzi* tratados com a associação de benzonidazol e itraconazol (BNZ + ITC) e não tratados.

O tratamento dos camundongos infectados com o clone BUG2149 Cl10 (TcV) empregando o BNZ e ITC separadamente e em associação, promoveu apenas a redução da parasitemia em todos os grupos de tratamento (**Figuras 6, 7 e 8**).

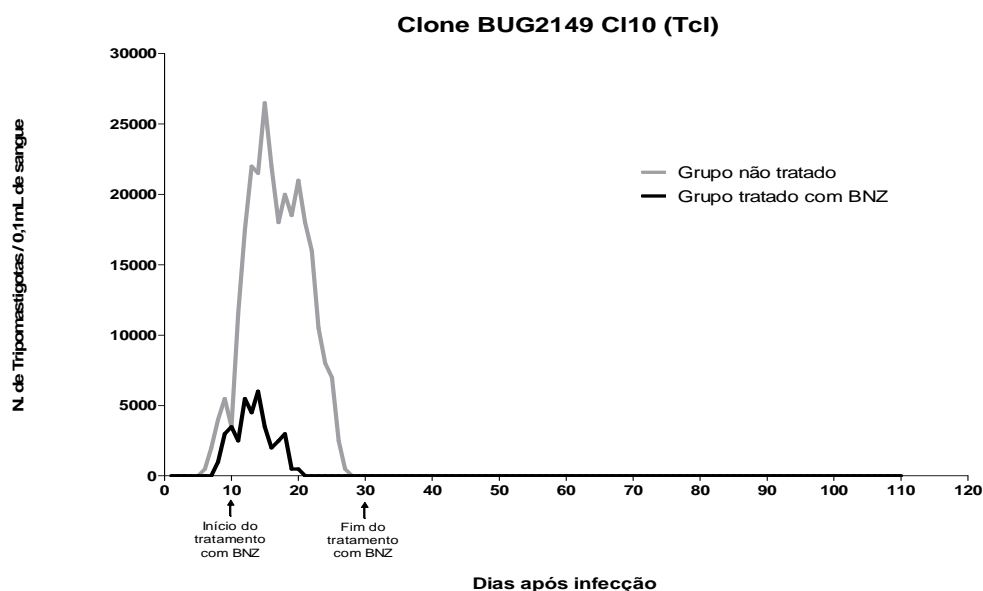


Figura 6. Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone BUG2149 Cl10 (TcV) de *Trypanosoma cruzi* tratados com benzonidazol (BNZ) e não tratados.

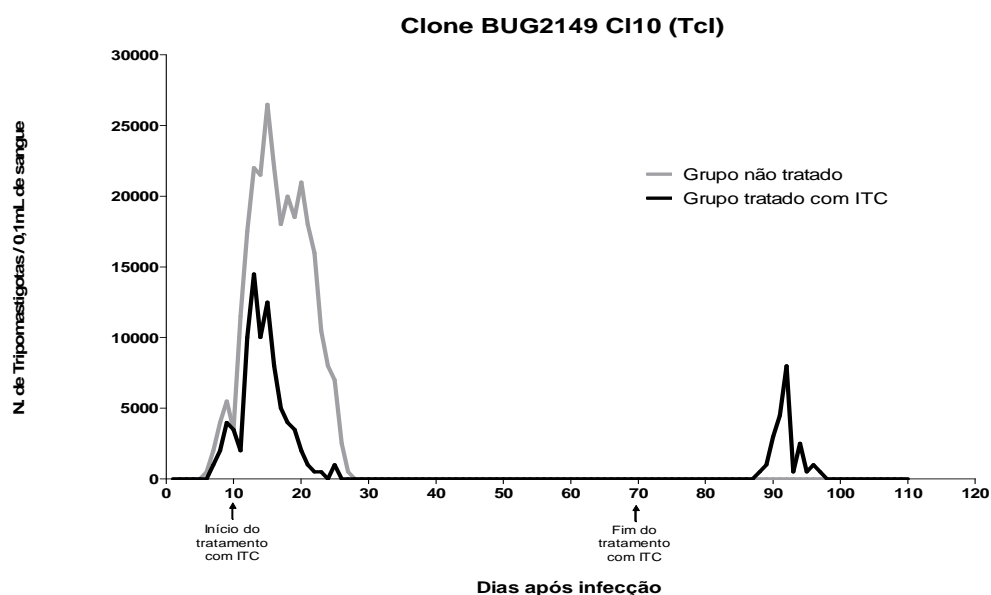


Figura 7. Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone BUG2149 Cl10 (TcV) de *Trypanosoma cruzi* tratados com itraconazol (ITC) e não tratados.

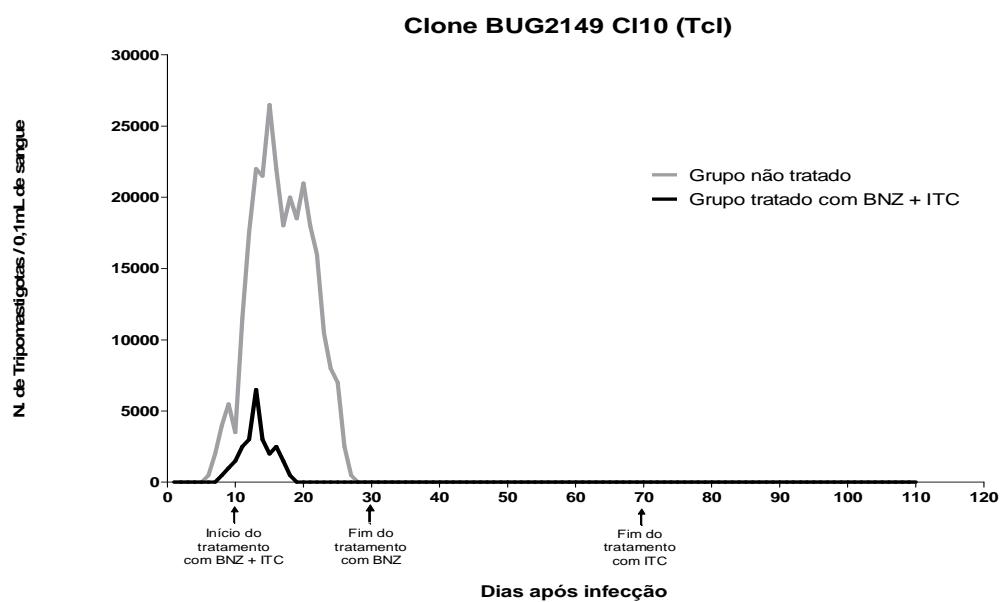


Figura 8. Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* ($n = 8$) infectados com o clone BUG2149 CI10 (TcV) de *Trypanosoma cruzi* tratados com a associação de benzonidazol e itraconazol (BNZ + ITC) e não tratados.

Apenas nos animais tratados com o ITC isoladamente foi observada reativação da parasitemia 18 dias após o encerramento do tratamento. Esta permaneceu patente por um período de 10 dias ao longo da avaliação, realizada até o 110º dia de infecção – **Figura 7.**

Os grupos de camundongos infectados com o clone IVV Cl4 (TclI) empregando o BNZ e ITC separadamente e em associação (BNZ + ITC), promoveu apenas a redução da parasitemia em todos os grupos (**Figuras 9, 10 e 11**).

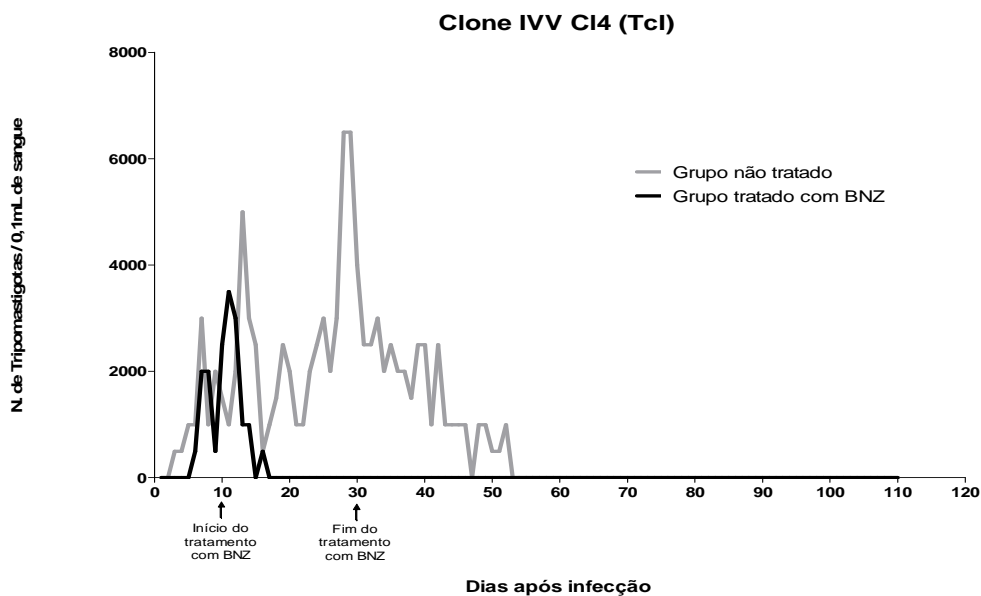


Figura 9. Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone IVV Cl4 (TclI) de *Trypanosoma cruzi* tratados com benzonidazol (BNZ) e não tratados.

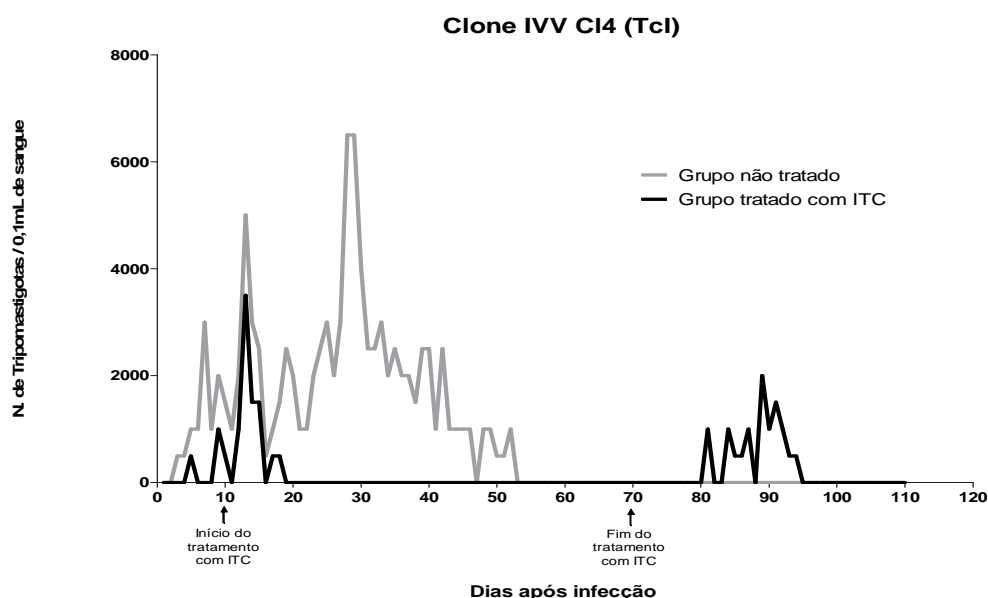


Figura 10. Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone IVV Cl4 (TclI) de *Trypanosoma cruzi* tratados com itraconazol (ITC) e não tratados.

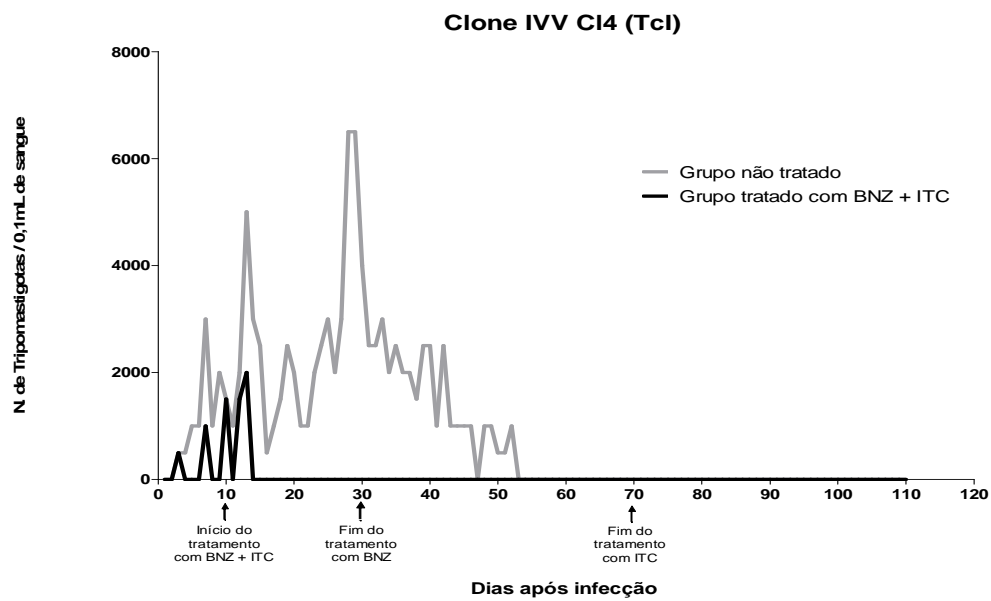


Figura 11. Curvas de parasitemia média de camundongos *Swiss* (n = 8) infectados com o clone IVV Cl4 (Tcl) de *Trypanosoma cruzi* tratados com a associação benzonidazol e itraconazol (BNZ + ITC) e não tratados.

Foi observada reativação da infecção 20 dias após o encerramento do tratamento apenas no grupo de animais tratados com o ITC empregado separadamente (**Figura 10**). Esta parasitemia permaneceu patente por um período de 15 dias ao longo da avaliação feita até o 110° dia de infecção.

6.2.2.1 Parâmetros Derivados da Curva de Parasitemia

A parasitemia (PAR), representada pela área sob a curva, e os demais parâmetros derivados desta, PPP (período pré-patente), PP (período patente), PMP (pico máximo de parasitemia) e DPMP (dia do pico máximo de parasitemia) observados nos grupos de animais tratados por qualquer dos esquemas terapêuticos empregados (BNZ, ITC e BNZ+ITC) foram significativamente menores ($p < 0,001$) em relação aos grupos não tratados.

Os animais infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl) e tratados com BNZ e com BNZ + ITC apresentaram uma redução da PAR significativamente maior ($p < 0,001$) em relação ao grupo tratado com ITC. Similarmente, os grupos de animais infectados com o clone BUG2149 Cl10 (TcV), apresentaram redução significativa da PAR ($p < 0,001$) no tratamento com BNZ e com BNZ+ITC do que o grupo tratado apenas com o ITC (**Tabela 7**). Nos animais infectados com o clone IVV Cl4 (TclI), não foi observado diferença significativa da PAR entre os esquemas de tratamento utilizados.

Em relação ao parâmetro PPP, não ocorreram alterações significativas em nenhum dos tratamentos empregados para nenhum dos grupos experimentais.

A comparação entre os três esquemas de tratamento (**Tabela 7**) mostra que os grupos de animais infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl), tratados com BNZ e com BNZ+ITC apresentaram uma redução do PP significativamente maior ($p < 0,001$) quando comparados com o grupo tratado com ITC. Ambos os grupos de animais, infectados com o clone BUG2149 Cl10 (TcV) e infectados com o clone IVV Cl4 (TclI) não apresentaram diferença significativa do parâmetro PP entre os esquemas terapêuticos empregados.

Em relação ao parâmetro PMP, os grupos de animais infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl) e os grupos infectados com o clone BUG2149 Cl10 (TcV) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos empregados. Os grupos de animais infectados com o clone IVV Cl4 (TcV), tratados com BNZ e com BNZ+ITC apresentaram um redução significativamente maior do PMP ($p < 0,001$) do que o grupo tratado com ITC – **Tabela 7**.

O tratamento do grupo infectado com o clone P209 Cl1 (Tcl) com ITC promoveu uma antecipação significativamente menor ($p < 0,01$) do DPMP em relação aos grupos tratados com BNZ e BNZ+ITC (**tabela 7**). Nos grupos de animais infectados com os clones BUG 2149 Cl10 (TcV)

e IVV Cl4 (TcII) não houve diferenças significativa no DPMP das respectivas curvas de parasitemia.

Tabela 7. Parâmetros de parasitemia médio em camundongos Swiss (n = 8) infectados com diferentes grupos genéticos do *Trypanosoma cruzi* e tratados com benzonidazol e itraconazol empregados separadamente e em associação.

Grupos genéticos	Tratamento	PAR (x10 ³)	PPP (dias)	PP (dias)	PMP (x 10 ³)	DPMP (dias)
P209 Cl1 (Tcl)	NT	988 ± 732	9,75 ± 2,03	55,13 ± 8,86	62,0 ± 39,08	19,88 ± 6,40
	BNZ	8 ± 3	8,50 ± 2,40	2,00 ± 1,60	4,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	ITC	67 ± 42 *	10,00 ± 2,40	21,35 ± 16,64 *	9,00 ± 2,83	7,63 ± 6,66*
	BNZ+ITC	5 ± 15	8,88 ± 1,25	1,13 ± 0,35	4,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
BUG2149 Cl10 (TcV)	NT	311 ± 125	6,50 ± 7,01	32,25 ± 11,91	9,50 ± 2,07	29,88 ± 5,80
	BNZ	64 ± 25	7,50 ± 1,51	5,38 ± 2,72	4,50 ± 1,41	1,50 ± 1,41
	ITC	166 ± 55*	6,75 ± 3,58	3,38 ± 4,47	5,50 ± 2,07	3,00 ± 4,04
	BNZ+ITC	48 ± 23	6,50 ± 1,20	6,75 ± 1,04	4,50 ± 1,41	1,50 ± 1,41
IVV Cl4 (TcII)	NT	85 ± 41	8,63 ± 2,45	16,25 ± 4,20	37,00 ± 5,55	7,25 ± 1,28
	BNZ	17 ± 3	8,75 ± 2,25	11,00 ± 2,14	10,00 ± 3,02	3,25 ± 1,49
	ITC	21 ± 17	8,63 ± 2,45	10,88 ± 2,64	27,00 ± 5,13 *	5,38 ± 2,00
	BNZ+ITC	11 ± 6	8,25 ± 1,98	11,13 ± 2,17	10,75 ± 4,66	3,38 ± 0,92

NT, grupo não tratado; PAR, parasitemia (área sob a curva); PPP, período pré patente; PP, período patente; PMP, pico máximo de parasitemia; DPMP, dia do pico máximo de parasitemia.

* Diferenças significativas entre os tratamentos empregados com $p < 0,05$ e IC 95%

6.2.3. Avaliação da Eficácia Terapêutica

Os métodos de avaliação parasitológica por exame de sangue a fresco (ESF), hemocultura (HC), reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de sangue e o método sorológico de reação imunoenzimática (ELISA), revelaram que o tratamento com BNZ empregado separadamente apresentou índice de cura de 12,5 % para os camundongos infectados com os clones P209 Cl1 (Tcl) e BUG2149 Cl10 (TcV) e 37,5 % para os camundongos infectados com o clone IVV Cl4 (TcII).

O tratamento com ITC empregado separadamente resultou em falha terapêutica em 100% dos animais infectados com os clones P209 Cl1 (Tcl) e BUG2149 Cl10 (TcV) e o grupo de animais infectados com o clone IVV Cl4 (TcII), apresentou um índice de cura de 12,5 %.

Quando os camundongos foram tratados com a quimioterapia associada (BNZ + ITC), os

grupos infectados com os clones P209 Cl1 (Tcl) e BUG2149 Cl10 (TcV) apresentaram índice de cura de 37,5 %, cujo aumento foi significativamente maior em relação ao tratamento com BNZ ($p = 0,0469$) e ITC ($p = 0,0318$) empregados separadamente. O grupo experimental infectado com o clone IVV Cl4 (Tcll) apresentou o índice de cura de 87,5 % quando submetido à quimioterapia associada, sendo este índice significativamente maior ao obtido pelo tratamento com BNZ ($p = 0,0458$) e ITC ($p = 0,0091$) em seus esquemas terapêuticos isolados (**Tabela 8**).

A comparação entre os três esquemas terapêuticos empregados mostra que houve um aumento significativo ($p = 0,0124$) no índice de cura global quando se empregou o tratamento com a associação (BNZ + ITC) em comparação aos esquemas de tratamento empregando o BNZ e o ITC separadamente, em todos os grupos experimentais.

Tabela 8. Índice de cura e porcentagem de falha terapêutica acumulada detectada no diagnóstico de infecção pelo *T. cruzi* empregando os métodos de avaliação parasitológicos e sorológico.

Grupos Genéticos	Tratamento	Porcentagem de falha terapêutica acumulada				Índice de cura (%)
		ESF (%)	HC (%)	PCR (%)	ELISA (%)	
P209 Cl1 (Tcl)	BNZ	25,0	62,5	87,5	87,5	12,5
	ITC	37,5	100	100	100	0
	BNZ+ITC	0,00	0,00	0,00	62,5	37,5
BUG2149 Cl10 (TcV)	BNZ	0,00	50,0	75,0	87,5	12,5
	ITC	37,5	62,5	100	100	0
	BNZ+ITC	0,00	12,5	50,0	62,5	37,5
IVV Cl4 (Tcll)	BNZ	0,00	12,5	37,5	62,5	37,5
	ITC	25,0	50,0	75,0	87,5	12,5
	BNZ+ITC	0,00	0,00	0,00	12,5	87,5

ESF, exame de sangue a fresco; HC, hemocultura; PCR, reação em cadeia da polimerase; ELISA, ensaio imunoenzimático.

Segundo o critério de Toledo e cols. (2003), os índices de cura resultantes dos tratamentos empregados neste trabalho classificaram os clones P209 Cl1 (Tcl) e BUG2149 Cl10 (TcV) como resistentes ao BNZ (12,5 %) e ITC (0 %) empregados separadamente e parcialmente resistente (37,5 %) ao tratamento com ambos os fármacos administrados em associação. O clone IVV Cl4 foi classificado como parcialmente resistente ao tratamento com BNZ (37,5 %), resistente ao tratamento com ITC (12,5 %) e sensível ao tratamento empregando a associação de BNZ e ITC (87,5 % de cura) – **Tabela 8**.

PARTE II – Desenvolvimento e Validação do Método Bioanalítico para Quantificação de BNZ e ITC

6.3. Desenvolvimento do Método Bioanalítico

Neste trabalho desenvolveu-se um método utilizando CLAE para a quantificação simultânea de BNZ e ITC em amostras de plasma de camundongo tratados com ambos os fármacos empregados isoladamente e em associação.

Foi desenvolvida uma condição otimizada para quantificar o BNZ e o ITC na presença do PI, utilizando fase móvel com menor quantidade possível de solvente orgânico, em menor tempo de análise, sem interferência dos constituintes do plasma e obtendo boa recuperação.

6.3.1. Condições Cromatográficas

O melhor desempenho na separação dos analitos consistiu na utilização de fase móvel composta por mistura de acetonitrila e água na proporção de 60:40 (v/v), sob fluxo de 1,0 mL/min, a uma temperatura de 40°C e volume de injeção de 25 µL da amostra processada. Os comprimentos de onda empregados no detector UV foram de 324 nm para o BNZ e 263 nm para o ITC, que apresentaram tempos de retenção de 1,85 e 9,94 minutos, respectivamente (**Figura 12**). O padrão interno selecionado, diazepam, foi detectado nas mesmas condições estabelecidas para o BNZ e o ITC, devido a sua ampla faixa de absorção na região do UV (230 a 350 nm) e seu tempo de retenção na coluna cromatográfica foi de 3,76 minutos.

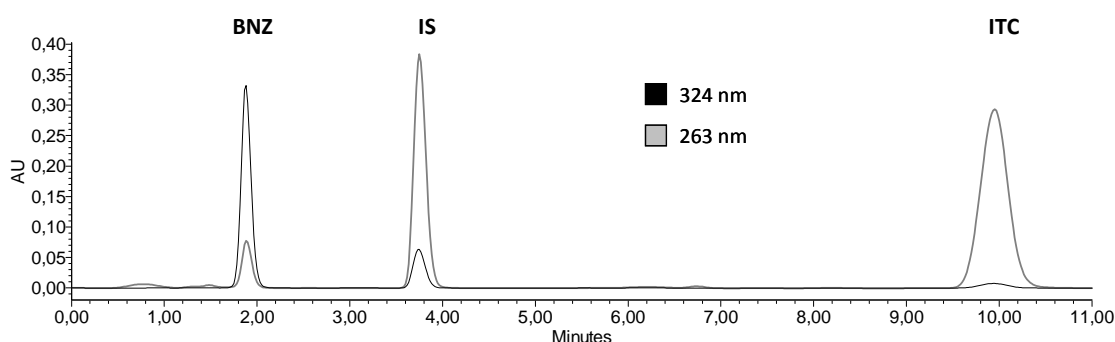


Figura 12. Cromatogramas do BNZ, ITC e PI nas concentrações de 100µg/mL extraídos a 324 e 263 nm utilizando acetonitrila e água na proporção de 60:40 (v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, e temperatura de 40°C.

6.3.2. Purificação das Amostras de Plasma de Camundongo para Quantificação de Benzonidazol e Itraconazol

O procedimento de purificação de amostras de plasma dos animais que apresentou a melhor recuperação do padrões analíticos foi realizado através de dupla extração líquido-líquido utilizando-se duas porções de 1,0 mL de éter etílico. As amostras foram agitadas em vórtex por 20 minutos e centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. A fase orgânica acumulada foi filtrada em unidade HV Millex com membrana Millipore[®] de 13 mm de diâmetro e poro de 0.45 μm . O filtrado foi evaporado sob vácuo até a secura e o resíduo foi reconstituído em 300 μL de fase móvel para ser analisado pelo método cromatográfico desenvolvido.

6.4. Validação do Método para Quantificação do Benzonidazol e Itraconazol em Plasma de Camundongo

6.4.1. Especificidade

O método desenvolvido apresentou boa separação dos analitos entre si e entre estes e os componentes do plasma branco e hemolisado. Os sinais cromatográficos referentes ao BNZ, ITC e PI apresentaram adequada resolução (Figuras 13 e 14).

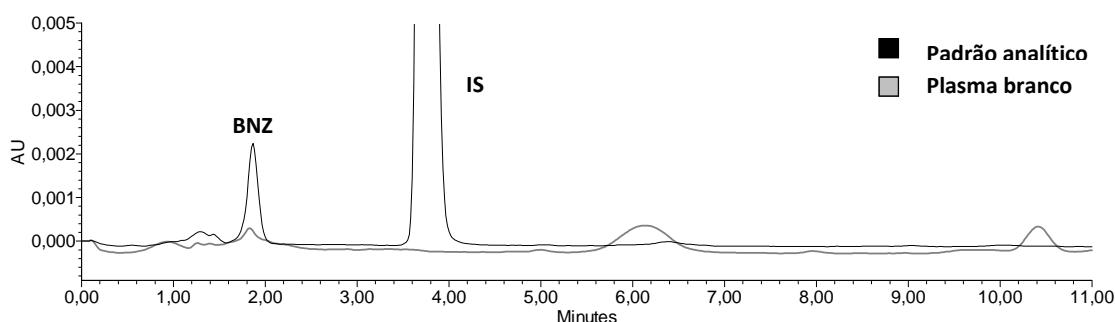


Figura 13. Cromatogramas superpostos referentes às análises de amostra de plasma branco obtida de animal sadio sem a administração de BNZ e ITC comparado ao perfil cromatográfico do padrão analítico extraído a 324 nm, utilizando acetonitrila e água na proporção de 60:40 (v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, e temperatura de 40°C.

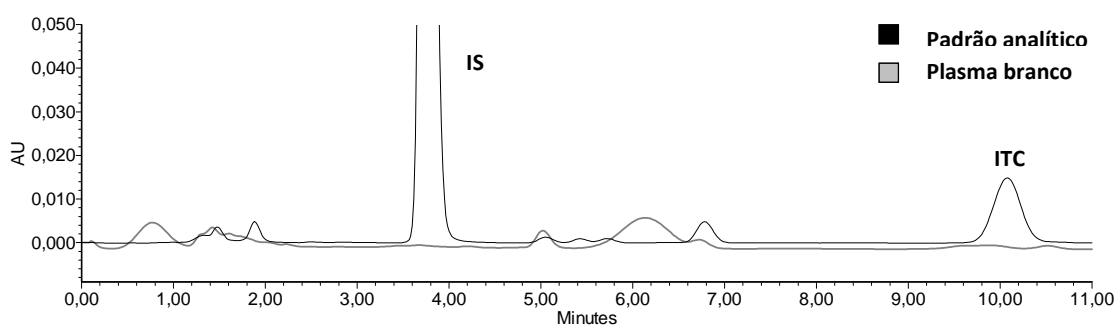


Figura 14. Cromatogramas superpostos referentes às análises de amostra de plasma branco obtida de animal sadio sem a administração de BNZ e ITC comparado ao perfil cromatográfico do padrão analítico extraído a 263 nm, utilizando acetonitrila e água na proporção de 60:40 (v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, e temperatura de 40°C.

6.4.2. Recuperação

As recuperações médias do procedimento de purificação de amostras de plasma de controle de qualidade foram de 92,46; 93,92 e 103,21 % para o BNZ, ITC e PI, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9. Recuperação média (n = 5) do procedimento de purificação das amostras de plasma de controle de qualidade adicionadas de BNZ e ITC (padrões) e diazepam (padrão interno).

	Concentração (µg/mL)		Recuperação (%)		
	BNZ	ITC	BNZ (CV%)	ITC (CV%)	PI (CV%)
CQB	1,00	2,50	93,55 (1,55)	101,85 (5,67)	101,81 (5,73)
CQM	25,0	15,0	89,77 (6,02)	96,63 (6,58)	106,30 (5,37)
CQA	75,0	50,0	94,07 (4,68)	83,28 (3,97)	101,53 (8,29)
		Média	92,46	93,92	103,21
		DP (µg/mL)	2,35	9,57	2,68
		CV (%)	2,54	10,20	2,59

CQB, controle de qualidade baixo; CQM, controle de qualidade médio; CQA, controle de qualidade alto.
DP, desvio padrão; CV, coeficiente de variação.

6.4.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação Inferior

Os limites de detecção do BNZ e ITC foram de 0,36 e 0,68 µg/mL, respectivamente. Os

limites de quantificação do BNZ e ITC foram de 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Ambos os limites apresentaram valores de precisão e exatidão de 0,72 e 105,53%, respectivamente, para o BNZ e de 5,88 e 99,42%, respectivamente, para o ITC.

6.4.4. Linearidade

Obteve-se correlação linear entre concentração de fármaco e resposta do método, na faixa de concentração de 0,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ para o BNZ e de 1,0 a 75 $\mu\text{g/mL}$ para o ITC em plasma. A **Figura 15** apresenta a curva de calibração definida no método e os parâmetros relativos a ela estão representados na **Tabela 10**.

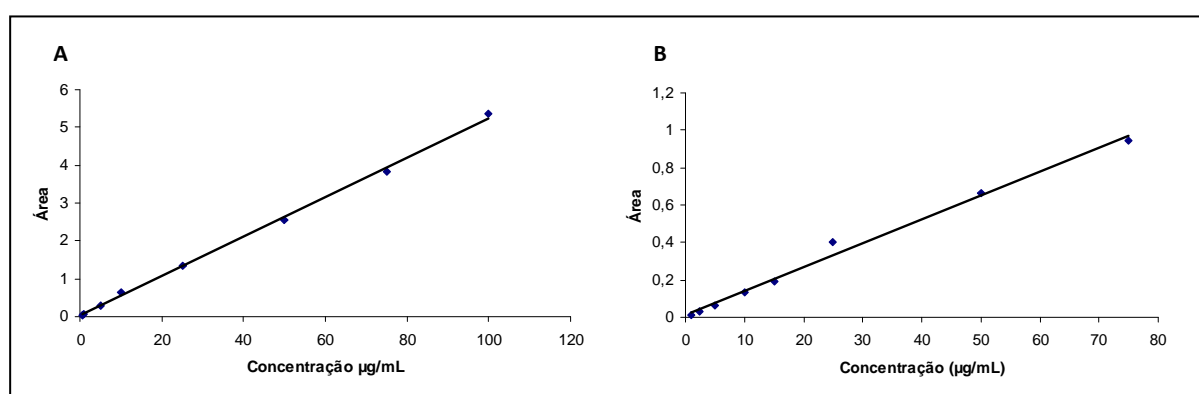


Figura 15. Curvas de calibração do método analítico para quantificação de (A) BNZ e (B) ITC em plasma por cromatografia a líquido de alta eficiência utilizando acetonitrila e água na proporção de 60:40 (v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, e temperatura de 40°C.

Tabela 10. Parâmetros relativos à linearidade do método analítico para quantificação de BNZ e ITC em plasma de camundongo por cromatografia líquida de alta eficiência.

Parâmetros	BNZ	ITC
Coefficiente angular (a)	0,0522	0,0128
Coefficiente linear (b)	0,0229	0,0111
Coefficiente de correlação (r^2)	0,9985	0,9924

6.4.5. Precisão

A precisão do método para quantificação do BNZ nas amostras de plasma de camundongo preparadas nas concentrações baixa, média e alta, esteve entre 1,71 e 5,84 % quando analisadas no mesmo dia (intra-ensaio) e entre 2,57 e 6,45 % quando analisadas em

dias diferentes (inter-ensaios). O método também foi preciso para a quantificação do ITC nas mesmas condições, com resultados intra-ensaio entre 3,98 e 6,58 % e inter-ensaios entre 5,12 e 6,00 %. Os resultados estão apresentados na **Tabela 11**.

5.4.6. Exatidão

Todas as amostras de controle de qualidade adicionadas de BNZ e ITC apresentaram desvios em relação aos valores nominais menores que 15%. A exatidão do método para a quantificação de BNZ nas amostras analisadas no mesmo dia variou de 93,10 a 102,06 % e para amostras analisadas em diferentes dias variou de 95,88 a 99,42 %. Para a quantificação do ITC nas mesmas condições, a exatidão variou de 89,06 a 99,46 % no intra-ensaio e de 92,10 a 96,89 nos inter-ensaios. Os resultados estão resumidos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Resultados de precisão e exatidão intra e inter-ensaios referentes ao método analítico para quantificação de BNZ e ITC em plasma de camundongo por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados expressam a média da análise de seis amostras para precisão e exatidão intra-ensaio e seis determinações por dia, durante 3 dias, para precisão e exatidão inter-ensaios.

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		PRECISÃO (CV %)				EXATIDÃO (%)			
			Intra-ensaio		Inter-ensaios		Intra-ensaio		Inter-ensaios	
	BNZ	ITC	BNZ	ITC	BNZ	ITC	BNZ	ITC	BNZ	ITC
CQB	1,00	2,50	1,71	5,67	2,57	5,12	93,10	90,45	97,44	92,27
CQM	25,0	15,0	5,84	6,58	6,45	6,00	92,09	89,06	95,88	92,10
CQA	75,0	50,0	2,17	3,97	4,45	5,24	102,06	99,46	99,42	96,89

CQB, controle de qualidade baixo; CQM, controle de qualidade médio; CQA, controle de qualidade alto.

6.4.7. Estabilidade

6.4.7.1. Estabilidade de Curta Duração

Os resultados da avaliação da estabilidade de curta duração mostraram que as amostras de plasma de controle de qualidade mantidas à temperatura ambiente por 4 horas mantiveram-se estáveis – **Tabelas 12 e 13**.

Tabela 12. Estabilidade do BNZ em amostras de plasma de camundongo, analisadas após permanência à temperatura ambiente por 4 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações.

	Concentração Nominal (µg/mL)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas após 4 horas à temperatura ambiente			
		Concentração Real (µg/mL)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)	Concentração Real (µg/mL)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)	Tendência (bias) (%)
		CQB	1,00	1,05	4,44	104,96	0,95	8,24
CQM	25,00	25,53	4,94	102,11	26,35	3,84	105,40	3,22
CQA	75,00	72,74	9,43	96,99	74,29	8,29	99,05	2,12

Tabela 13. Estabilidade do ITC em amostras de plasma de camundongo, analisadas após permanência à temperatura ambiente por 4 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações.

	Concentração Nominal (µg/mL)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas após 4 horas à temperatura ambiente			
		Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Tendência (bias) (%)
		CQB	2,50	2,54	5,16	101,50	2,50	6,66
CQM	15,00	14,71	7,06	98,07	16,39	8,32	109,25	11,40
CQA	50,00	50,52	4,55	101,04	51,57	7,02	103,14	2,08

5.4.7.2. Estabilidade em Ciclos de Congelamento e Descongelo

A avaliação dos resultados da estabilidade das amostras de plasma de controle de qualidade avaliadas por três ciclos de congelamento e descongelamento mostrou que estas se mantiveram estáveis (**Tabelas 14 e 15**).

Tabela 14. Estabilidade do BNZ em amostras de plasma de camundongo mantidas à temperatura de -20°C e submetida a um, dois e três ciclos de congelamento e descongelamento e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações.

Ciclos		Concentração Nominal (µg/mL)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas após 4 horas à temperatura ambiente			
			Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Tendência (bias) (%)
			1	CQB	1,00	1,05	4,44	104,96	0,99
	CQM	25,00	25,53	4,94	102,11	27,53	5,25	110,11	7,83
	CQA	75,00	72,74	9,43	96,99	75,54	10,12	100,72	3,85
2	CQB	1,00	1,05	4,44	104,96	1,02	9,90	101,90	- 2,92
	CQM	25,00	25,53	4,94	102,11	27,50	8,93	109,99	7,72
	CQA	75,00	72,74	9,43	96,99	76,32	3,53	101,76	4,91
3	CQB	1,00	1,05	4,44	104,96	0,99	13,88	98,74	- 5,93
	CQM	25,00	25,53	4,94	102,11	26,99	8,40	107,83	5,60
	CQA	75,00	72,74	9,43	96,99	75,09	5,16	100,12	3,27

Tabela 15. Estabilidade do ITC em amostras de plasma de camundongo mantidas à temperatura de -20°C e submetida a um, dois e três ciclos de congelamento e descongelamento e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações.

Ciclos		Concentração Nominal (µg/mL)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas após 4 horas à temperatura ambiente			
			Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Tendência (bias) (%)
			1	CQB	2,50	2,54	5,16	101,50	2,46
	CQM	15,00	14,71	7,06	98,07	16,16	13,13	107,71	9,83
	CQA	50,00	50,52	4,55	101,04	52,52	4,26	105,03	3,95
2	CQB	2,50	2,54	5,16	101,50	2,21	5,09	88,54	- 12,77
	CQM	15,00	14,71	7,06	98,07	14,16	10,00	94,42	- 3,72
	CQA	50,00	50,52	4,55	101,04	50,86	7,62	101,72	0,67
3	CQB	2,50	2,54	5,16	101,50	2,3	6,29	89,44	- 11,88
	CQM	15,00	14,71	7,06	98,07	14,03	6,42	93,55	- 4,61
	CQA	50,00	50,52	4,55	101,04	48,48	8,81	96,96	- 4,03

6.4.7.3. Estabilidade Pós-Processamento

Foi avaliada a estabilidade pós-processamento por 48 horas à temperatura ambiente e os resultados mostram que as amostras foram capazes de se manter estáveis durante o período de análise pelo autoinjeter na cromatografia líquida de alta eficiência (**Tabelas 16 e 17**).

Tabela 16. Estabilidade do BNZ em amostras de plasma de camundongo purificadas e mantidas a temperatura

ambiente por 48 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações.

	Concentração Nominal (µg/mL)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas após 4 horas à temperatura ambiente			
		Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Tendência (bias) (%)
		CQB	1,00	1,05	4,44	104,96	1,02	5,71
CQM	25,00	25,53	4,94	102,11	25,84	4,37	103,35	1,21
CQA	75,00	72,74	9,43	96,99	79,06	13,47	105,41	8,68

Tabela 17. Estabilidade do ITC em amostras de plasma de camundongo purificadas e mantidas a temperatura ambiente por 48 horas e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de cinco determinações.

	Concentração Nominal (µg/mL)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas após 4 horas à temperatura ambiente			
		Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Tendência (bias) (%)
		CQB	2,50	2,54	5,16	101,50	2,42	11,16
CQM	15,00	14,71	7,06	98,07	14,72	10,63	98,11	0,04
CQA	50,00	50,52	4,55	101,04	52,11	5,32	104,22	3,15

6.4.7.4. Estabilidade de Longa Duração

As amostras de plasma de controle de qualidade contendo BNZ e ITC, armazenadas a - 20°C, mantiveram-se estáveis por dois meses (**Tabelas 18 e 19**).

Tabela 18. Estabilidade do BNZ em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas 120 dias após o preparo e armazenadas a - 20°C e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de três determinações.

	Concentração Nominal (µg/mL)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas após 4 horas à temperatura ambiente			
		Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração Real (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Tendência (bias) (%)
		CQB	1,00	1,05	4,44	104,96	0,94	1,56
CQM	25,00	25,53	4,94	102,11	23,17	6,02	92,67	- 9,24
CQA	75,00	72,74	9,43	96,99	73,17	4,68	97,56	0,59

Tabela 19. Estabilidade do BNZ em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas 120 dias após o preparo e armazenadas a - 20°C e comparadas com amostras processadas imediatamente após o preparo. Cada resultado representa a média de três determinações.

	Concentração Nominal (µg/mL)	Amostras processadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas após 4 horas à temperatura ambiente			
		Concentração	Precisão	Exatidão	Concentração	Precisão	Exatidão	Tendência
		Real (µg/mL)	(%)	(%)	Real (µg/mL)	(%)	(%)	(bias) (%)
CQB	2,50	2,54	5,16	101,50	2,65	5,67	105,86	4,30
CQM	15,00	14,71	7,06	98,07	14,05	6,58	93,65	- 4,51
CQA	50,00	50,52	4,55	101,04	48,32	3,65	96,63	- 4,36

6.4.7.5. Estabilidade das Soluções Padrão

Os resultados da avaliação da estabilidade das soluções-padrão em dimetilsulfóxido apresentaram desvio médio de - 4,55%, - 5,28 % e - 3,72 % para os padrões de BNZ, ITC, e PI, respectivamente.

PARTE III – Avaliação Farmacocinética de Camundongos Tratados com BNZ, ITC e BNZ + ITC

6.5. Quantificação do Benzonidazol e Itraconazol nas Amostras de Plasma de Camundongo

Na **Figura 16** está ilustrada a determinação do BNZ e ITC nas amostras de plasma de camundongo tratados com os fármacos pela metodologia bioanalítica desenvolvida e validada para esse propósito.

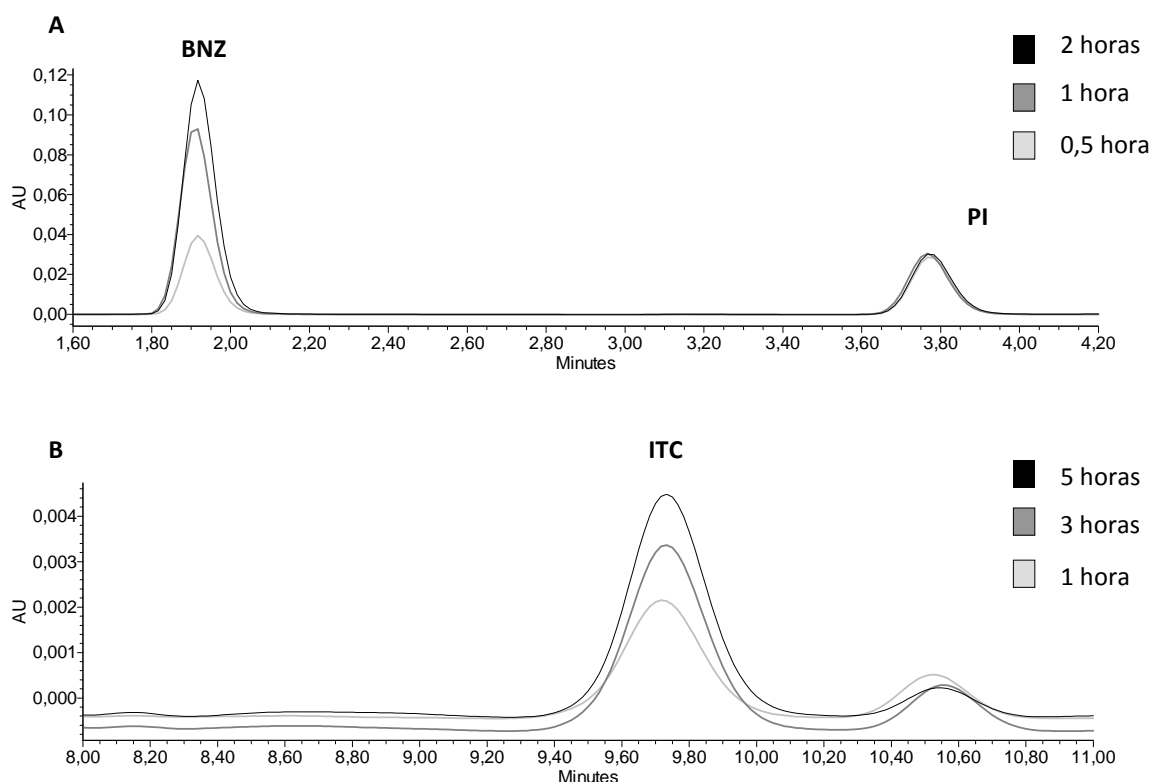


Figura 16. Cromatogramas da determinação de BNZ e ITC em amostras de plasma de animais tratados com 5 mg de cada fármaco coletadas em (A) 0,5; 1 e 2 horas após administração e (B) 1, 3 e 5 horas após administração.

6.6. Avaliação Farmacocinética

Nas **Tabelas 20** e **21** estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos obtidos das curvas de concentração plasmática em função do tempo após a administração de dose única de 5 mg de BNZ e ITC, respectivamente, considerando o cronograma de coleta das amostras pelo período de 48 horas.

Tabela 20. Parâmetros farmacocinéticos do BNZ administrado em camundongos após dose oral única de 5 mg.

Curvas	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	T_{max} (h)	ASC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	λ_z (1/h)	$t_{1/2\beta}$ (h)
1	152,59	2,00	589,19	591,80	0,60	1,16
2	171,04	2,00	525,11	528,46	0,52	1,34
3	154,06	2,00	502,97	512,71	0,22	3,21
4	134,66	2,00	528,78	537,83	0,76	0,91
5	144,06	2,00	549,63	564,81	0,44	1,58
Média	151,28	2,20	539,14	547,12	0,50	1,63
EP	6,03	0,00	14,54	14,01	0,09	0,41

C_{max} , concentração máxima; T_{max} , tempo da concentração máxima; ASC_{0-t} , área sob a curva até a última concentração determinada; $ASC_{0-\infty}$, área sob a curva extrapolada ao infinito; λ_z , constante de eliminação plasmática; $t_{1/2\beta}$, tempo de meia vida de eliminação plasmática; EP, erro padrão.

Tabela 21. Parâmetros farmacocinéticos do ITC administrado em camundongos após dose oral única de 5 mg.

Curvas	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	T_{max} (h)	ASC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	λ_z (1/h)	$t_{1/2\beta}$ (h)
1	8,85	5,00	59,48	60,85	0,22	3,11
2	15,84	5,00	60,19	61,41	0,40	3,35
3	10,41	5,00	76,05	95,28	0,19	3,61
4	13,92	4,00	67,60	68,85	0,05	5,59
5	9,76	4,00	66,35	83,14	0,16	3,97
Média	11,76	4,60	65,93	73,90	0,20	3,68
EP	1,33	0,24	2,30	6,69	0,06	0,69

C_{max} , concentração máxima; T_{max} , tempo da concentração máxima; ASC_{0-t} , área sob a curva até a última concentração determinada; $ASC_{0-\infty}$, área sob a curva extrapolada ao infinito; λ_z , constante de eliminação plasmática; $t_{1/2\beta}$, tempo de meia vida de eliminação plasmática; EP, erro padrão.

Os efeitos da administração concomitante de BNZ e ITC sobre os seus parâmetros farmacocinéticos individuais obtidos das curvas de concentração plasmática em função do tempo após a administração de dose única de 5 mg de ambos estão apresentados nas **Tabelas 22 e 23**.

Tabela 22. Parâmetros farmacocinéticos do BNZ após administração de sua associação com ITC, ambos em dose oral única de 5 mg.

Curvas	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	T_{max} (h)	ASC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	λ_z (1/h)	$t_{1/2\beta}$ (h)
1	114,54	2,00	538,89	539,48	0,07	9,82
2	92,32	2,00	562,03	580,29	0,05	13,02
3	95,01	2,00	509,69	522,18	0,06	11,42
4	112,64	3,00	575,65	505,72	0,05	14,48
5	91,46	3,00	584,49	511,13	0,06	12,19
Média	101,19	2,40	554,15	531,80	0,06	12,19
EP	5,10	0,24	13,55	13,44	0,00	0,78

C_{max} , concentração máxima; T_{max} , tempo da concentração máxima; ASC_{0-t} , área sob a curva até a última concentração determinada; $ASC_{0-\infty}$, área sob a curva extrapolada ao infinito; λ_z , constante de eliminação plasmática; $t_{1/2\beta}$, tempo de meia vida de eliminação plasmática; EP, erro padrão.

Tabela 23. Parâmetros farmacocinéticos do ITC após administração de sua associação com BNZ, ambos em dose oral única de 5 mg.

Curvas	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	T_{max} (h)	ASC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	λ_z (1/h)	$t_{1/2\beta}$ (h)
1	7,56	5,00	49,84	51,01	0,33	2,09
2	12,92	4,00	69,10	87,59	0,21	3,35
3	10,06	6,00	97,45	116,00	0,11	6,59
4	12,34	5,00	72,72	91,88	0,25	2,82
5	9,88	5,00	98,15	115,58	0,15	4,64
Média	10,55	5,00	77,45	92,41	0,21	3,90
EP	0,96	0,32	9,17	11,90	0,04	0,79

C_{max} , concentração máxima; T_{max} , tempo da concentração máxima; ASC_{0-t} , área sob a curva até a última concentração determinada; $ASC_{0-\infty}$, área sob a curva extrapolada ao infinito; λ_z , constante de eliminação plasmática; $t_{1/2\beta}$, tempo de meia vida de eliminação plasmática; EP, erro padrão.

A média de todos os parâmetros farmacocinéticos do BNZ e ITC administrados em camundongos, separadamente e em associação, estão resumidas na **Tabela 24**.

Tabela 24. Parâmetros farmacocinéticos médios do BNZ e ITC administrados em camundongos, separadamente e em associação, após dose oral única de 5 mg de cada fármaco (média \pm desvio padrão de cinco curvas farmacocinéticas).

		Administração separada		Administração associada	
		BNZ	ITC	BNZ	ITC
AUC _{0-t}	($\mu\text{g.h/mL}$)	539,14 \pm 14,54	65,93 \pm 2,30	554,15 \pm 13,55	77,45 \pm 9,17
AUC _{0-∞}	($\mu\text{g.h/mL}$)	547,12 \pm 14,01	73,90 \pm 6,69	531,80 \pm 13,44	92,41 \pm 11,19
C _{max}	($\mu\text{g/Kg}$)	151,28 \pm 6,03*	11,76 \pm 1,33	101,19 \pm 5,10*	10,55 \pm 0,96
T _{max}	(h)	2,20 \pm 0,00	4,6 \pm 0,24	2,4 \pm 0,24	5,00 \pm 0,32
λ_z	(h ⁻¹)	0.50 \pm 0,09*	0.20 \pm 0,06	0.06 \pm 0,00*	0.21 \pm 0,04
t _{½β}	(h)	1.63 \pm 0,41*	3.68 \pm 0,69	12.19 \pm 0,78*	3.90 \pm 0,79

* Diferenças significativas com $P < 0,05$ e IC 95% por análise de variância (ONEWAY ANOVA)

Quando o BNZ foi empregado separadamente, foi possível detectar sua concentração plasmática pelo método desenvolvido até um período de 12 horas após a administração, com pico de concentração máxima média de 151, 28 $\mu\text{g/Kg}$. A média do tempo de meia-vida de eliminação (t_{½ β}) para o BNZ foi de 1,63 horas e os valores médios de AUC_{0-t} (t = 12 h) e AUC_{0- ∞} foram de 539,14 e 547,12 $\mu\text{g.h/mL}$ respectivamente.

Na co-administração com ITC houve uma diminuição significativa no valor médio de C_{max} do BNZ de 151,28 para 101,19 $\mu\text{g/Kg}$ (1,5 vezes com $P < 0.0032$) e um aumento no t_{½ β} do BNZ que foi estendido de 1,63 para 12,18 horas (7,47 vezes com $p < 0.0001$). Os valores médios de AUC_{0-t}, AUC_{0- ∞} e T_{max} não apresentaram alterações significativas.

A **Figura 17** mostra a media de cinco curvas de concentração plasmática x tempo para o BNZ na presença e ausência do ITC em plasma de camundongo e um destaque da porção final desta curva que ilustra o aumento do tempo de meia vida de eliminação do BNZ como consequência de sua interação com o ITC.

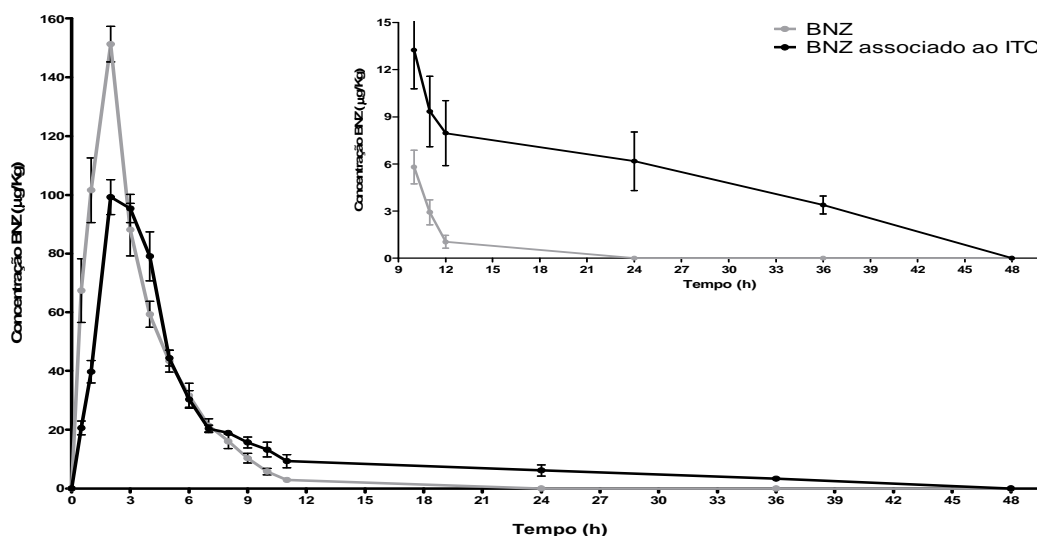


Figura 17. Perfil médio das concentrações plasmáticas de BNZ administrado separadamente e em associação com ITC em camundongos ($n = 5$) após dose oral única de 5 mg de cada fármaco.

Por outro lado, o BNZ não causou nenhum efeito na farmacocinética do ITC. Houve um leve aumento em AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ para ambos os fármacos quando administrados em associação e uma leve diminuição na C_{max} do ITC quando administrado junto com o BNZ, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas (**Tabela 21**). Os perfis médios das curvas de concentração plasmática do ITC em função do tempo após administração deste separadamente e em associação com o BNZ estão ilustrados na **Figura 18**.

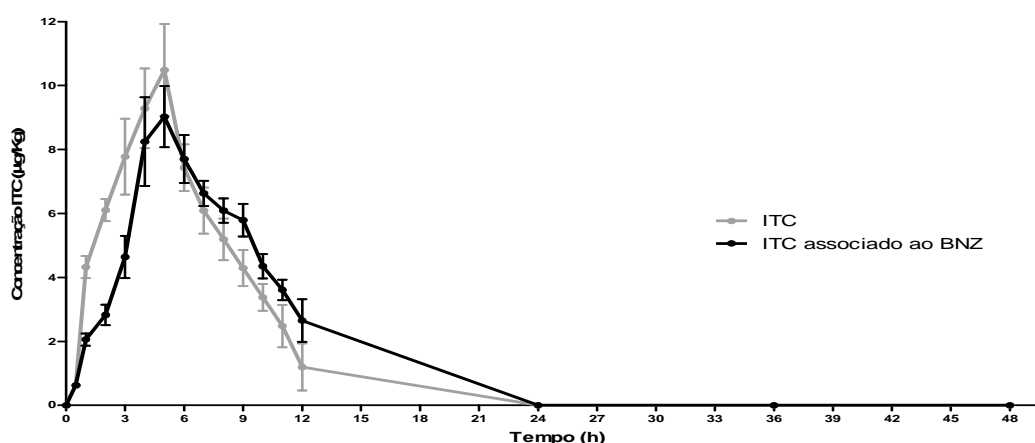


Figura 18. Perfil médio das concentrações plasmáticas de ITC administrado separadamente e em associação com BNZ em camundongos ($n = 5$) após dose oral única de 5 mg de cada fármaco.

Discussão

7. DISCUSSÃO

PARTE I – Avaliação da eficácia terapêutica dos tratamentos com BNZ, ITC e BNZ+ITC em camundongos infectados com clones de *T. cruzi* de diferentes grupos genéticos

Tendo em vista que a variabilidade genética do *T. cruzi* apresenta correlação com a resposta a quimioterapia experimental (Andrade *et al.*, 1985, 1992; Revollo *et al.*; 1998; Toledo *et al.*, 2003), a hipótese explorada nesse trabalho é de que a combinação dos fármacos benzonidazol e itraconazol resulte em melhor eficácia no tratamento da infecção chagásica em modelo murino. Esta hipótese foi trabalhada em infecções experimentais com clones de *T. cruzi* pertencentes a grupos genéticos distintos que apresentaram os maiores perfis de resistência aos fármacos BNZ e ITC empregados isoladamente, conforme observado por Toledo e cols. (2003).

O tratamento empregando o BNZ separadamente, de uma forma geral promoveu redução significativa da parasitemia em todos os grupos experimentais.

O perfil de resistência ao BNZ observado para o clone P209 Cl1 (Tcl) foi confirmado neste trabalho pela demonstração da reativação da parasitemia média dos animais infectados 29 dias depois de finalizado o tratamento. Os animais que não tiveram a reativação da parasitemia demonstrada no ESF, ao serem avaliados sucessivamente pelos demais exames parasitológicos (HC e PCR) e sorológico (ELISA) revelaram um alto percentual de falha terapêutica quando tratados com BNZ e um baixo índice de cura (12,5 %), conforme esperado para populações de *T. cruzi* com perfil de resistência a este fármaco, cujo valor é $\leq 33\%$ segundo Toledo e cols. (2003).

O tratamento dos animais infectados com o clone BUG2149 Cl10, pertencente ao grupo genético híbrido TcV, revelou um perfil de alta resistência ao BNZ. Apesar de não ter ocorrido reativação da parasitemia depois de finalizado o tratamento neste grupo experimental, o índice de cura observado após a confirmação de falha terapêutica pelos exames parasitológicos e pela ELISA foi idêntico ao observado para o clone P209 Cl1 (12,5 %), compatível com amostra de *T. cruzi* resistente ao BNZ (Toledo *et al.*, 2003).

O índice de cura obtido nos animais infectados com o clone IVV Cl4 (Tcll) quando

tratados com o BNZ separadamente foi o maior observado (37,5 %) em relação aos demais grupos experimentais, conforme já demonstrado anteriormente por Toledo e cols. (2003) que obtiveram 40% de cura com este clone. Neste grupo experimental não houve reativação da parasitemia no período pós-tratamento e os exames parasitológicos e sorológicos revelaram uma menor taxa de positividade em comparação aos outros clones avaliados.

O tratamento empregando o ITC separadamente foi menos eficaz que o BNZ em todos os grupos experimentais.

Nos animais infectados com o clone P209 Cl1 (Tcl) e tratados com ITC, a redução da parasitemia foi significativamente menor do que nos animais tratados com BNZ e BNZ + ITC, pois esta permaneceu patente durante todo o período de avaliação com alguns pequenos intervalos de negatificação durante e após o tratamento. Houve redução do PP e antecipação do DPMP em relação ao grupo não tratado, mas estas mudanças também foram significativamente menores em comparação com os mesmos grupos experimentais tratados com BNZ e com a associação BNZ + ITC. A falha terapêutica no tratamento com ITC foi detectada precocemente pela realização do ESF e HC. Estes resultados corroboram a classificação deste clone como pertencente a um grupo (Tcl) 100% resistente ao tratamento com ITC, como observado por Toledo e cols. (2003).

Nos animais infectados com o clone BUG2149 Cl10 (TcV), o tratamento com ITC promoveu a redução da parasitemia durante a maior parte do período de tratamento. No entanto, esta redução foi significativamente menor do que nos animais tratados com BNZ e com a associação BNZ + ITC. Houve reativação da infecção, que perdurou por 10 dias. Nos animais em que o ESF não detectou a presença do parasito, a HC e PCR revelaram 100% de falha terapêutica, sem a necessidade da avaliação sorológica pela ELISA, o que confirmou o caráter de resistência deste clone ao ITC demonstrado previamente (Toledo *et al.*, 2003).

Na infecção experimental com o clone IVV Cl4 (TclI) o baixo efeito do ITC na parasitemia dos animais foi evidenciado pela redução do PMP significativamente menor do que os tratamentos com BNZ e BNZ + ITC e pela reativação da parasitemia que permaneceu ativa durante 15 dias após o final do tratamento. A falha terapêutica foi detectada em 87,5% dos animais confirmando a classificação deste clone como resistente ao tratamento com ITC (Toledo *et al.*, 2003).

O tratamento empregando a associação BNZ + ITC, resultou em supressão total da parasitemia poucos dias após seu início nos três grupos experimentais, com os clones P209 Cl1, BUG2149 Cl10 e IVV Cl4. A parasitemia foi patente apenas ao período inicial da infecção e com níveis menores em relação aos tratamentos empregando os mesmos fármacos (BNZ e ITC) separadamente. Entretanto, essa diferença de parasitemia observada no início do tratamento não foi significativamente menor do que nos grupos de animais que receberam o tratamento com BNZ separadamente.

No grupo infectado com o clone P209 Cl1 (Tcl), todos os exames parasitológicos realizados, após o tratamento, para a detecção de falha terapêutica foram negativos. Apenas a avaliação sorológica pela ELISA foi capaz de detectar falha terapêutica em 62,5% dos animais, resultando no índice de cura de 37,5%. Desta forma, o clone P209 Cl1 (Tcl) classificado como resistente à quimioterapia com BNZ ou com ITC segundo Toledo e cols. (2003), passa a ser classificado como “*parcialmente resistente*” à quimioterapia com a associação BNZ + ITC, segundo este critério.

No grupo infectado com o clone BUG2149 Cl10 (TcV) a porcentagem de falha terapêutica acumulada chegou a 50% nos exames parasitológicos e atingiu 62,5% dos animais na avaliação sorológica pela ELISA. Portanto, o índice de cura registrado para este grupo experimental tratado com a associação BNZ + ITC foi de 37,5%. Assim a alteração no perfil de resistência apresentado foi semelhante à observada para o clone P209 Cl1, passando também a ser considerado como “*parcialmente resistente*” à quimioterapia com BNZ + ITC.

O maior índice de cura obtido com o tratamento empregando a associação BNZ + ITC foi observado no grupo infectado com o clone IVV Cl4 (TclI). Um percentual de 87,5% dos animais foi curado apresentando negatificação de todos os exames parasitológicos realizados após o tratamento. Apenas 12,5% dos animais foram reativos a IgG anti-*T. cruzi* na avaliação sorológica pela ELISA. Dessa forma, este clone do grupo TcII, considerado parcialmente resistente à quimioterapia com o BNZ e ITC empregados separadamente passa a ser classificado como “*sensível*” (Toledo *et al.*, 2003) ao tratamento empregando a terapia associada BNZ + ITC, confirmando assim a hipótese explorada nesse trabalho de que a combinação dos fármacos benzonidazol e itraconazol promove melhor eficácia no tratamento da infecção chagásica aguda em modelo murino.

Estes dados comprovam que a quimioterapia associada (BNZ + ITC) resultou em importantes alterações no perfil de resistência dos três clones representativos dos diferentes grupos genéticos avaliados. Foi observado ainda que essas alterações ocorreram de forma semelhante ao observado por Toledo e cols. (2003), ou seja, mantendo a distância nos padrões de resistência entre os grupos genéticos TcI e TcII (P209 Cl1 mais resistente do que IVV Cl4) demonstrada anteriormente para estes fármacos administrados separadamente. Este resultado confirma a clara correlação existente entre a genética do parasito e sua resposta a quimioterapia em relação a estes mesmos clones, ou outras cepas de *T. cruzi* estudadas anteriormente por diferentes autores (Laurent *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1985, 1992; Revollo *et al.*; 1998; Toledo *et al.*, 2003).

Uma heterogeneidade de resposta à quimioterapia foi observada por Toledo e cols. (2003) em relação ao grupo TcV, fato este resultante do caráter genético híbrido deste grupo de parasitos (Machado & Ayala, 2001; Brisse *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2003). Foram observados para este grupo, dois padrões de resposta ao BNZ e ao ITC, alguns sensíveis e outros resistentes ao tratamento. Estes autores demonstraram que o clone BUG2149 Cl10 foi 100% resistente ao BNZ e ao ITC. Esta mesma tendência de resistência ao tratamento foi aqui novamente confirmada, tanto no tratamento isolado com BNZ (12,5% de cura), quanto com ITC (0% de cura). Porém, o tratamento associado (BNZ + ITC) diminuiu para este clone seu perfil de resistência, sendo alcançado com este regime terapêutico um índice de cura de 37,5%.

Em conjunto, o que se observou mais uma vez em relação ao tratamento com a associação de fármacos, foi a correlação entre a resistência ao tratamento e a distância filogenética entre as amostras do parasito em questão (Tibayrenc & Brenière, 1988; Toledo *et al.*, 2003), correlação esta esperada para microorganismos de natureza clonal como é o caso do *T. cruzi* (Tibayrenc *et al.*, 2003).

Esta correlação deverá então ser futuramente estudada com associações de fármacos diversos e inclusive em infecções policlonais de *T. cruzi* por ser este um fato muito comum na natureza (Brenière *et al.*, 1995; Brenière *et al.*, 1998; Solari *et al.*, 2001; Di Noia *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003). Estudos experimentais já realizados por nossa equipe em camundongos com infecções mistas por estoques clonais de *T. cruzi* já comprovaram a existência desta correlação em animais tratados com o BNZ (Martins *et al.*, 2007).

Em relação à eficácia terapêutica, a combinação de fármacos com diferentes mecanismos de ação já vem sendo sugerida por alguns pesquisadores como forma de incrementar o tratamento para favorecer a obtenção de melhores resultados e reduzir a intensidade das reações adversas na infecção experimental pelo *T. cruzi*. (Urbina *et al.*, 1993; Maldonato *et al.*, 1993; Araújo *et al.*, 2000). Neste trabalho, a maior eficácia do tratamento empregando a associação BNZ + ITC foi observada pela redução na multiplicação do parasito mesmo em animais infectados com clones resistentes a ambos os fármacos (clones P209 Cl1-Tcl e BUG2149 Cl1-TcV) empregados separadamente e com elevada virulência (clones P209 Cl1-Tcl), como já demonstrado na quimioterapia experimental da infecção por estes clones do *T. cruzi* no modelo murino (Toledo *et al.*, 2003), também confirmadas neste trabalho. Estes resultados confirmam que a associação BNZ + ITC induz um efeito sinérgico independente da resistência do parasito ao tratamento em questão.

A redução significativa da parasitemia associada à alta freqüência de resultados negativos nos exames parasitológicos de HC e PCR, que são permanentemente positivos em camundongos infectados, observada nos experimentos com os clones do grupo Tcl e TcII tratados com BNZ + ITC indica que a associação terapêutica certamente resulta num efeito protetor durante o curso da infecção. Neste sentido, o clone pertencente ao grupo genético híbrido TcV apresentou um comportamento diferente dos demais, cujos resultados de HC e PCR detectou o retorno do parasito à circulação sanguínea mais rapidamente que os demais clones, confirmando a complexidade deste grupo para o estabelecimento de sua classificação filogenética e correlação de suas propriedades biológicas. A presença de parasitos desta natureza, tão comum em áreas endêmicas do Brasil Central (Coura & Castro, 2002; Cançado, 2002) e de outros países da América Latina (Suasnábar *et al.*, 2000; Viotti *et al.*, 1994; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Guedes *et al.*, 2006), pode estar associada aos baixos índices de cura da doença de Chagas ali encontrados, especialmente na fase crônica da infecção.

Independente deste fato, os resultados aqui apresentados mostram que ocorreu significativo aumento nos valores de índice de cura na quimioterapia com a associação BNZ + ITC. Esta notável atividade tripanocida poderia ser atribuída ao efeito sinérgico resultante da administração de fármacos com diferentes mecanismos de ação. No entanto, o benefício do tratamento empregando o ITC separadamente não foi além da diminuição da parasitemia

durante o tratamento, sendo este incapaz de promover cura da infecção pelo *T. cruzi* no modelo experimental e mesmo em humanos, cujo ensaio clínico revelou falha em impedir a progressão da doença (Urbina, 2002; Urbina & DoCampo, 2003; Urbina, 2010). Este dado também foi observado previamente por Toledo e cols. (2003) e mais uma vez confirmado neste trabalho, pelo menor índice de cura observado para o ITC e apenas nos animais infectados com o clone menos resistente (IVV Cl4 - TcII).

Portanto, isto sugere que o aumento da eficácia terapêutica observada na quimioterapia associada BNZ + ITC esteja relacionado com a combinação de potência farmacológica e atividade específica anti-*T. cruzi* do BNZ, acrescido de um efeito promovido pelo ITC que esteja além de seu mecanismo de ação, conforme discutido na terceira parte deste trabalho.

PARTE II – Desenvolvimento e Validação do Método Bioanalítico para Quantificação de BNZ e ITC

Com o objetivo de entender os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da eficácia terapêutica observada neste estudo foi desenvolvido e validado um método bioanalítico adequado à avaliação da interação farmacocinética da associação BNZ + ITC no modelo murino.

A Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE), com detecção ultravioleta foi o método de escolha por apresentar características adequadas à análise de amostras de origem biológica em relação à especificidade, precisão e exatidão. A CLAE tem se mostrado vantajosa em relação a outras metodologias por ser uma técnica rápida, de custo acessível na atualidade à maioria dos laboratórios, específica e que permite a determinação simultânea de diferentes fármacos e seus metabólitos (Bompadre, 1998). Técnicas mais sofisticadas como a CLAE acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) também tem sido utilizadas para quantificação de BNZ e ITC separadamente (Rhim *et al.*, 2009; Gerrero *et al.*, 2011). Embora permita alta especificidade para análise qualitativa e quantitativa de vários compostos, redução de tempo no preparo da amostra e na separação cromatográfica (Snyder *et al.*, 1997) esta técnica apresenta a desvantagem de não ser muito difundida na maioria dos laboratórios, devido ao alto custo para aquisição e manutenção do equipamento.

A literatura apresenta diversos métodos utilizando CLAE para a determinação de BNZ e ITC separadamente. Neste trabalho, desenvolveu-se pela primeira vez um método preciso e exato utilizando a CLAE para quantificação simultânea de BNZ e ITC em amostras de plasma de camundongo. O método mostrou-se adequado para sua aplicação em ensaios de farmacocinética devido à simplicidade e eficiência da purificação das amostras pela extração líquido-líquido (Queiroz *et al.*, 2001), utilização de padrão interno (PI) disponível comercialmente e alta sensibilidade.

Por serem de baixa polaridade, o BNZ e o ITC foram facilmente extraídos utilizando éter etílico como solvente orgânico no método de extração líquido-líquido para a purificação da amostra. Este método possibilitou boa recuperação dos analitos com baixa contaminação pelos constituintes do plasma, minimizando os resíduos que poderiam ficar retidos e diminuir a vida útil da coluna cromatográfica. O PI utilizado foi o diazepam, que mesmo não sendo

estruturalmente semelhante ao BNZ ou ITC, foi quantificado pelo método com adequada sensibilidade e seletividade. A comparação entre os cromatogramas obtidos de plasma branco, hemolisado e plasma adicionado dos padrões de referência de BNZ, ITC e PI não revelaram a presença de interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

A fase móvel foi otimizada envolvendo estudos relacionados à alteração da proporção dos solventes utilizados visando alcançar as condições ideais de separação dos analitos de interesse, favorecendo uma análise rápida para ser aplicada na rotina deste trabalho. Foram fixados os seguintes parâmetros: fase móvel constituída de acetonitrila/água (60:40 v/v), fluxo de 1mL/min, tempo de análise cromatográfica de 11 minutos e detecção a 324nm para BNZ e 263 nm para ITC. Nestas condições, o BNZ, ITC e PI demonstraram excelente resolução, eluindo em 1,85; 9,94 e 3,76 minutos respectivamente.

Para assegurar a confiabilidade do método utilizado neste trabalho, foi realizada sua validação seguindo recomendações da legislação vigente. Conforme descrito nos Guias de Validação de Métodos Bioanalíticos (United States, 2001; Brasil, 2003) para determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em diferentes matrizes biológicas (por exemplo, sangue total, soro, plasma, urina e tecido), os parâmetros fundamentais para validação incluem: especificidade, recuperação, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade.

Os valores dos limites de detecção foram de 0,36 e 0,68 µg/mL para o BNZ e ITC, respectivamente, assim como a faixa de linearidade do método, delimitada pelos limites de quantificação inferior (0,5 µg/mL para o BNZ e 1,00 µg/mL para o ITC) e superior (100, 0 µg/mL para o BNZ e 75,0 µg/mL para o ITC) foi adequada à quantificação dos fármacos em amostras de plasma de camundongos utilizados no monitoramento pré-clínico, uma vez que contemplou tanto os prováveis valores de concentração plasmática máxima quanto os valores terminais do decaimento farmacocinético. A análise da regressão linear das curvas de calibração apresentou altos índices de correlação ($r^2 = 0,9985$ para o BNZ e $0,9924$ para o ITC), cumprindo o requisito de no mínimo 0,98 (Brasil, 2003).

Os valores médios de recuperação do BNZ, ITC e PI foram de 92,46; 93,92 e 103,21%, respectivamente, evidenciando adequada recuperação dos fármacos e PI após o procedimento de purificação das amostras de plasma. Estes valores apresentaram-se superiores a 60% com

precisão e exatidão adequada a utilização do método nos ensaios de farmacocinética (Bressole *et al.*, 1996; United States, 2001).

Os resultados de precisão intra e inter ensaio, expressos como coeficiente de variação, mostraram-se adequados. Os valores médios obtidos para as análises realizadas no mesmo dia (3,24% para o BNZ e 5,41% para o ITC) e em dias diferentes (4,49% para o BNZ e 5,45% para o ITC) se mantiveram dentro dos limites considerados aceitáveis, cujo valor do coeficiente de variação deve ser igual ou menor que 15%. As amostras de plasma analisadas também apresentaram exatidão de acordo com o critério estabelecido (85 a 115%) para a avaliação desse parâmetro, sendo que os valores médios obtidos foram 95,75% para o BNZ e 92,99% para o ITC nas análises realizadas no mesmo dia e 97,58% para o BNZ e 93,75% para o ITC nas análises realizadas em dias diferentes.

Os resultados da estabilidade do BNZ e ITC em amostras de plasma mantidas a temperatura ambiente durante 4 horas não demonstraram alteração significativa em relação à concentração das amostras recém-preparadas.

A análise de amostras de plasma mantidas à temperatura de -20°C, estabilidade de longa duração, foi avaliada durante o intervalo de tempo entre a coleta das amostras de plasma no ensaio pré-clínico até o último dia de análise. Este período foi de 60 dias, durante o qual as amostras apresentaram desvios em relação à concentração nominal, menores que 15%, comprovando sua estabilidade. A análise das amostras submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento permitiram concluir que as mesmas permanecem estáveis por até três ciclos.

A estabilidade pós-processamento foi avaliada mantendo-se a amostra, após procedimentos de extração e suspensão em fase móvel, por 48 horas à temperatura ambiente e os resultados indicaram que não houve degradação significativa em relação à concentração das amostras recém-preparadas.

As soluções-padrão utilizadas para preparação diária da curva de calibração, armazenadas a -20°C, não apresentaram degradação significativa durante o período da validação do método e análise de amostras dos animais, com resultados de precisão e exatidão dentro dos limites especificados e valores de tendência (bias) de -4,55 e -5,28% para os padrões de BNZ e ITC, respectivamente, e de -3,72% para o PI (INMETRO, 2003).

PARTE III – Avaliação Farmacocinética de Camundongos Tratados com BNZ, ITC e BNZ + ITC

A partir do método desenvolvido e validado para a quantificação conjunta de BNZ e ITC, as respostas sobre as interações farmacocinéticas foram obtidas pelos cálculos da área sob a curva de concentração plasmática em função do tempo (ASC) após a administração da associação BNZ + ITC, comparada com a curva de cada fármaco administrado separadamente em camundongos sob o regime de dose oral única de 5 mg.

Os resultados demonstraram que a administração concomitante de BNZ + ITC resultou numa diminuição significativa da C_{max} (de 151,28 para 101,19 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) para o BNZ no plasma dos animais.

A farmacocinética do BNZ é caracterizada como sendo linear e de rápida absorção oral (Raaflaub *et al.*, 1979; Raether *et al.*, 2003). Os fatores que influenciam a absorção de fármacos podem estar relacionados às condições fisiológicas, características físico-químicas dos fármacos, concentração e excipientes da formulação (Aulton, 1996).

Normalmente, as formulações utilizadas para a administração oral de fármacos em animais de pequeno porte, como camundongos, são obtidas por pulverização e suspensão em veículo aquoso de uma forma farmacêutica sólida oral disponível comercialmente. No tratamento empregando a associação BNZ + ITC, a formulação preparada foi composta pela mistura de duas formas farmacêuticas distintas (comprimidos de benzonidazol e cápsulas de itraconazol), resultando numa suspensão de alta viscosidade composta por uma mistura complexa de seus excipientes. Sabe-se que variações na formulação e técnicas de fabricação podem gerar mudanças substanciais na absorção de fármacos (Balimane *et al.* 2000) e para fármacos pouco solúveis, como o BNZ, a etapa limitante da absorção é a sua dissolução *in vivo* (Kasim *et al.*, 2004).

Embora alguns excipientes possam prolongar o tempo de retenção de um fármaco no TGI e com isso elevar a quantidade total absorvida, quando em altas concentrações, estes podem interagir com o fármaco formando micelas ou grandes moléculas resultando em área superficial diminuída e, conseqüentemente, menor dissolução (Shargel & Yu, 1999). Dentro de uma mesma classe de excipientes ainda podem surgir efeitos diferenciados dependendo das características físico-químicas da substância, por exemplo, mudanças nas características da

superfície que prolongam o tempo de solubilidade devido à diminuição da interface entre o ativo e o solvente. Este tipo de interação pode levar a diminuição da velocidade de absorção sem que haja diminuição da quantidade absorvida (Abdou, 1995).

Uma vez que os parâmetro farmacocinéticos C_{max} e ASC estão relacionados à quantidade de fármaco absorvido, possivelmente, a diminuição da C_{max} observada para o BNZ (33,11 %), quando administrado em associação com o ITC, pode ser devido às altas concentrações dos excipientes presentes na suspensão. De acordo com essa hipótese, foi observado que os valores de ASC do BNZ não apresentaram alterações significativas quando administrado separadamente ou em associação com o ITC.

A farmacocinética do ITC é influenciada por sua baixa solubilidade em água, cerca de 100.000 vezes menor que o BNZ em pH neutro, o que resulta na limitação tanto da velocidade quanto da extensão de sua absorção (Peeters *et al.*, 2002; Raether *et al.*, 2003; Lamas *et al.*, 2006). Os baixos valores de ASC revelados para o ITC neste estudo possivelmente são decorrentes deste fato.

Em relação à biotransformação, o BNZ é extensivamente metabolizado originando compostos envolvidos no efeito tripanocida. Esta ativação do BNZ a metabólitos ativos requer redução enzimática de seu grupo nitro à 2-amino-imidazol e 2-hidroxi-imidazol. Esses processos são fundamentalmente mediados pelo sistema enzimático citocromo P450 (Workman *et al.*, 1984; Raether *et al.*, 2003). O ITC é também majoritariamente metabolizado no fígado pelo sistema enzimático citocromo P450 e a maioria das interações farmacológicas observadas para os antifúngicos azólicos são causadas pela inibição do metabolismo de outros fármacos (Dvorak, 2011). Vários estudos têm demonstrado que o ITC é considerado um inibidor efetivo do metabolismo de muitos fármacos em humanos (digoxina, diazepam, warfarina) (Janssen-Ortho Inc[®]), camundongos (triazolam, midazolam, ciprofloxacina) (Olkola *et al.*, 1994; Varhe *et al.*, 1994; Abou-Audaa *et al.*, 2008) e outros modelos.

Neste estudo, o regime de tratamento associado BNZ + ITC resultou em variações no perfil de eliminação plasmática do BNZ, revelado pelo aumento significativo de sua meia vida de eliminação (de 1,63 para 12,18 horas) equivalente a 86,62%.

Uma vez que o BNZ é substrato do mesmo sistema enzimático citocromo P450, este resultado sugere que o seu metabolismo também pode ser inibido pelo ITC em camundongos.

Considerando que ocorre competição pelos sistemas enzimáticos e que a eliminação de ambos os fármacos é essencialmente dependente desse metabolismo, o aumento observado na meia-vida de eliminação do BNZ pode ser devido ao efeito da co-administração com ITC, resultando num perfil de acumulação do BNZ no sistema biológico.

O método bioanalítico desenvolvido neste trabalho foi capaz de detectar e quantificar uma concentração residual de BNZ até o período de 36 horas, quando este foi administrado em associação com o ITC. Considerando que o tratamento experimental empregado na quimioterapia da doença de Chagas aguda tem duração de 20 dias, a acumulação de BNZ no plasma do camundongo, se utilizado em associação com o ITC, tende a ser cada vez maior a cada nova administração. Conseqüentemente, ao atingir o estado de equilíbrio entre absorção e eliminação, uma alta quantidade acumulada de BNZ poderá ser refletida na ASC, o parâmetro farmacocinético que mais decisivamente influencia na eficácia de fármacos antiparasitários (Edwards *et al.*, 2004). No entanto, não é possível realizar estudos de farmacocinética em estado de equilíbrio utilizando animais de pequeno porte como modelo experimental devido ao pequeno volume de sangue total e ao curto período de tempo entre as coletas de amostras sanguíneas necessárias. A utilização de um modelo experimental maior, que possibilite avaliações das concentrações plasmáticas no mesmo animal durante o todo o experimento, como o cão, comprovadamente um bom modelo para o estudo de quimioterapia da doença de Chagas (Lana *et al.*, 1992; Guedes *et al.*, 2002) poderia oferecer melhores resultados. Além disso, a resposta do hospedeiro e as diferenças farmacocinéticas apresentadas por diferentes modelos experimentais, principalmente relacionadas ao metabolismo, devem ser consideradas antes de tentar extrapolar os resultados para humanos.

Em relação à toxicidade, o metabolismo redutivo do BNZ é também responsável pelo controle dos efeitos adversos observados (Castro *et al.*, 2006). Certamente, é necessário um monitoramento rigoroso quando um fármaco é administrado concomitantemente com outro que inibe as enzimas do citocromo P450 para se entender a real influência da farmacocinética no aparecimento de reações adversas. No entanto, a redução da dose muitas vezes não é absolutamente necessária para evitar tais reações.

Estudos mostram que devido ao baixo metabolismo, crianças nos primeiros anos de vida apresentam uma deficiência natural na atividade do sistema enzimático microsomal. Por este

motivo, elas podem ser submetidas a um período maior de tratamento e receber doses maiores de BNZ do que as comumente empregadas no tratamento da doença de Chagas em adultos, sem apresentação de grandes efeitos adversos (Cançado, 2002). Similarmente, a taxa de metabolismo do BNZ depende da idade e é menos intensa em animais jovens, resultando em níveis mais altos e persistentes no sangue de ratos jovens quando comparados a estes mesmos animais na idade adulta (Bulffer *et al.*, 2011). Isto indica que, no caso do BNZ, um aumento na sua biodisponibilidade, desde que esteja relacionado à diminuição de seu metabolismo, pode contribuir tanto para a maior eficácia do tratamento, quanto para a diminuição das reações adversas, por que isto significa menor produção, pelo hospedeiro, de metabólitos reativos tóxicos e maior chance desta ativação ocorrer no parasito circulante por si mesmo.

O monitoramento pré-clínico da associação BNZ + ITC em regime de dose única sugere que a inibição de isoformas do citocromo P450 pela co-administração do ITC resulta em um maior controle da eliminação do BNZ, favorecendo seu efeito antiparasitário devido à produção de metabólitos reativos pelo parasito, que se ligam covalentemente ao seu DNA nuclear e mitocondrial, além de proteínas e lipídios estruturais, causando conseqüentemente sua morte (Diaz *et al.*, 1998).

Diante dos resultados apresentados neste estudo, um regime terapêutico empregando doses diferentes das convencionalmente utilizadas, acompanhado de uma possível redução no tempo de tratamento, em um modelo experimental no qual não seja necessário alterar a formulação original dos fármacos, não poderia ser descartado como proposta para se alcançar o maior sucesso desta quimioterapia.

Conclusões

8. CONCLUSÕES

- A quimioterapia associada BNZ + ITC foi mais eficaz no tratamento da doença de Chagas experimental no modelo murino, apresentando melhor resposta em relação ao BNZ e ITC empregados em esquemas terapêuticos isolados.
- A quimioterapia associada BNZ + ITC empregada no tratamento de camundongos infectados com os clones P209 Cl1, BUG2149 Cl10 e IVV Cl4, representativos das DTUs TcI, TcV e TcII, respectivamente, resultou em maiores índices de cura com perfis de resistência significativamente menores em relação ao tratamento empregando BNZ e ITC separadamente, passando os clones resistentes e parcialmente resistentes aos fármacos isolados a apresentarem o perfil de parcialmente resistente e sensível, respectivamente, frente ao tratamento associado.
- As alterações observadas nos perfis de resistência dos clones avaliados neste estudo como resultado da quimioterapia associada BNZ + ITC seguiram a mesma tendência do observado em relação ao tratamento isolado e apresentaram correlação com a distância filogenética entre as amostras do parasito estudadas, sendo estes resultados esperados para parasitos de natureza clonal como o *T. cruzi*.
- O método desenvolvido para a quantificação simultânea de BNZ e ITC em plasma de camundongo foi validado e mostrou-se específico, linear, preciso, exato, sensível dentro dos limites de quantificação, possibilitando boa recuperação dos analitos de interesse.
- As principais interações farmacocinéticas observadas no tratamento de camundongos com a quimioterapia associada BNZ + ITC foram diminuição significativa da C_{max} e aumento significativo do $t_{1/2\beta}$ para o BNZ.
- A diminuição da absorção do BNZ, representada pela diminuição da C_{max} , observada em camundongos submetidos à quimioterapia associada (BNZ + ITC), provavelmente é

devido ao efeito do excesso de excipientes da formulação preparada para a administração oral, resultando na diminuição da dissolução do BNZ.

- O aumento significativo do $t_{1/2\beta}$ do BNZ observado no tratamento de camundongos submetidos à quimioterapia associada (BNZ + ITC), provavelmente é devido a um efeito de inibição do seu metabolismo provocado pelo ITC.
- O aumento da eficácia da quimioterapia associada (BNZ + ITC) não se limita aos distintos mecanismos de ação dos fármacos, mas ocorre devido à interação farmacocinética entre eles, na qual o ITC potencializa o efeito do BNZ por prolongar o seu tempo de meia vida de eliminação resultando em um perfil de acumulação de BNZ no sistema biológico.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H.M. Dissolution. In: MISCHER, A. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 19th ed. Easton: Mack Publishing Company. v1. cap.34, p.593-604, 1995.

ABOU-AUDAA, H.S.; MUSTAFAB, A.A.; AL-HUMAYYDB, M.S. Pharmacokinetic Interaction of Ketoconazole and Itraconazole with Ciprofloxacin. *Biopharm. Drug Dispos.* 29: 29-35, 2008.

ANDRADE S.G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev. Pat. Trop.* 1, 65-121, 1974.

ANDRADE V.; BRODSKYN C.; ANDRADE S.G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 796-799, 1983.

ANDRADE S.G.; MAGALHAES J.B.; PONTES A.L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull. World Health Organ.* 63: 721-726, 1985.

ANDRADE, S.G.; MAGALHAES, J.B.,; PONTES, A.L. Therapy of the chronic phase of the experimental infection by *Trypanosoma cruzi* with benzonidazole and nifurtimox. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 22: 113-118, 1989.

ANDRADE, S.G.; STOCKER-GUERRET, S.; PIMENTEL, A.S.; GRIMAUD, J.A. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86: 187-200, 1991.

ANDRADE S.G. & MAGALHAES J.B. Biodemes and zimodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30: 27-35, 1997.

ANONYMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 429-432, 1999.

APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I.; SANCHEZ, G.; VARGAS, S. L.; RODRIGUEZ, J. Regression and prevention of electrocardiographic abnormalities in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol: a nine years follow-up study. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 23–29, 2003.

APT, W.; ARRIBAD, A.; ZULANTAY, I.; SOLARI, A.; SÁNCHEZ, G.; MUNDACA, K.; CORONDO, X.; RODRÍGUEZ, J.; GIL, L.C.; OSUMA, A. Itraconazole or allopurinol in trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post treatment. *Ann Trop. Méd. Parasitol.* 99: 733-41, 2005.

ARAÚJO M.S.; MARTINS-FILHO O.A.; PEREIRA M.E.; BRENER Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 819-824, 2000.

ARCHIBALD GP & AXEL G. Making Sense of Itraconazole Pharmacokinetics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Suppl. S1, il7-i22, 2005.

AULETTA, C.S. Acute subchronic and chronic toxicology, p. 51-103. In. Derelanko, M.J. and Hollinger, M.A. (ed.), *Handbook of Toxicology*, 1th ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.

ÁVILA, H. A.; SIDMAN, D. S.; COHEN, L. M.; MILLIKAN, R. C.; SIMPSON, L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48: 211-222, 1991.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol.Methods.* 44: 301-312, 2000.

BASS JR, J.B. ; FARER, L.S.; HOPEWELL, P.C.; O'BRIEN, R.; JACOBS, R.F.; RUBEN, F.; THORNTON, G. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med.* 149:1359-74, 1994.

BERNARDES, L.S.C.; KATO, M.J.; ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO, I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. *Bioorg Med Chem* 14: 7075-7082, 2006.

BERROZPE, J.D. & VILADROSA, J.L. Farmacocinética no compartimental. In DOMÉNECH BERROZPE, J.; MARTÍNEZ LANAÓ, J.; PLÁ DELFINA, J.M., eds. – *Biofarmacia y Farmacocinética*. Madrid: Editorial Síntesis. Vol 1, cap. 18: p.391-420, 1997.

BEULE, K.D. Itraconazole: pharmacology, clinical experience and future development. *Int. J. Antimicrob. Agents* 6: 175-181, 1996.

BLANCO, S. B; SEGURA, E. L; CURA, E. N; CHUIT, R; TULIAN, L; FLORES, I; GARBARINO, G; VILLALONGA, J. F; and GURTLER, E. Congenital transmission of *T. cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Tropical and Medicine International Health.* 5: 293-301, 2000.

BOCK M.; GONERT R.; HABERKORN A. Studies with Bay 2502 on animals. *Bol Chil Parasitol* 24: 13-19, 1969.

BOMPADRE, S.; FERRANTE, L.; LEONE, L. On-line solid phase extraction of cephalosporins. *Journal of Chromatography, A.* 812:191-196, 1998.

BOROUJERDI, M. Noncompartmental approach in pharmacokinetics based on statistical moments. In: *Pharmacokinetics: Principles and applications*. New York: Mc Graw-Hill, 2002. cap. 17, p. 331-341.

BRASIL. *Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003*. “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>. Acesso em: Maio de 2011.

BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 4: 389-396, 1962.

BRENER Z. & CHIARI E. Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 19: 220-224, 1963.

BRENER Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 63: 215-220, 1969.

BRENIÈRE S.F.; BOSSENO, M.F.; TELLERIA, J.; CARRASCO, R.; VARGAS, F.; YAKSIC, N.; NOIREAU, F. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 179-184, 1995.

BRENIÈRE, S.F.; BOSSENO, M.F.; TELLERIA, J.; BASTRENTA, B.; YAKSIC, N.; NOIREAU, F.; ALCAZAR, J.L.; BARNABÉ, C.; WINCKER, P.; TIBAYRENC, M. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *Exp. Parasitol.* 89: 285-295, 1998.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* 686: 3-10, 1996.

BRISSE, S.; BARNABE, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* 30: 35-44, 2000.

BRISSE, S.; HENRIKSSON, J.; BARNABÉ, C.; DOUZERY, E.J.; BERKVENS, D.; SERRANO, M.; DE CARVALHO, M.R.; BUCK, G.A.; DUJARDIN, J.C.; TIBAYRENC, M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Genet. Evol.* 2: 173-183, 2003.

BULFFER, R.F.; CASTRO, J.A.; FANELLI, S.L. Benznidazole levels in blood vary with age in rats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106: 374-377, 2011.

CANÇADO, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev. Inst. Med. Trop.* 44: 29-37, 2002.

CÁRCAMO, E.C. Introduction a la farmacocinetica. Washington, D.C., 1982.

CARRIER, A. & PARENT, J. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of itraconazole and its major metabolite, hydroxyitraconazole, in dog plasma. *J. Chromatogr.B* 745: 413-420, 2000.

CARNEIRO, M.; CHIARI, E.; GONCALVES, A.M.; SILVA PEREIRA, A.A., MOREL, C.M.; ROMANHA A.J. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop* 47: 35-45, 1990.

CASTRO, J.A.; DE MECCA, M.M.; BARTEL, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American tripanosomiasis). *Hum Exp Toxicol* 25: 471-479, 2006.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J. Chromatogr., B* 689: 175-180, 1997.

CHAGAS, C.J. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 159-218, 1909.

COMPAS, D.; TOUW, D.J.; DE GOEDE, P. Rapid method for the analysis of itraconazole and hydroxyitraconazole in serum by high performance liquid chromatography. *J. Chromatog B* 687: 453-456, 1996.

COURA, J.R.; ANUNZIATO, N.; WILLCOX, H.P. Chagas' disease morbidity. I - Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 78: 363-372, 1983.

COURA, J.R.; ABREU, L.L.; WILLCOX, H.P.F.; PETANA, W. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 139-144, 1997.

COURA, J.R. & CASTRO S.L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24, 2002.

COURA, J.R. Present Situation and New Strategies for Chagas Disease Chemotherapy – A Proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 549-554, 2009.

CROFT, S.L. Pharmacological Approaches to Antitrypanosomal Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 215-220, 1999.

CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE, M.I.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PATARROYO, M.E.; PILLEGGI, F.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 3541-3545, 1995.

DI NOIA, J.M.; BUSCAGLIA, C.A.; DE MARCHI, C.R.; ALMEIDA, I.C.; FRASCH, A.C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J. Exp. Med.* 195: 401-413, 2002.

DIAS, J.C.P. Epidemiology of Chagas' disease. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI, A. *Chagas disease (american trypanosomiasis) : Its Impact on Tranfusion And Clinical Medicine*. São Paulo: Ed. ISBT BRAZIL – Sociedade Brasileira Hematologia Hemoterapia. 5: 49-80, 1992.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA A.C.; SCHOFIELD C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 603-612, 2002.

DIAS, J.C.P. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 39: 370-375, 2006.

DIAZ DE TORANZO, E.G.; CASTRO, J.A.; FRANKE DE CAZZULO, B.M.; CAZZULO, J.J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experi.* 44:880-1, 1988.

DVORAK, Z. Drug–drug interactions by azole antifungals: Beyond a dogma of CYP3A4 enzyme activity inhibition. *Toxic.Let.* 202: 129–132, 2011.

EDWARDS, G. & KRISHNA, S. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Issues in the Treatment of Parasitic Infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23: 233–242, 2004.

FARIAS, S.R.Q.; LAVRA, Z.M.; MEDEIROS, F.P.M.; ROLIM NETO, P.J. Uma nova proposta terapêutica para o tratamento da AIDS: da monoterapia à dose fixa combinada. *Revista Brasileira de Farmácia*, 87: 92-97, 2006.

FILARDI L.S. & BRENER Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg.* 81: 755-759, 1987.

FREITAS, J.M.; UGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONCALVES, V.F.; TEIXEIRA, S.M.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.;

PENA, S.D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS. Pathog.* 2: 24, 2006.

FUHR, U. Induction of drug metabolizing *enzymes*: pharmacokinetic and toxicology consequences in humans. *Clin Pharmacokinet*; 38: 493-504, 2000.

FURTADO, F. Dobradinha contra Chagas. *Ciência Hoje* 39: 44-45, 2006.

GARCIA, S.; RAMOS, C.O.; SENRA, J.F.; VILAS-BOAS, F.; RODRIGUES, M.M.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M.B. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1521-1528, 2005.

GAUNT, M. & MILES, M. The Ecotopes and Evolution of Triatomine Bugs (Triatominae) and their Associated Trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 557-565, 2000.

GUERRERO, L.; PINAZO, M.J.; POSADA, E.; GASCÓN, J.; RIBAS, J.; SOY, D. A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. *Clinic. Chemis. Labor. Med.* 49: 77-82, 2010.

GHAZAL, H.S.; DYASB, A.M.; FORDA, J.L.; HUTCHEONA, G.A. *In vitro* evaluation of the dissolution behaviour of itraconazole in bio-relevant media. *Inter. Jour. Pharm.* 366: 117-123, 2009.

GONÇALVES, J. C. S. On-line solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (SPE-HPLC-MS-MS) for quantification of bromazepam in human plasma. *Therap. Drug Monitor.* 27: 601-607, 2005.

GUBBINS, P.O.; GURLEY, B.J.; BOWMAN, J. Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of itraconazole and its hydroxy-metabolite in human serum. *Journ. Pharma. Biomed. Anal.* 16: 1005-1012, 1998.

GUEDES, P.M.M.; VELOSO, V.M.V.; TAFURI, W.L.; GALVÃO, L.M.C.; CARNEIRO, C.M.; LANA, M.; CHIARI, E.; SOARES, K.A.; BAHIA, M.T. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Trop.* 84: 9-17, 2002.

GUEDES, P.M.; FIETTO, J.L.R.; LANA, M.; BAHIA, M.T. Advances in Chagas Disease Chemotherapy. *Anti-infective Agents in Med. Chem.* 5:175-186, 2006.

HARDIN, T.C.; GRAYBILL, J.R.; FETCHICK, R.; WOESTENBORGHS, R.; RINALDI, M.G.; KUHN, J.G. Pharmacokinetics of Itraconazole following Oral Administration to Normal Volunteers. *Antimic. Agents Chemot.* 1310-1313, 1988.

HARDMAN J.G., LIMBIRD L.E. *Goodman & Gilman*. As bases farmacológicas da terapêutica. 10.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill. p.955-61, 2003.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008 de Março de 2003, 35p.)

JANSSEN-ORTHO INC. SPORANOX (itraconazole capsules) Product Monograph. Copyright by Janssen Pharmaceutica Inc. 2008.

KAPSI, S.G. & AYRES, J.W. Processing factors in development of solid solution formulation of itraconazole for enhancement of drug dissolution and bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics* 229: 193–203, 2001.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNAˆS, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGIGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Mol. Pharm.* 1: 85–96, 2004.

KOKS, C.H.W.; MEENHORST, P.L.; BULT, A.; BEIJNEN, J.H. Itraconazole Solution: Summary of Pharmacokinetic Features and Review of Activity in the Treatment of Fluconazole-Resistant Oral Candidosis in HIV-Infected Persons. *Pharmacological Research*. 46: 14-23, 2002.

LAMAS, M. C.; VILLAGGI, L.; NOCITO, I.; BASSANI, G.; LEONARDI, D.; PASCUTTI, F.; SERRA, E.; SALOMO'N, C. J. Development of Parenteral Formulations and Evaluation of the Biological Activity of the Trypanocide Drug Benznidazole. *Int. J. Pharm.* 307: 239-243, 2006.

LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W.L. Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 87: 59-71, 1992.

LANA M. & TAFURI W.L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: Melo, A.L.; Genaro, O., Liardi, P.M. (eds). Editora Atheneu 73-96, 2000.

LANA, M.; DA SILVEIRA, P.A.; BARNABE, C.; QUESNEY, V.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp.Parasitol.* 90: 20-25, 1998.

LANÇAS, F. Extração em fase sólida (SPE). São Paulo: Editora Rima. 93p, 2004.

LAURENT, J.P.; BARNABE, C.; QUESNEY, V.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M. Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.* 114: 213-218, 1997.

LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M.S.; VEXENAT, A.C.; NITZ, N.; SIMÕES-BARBOSA, A.; TINOCO, D.L.; TEIXEIRA, A.R. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg.* 63: 111-8, 2000.

LEBLANK, P.P., AIACHE, J.M., BESNER, J.G., BURI, P., LESNE, M. *Traité de Biopharmacie et pharmacocinétique*, 3ed, Presses de L'université de Montreal, pp 11, 1997.

LOHITNAVY, M.; LOHITNAVY, O.; THANGKEATTIYANON, O.; SRICHA, W. Reduced oral itraconazole bioavailability by antacid. Suspension. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 30: 201–206, 2005.

MACHADO C.A. & AYALA F.J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 7396-7401, 2001.

MBUAGBAW, L.C.; IRLAM, J.H.; SPAULDING, A.; RUTHERFORD, G.W.; SIEGFRIED, N. Efavirenz or nevirapine in three-drug combination therapy with two nucleoside-reverse transcriptase inhibitors for initial treatment of HIV infection in antiretroviral-naïve individuals. *Cochrane Database Syst Rev*. 8: CD004246, 2010.

MAJORI, G. Combined antimalarial therapy using artemisinin. *Parassitol.* 46: 85-7, 2004.

MALDONATO, R.A.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; URBINA, J.A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1353-1359, 1993.

MARTINDALE. The Complete Drug Reference, 34^o ed. UK: Royal Pharmaceutical Society, London, 2005.

MARTINS, H.R.; MOREIRA SILVA, R.; VALADARES, H.M.; TOLEDO, M.J.O.; VELOSO, V.M.; VITELLI-AVELAR, D.M.; CARNEIRO, C.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; BAHIA, M.T.; MARTINS-FILHO, O.A.; MACEDO, A.M.; AND LANA, M. Impact of dual infections on chemotherapeutic efficacy in BALB/c mice infected with major genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3282-3289, 2007.

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

MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VASQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 146: 601-620, 2007.

MEIBOHM, B. & DERENDORF, H. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic studies in drug product development. *J Pharm Sci.* 91: 18-31, 2002.

MILLER, D.A.; DINUNZIO, J.C.; YANG, W.; MCGINITY, J.W.; WILLIAMS, R.O. Targeted Intestinal Delivery of Supersaturated Itraconazole for Improved Oral Absorption. *Pharmac. Resear.* 25: 34-40, 2008.

MILES, M.A.; TOYE, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg.* 71: 217-225, 1977.

MILES, M.A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J.J.; LAINSON, R.; TOYE, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272: 819-821, 1978.

MILES, M.A.; POVOA, M.M.; DE SOUZA, A.A.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; KETTERIDGE, D.S. Chagas disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, north Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75: 667-674, 1981.

MOREL C.; CHIARI E.; CAMARGO E.P.; MATTEI D.M.; ROMANHA A.J.; SIMPSON L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 6810-6814, 1980.

MORILLA, M.J.; BENAVIDEZ, P.E.; LOPEZ, P.E.; ROMERO, E.L. Liposomal benznidazole: a high-performance liquid chromatographic determination for biodistribution studies. *J Chromatogr*

Sci. 41: 405-9, 2003.

MULLETT, W.M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70: 263–273, 2007.

OGA, S.; BASILE, A.C.; CARVALHO, M.F. *Medicamentos e suas interações*. São Paulo: Atheneu. 199p, 2002.

OLIVEIRA, R.P.; BROUDE, N.E.; MACEDO, A.M.; CANTOR, C.R.; SMITH, C.L.; PENA, S.D. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 95: 3776-3780, 1998.

OLKKOLA, K.T.; BACKMAN, J.T.; NEUVONEN, P.J. Midazolam should be avoided in patients receiving the systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole. *Clin Pharmacol Ther* 55: 481-485, 1994.

PAULA, F.R.; JORGE, S.D.; ALMEIDA, L.V.; PASQUALOTO, K.F.M.; TAVARES, L.C. Molecular modeling studies and in vitro bioactivity evaluation of a set of novel 5-nitro-heterocyclic derivatives as anti-T. cruzi agents. *Bioorg. Med.l Chem.* 17: 2673-2679, 2009.

PARK, M.J.; REN, S.; LEE, B. *In Vitro* and *In Vivo* Comparative Study of Itraconazole Bioavailability When Formulated in Highly Soluble Self-Emulsifying System and in Solid Dispersion. *Biopharm. Drug Dispos.* 28: 199-207, 2007.

PEETERS, J.; NEESKENS, P.; TOLLENAERE, J.P.; VAN REMOORTERE, P.; BREWSTER, M. Characterization of the interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with itraconazole at pH 2, 4 and 7. *J. Pharm. Sci.* 91: 1414-1422, 2002.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect.Dis.* 1: 92-100, 2001.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIN, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nov.* 24: 68-76, 2001.

RAAFLAUB, J. & ZIEGLER W.H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung* 29: 1611-4, 1979.

RAETHER, W. & HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol. Res.* 90: S19-S39, 2003.

REVOLLO, S.; OURY, B.; LAURENT, J.P.; BARNABE, C.; QUESNEY, V.; CARRIERE, V.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp.Parasitol.* 89: 30-39, 1998.

RIFAI, N.; SAKAMOTO, M.; PLATT, O.; BRUGNARA, C. A high-performance liquid chromatographic assay for the determination of itraconazole concentration using solid-phase extraction and small sample volume. *Ther Drug Monit.* 17: 522-5, 1995.

RHIM, S.Y.; PARK, J.H.; PARK, Y.S.; KIM, D.S.; LEE, M.H.; SHAW, L.M.; KANG, J.S. A sensitive validated LC-MS/MS method for quantification of itraconazole in human plasma for pharmacokinetic and bioequivalence study in 24 Korean volunteers. *Pharmazie.* 64:71-5, 2009.

ROCHE PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS S.A. ROCHAGAN® (BENZONIDAZOL). Disponível em: <http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/C E4CC5B1-7DDE-482F-B3E2-EAB960677B08/17453/Bula.pdf>. Acesso em Junho de 2011.

ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.E.; SOLARI, A. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 77: 647-653, 2007.

ROMAÑA, C. Acerca de un sintoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *Mepra* 22:16-28, 1935.

SANTOS, F.R.; PENA, S.D.J.; EPPLIN, J.T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.* 90: 655-656, 1993.

SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 22: 583-588, 2006.

SCHMUNIS, G.A., Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the rule of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 1-11, 2007.

SEGURA, M.A.; MOLINA DE R.E.; BASOMBRIO, M.A. Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanomicidal treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89: 213-216. 1994.

SILVA, A.L.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; NETO P.J.R.; SILVA R.M.F.; MEDEIROS F.P.M.; LIMA, L.G. Desenvolvimento de Método Analítico Por CLAE em Comprimidos de Benznidazol para a Doença de Chagas *Quim. Nov.*,30: 1163-1166, 2007.

SHARGEL , L. & YU, A. B. C. Biopharmaceutic consideration in drug product design. In: __. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 4th ed. Stamford: Appleton & Lange, 1999b. cap.5, p.99-128.

SHIN, J.H.; CHOI, K.Y.; KIM, Y.C.; LEE, M.G. Dose-Dependent Pharmacokinetics of Itraconazole after Intravenous or Oral Administration to Rats: Intestinal First-Pass Effect. *Antim. Agents Chemoth.* 48: 1756-1762, 2004.

SNYDER, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch J.L. *Practical HPLC method development*. 2.ed. New York: Wiley Interscience, 1997. p.685-713

SOLARI, A.; CAMPILLAY, R.; ORTIZ, S.; WALLACE, A. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp. Parasitol.* 97: 226-233, 2001.

SOUTO, R.P. & ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62: 45-52, 1993.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83: 141-152, 1996.

SOUZA, J. Avaliação das características físico-químicas, farmacocinéticas e da biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo associação de lamivudina 150 mg e zidovudina 300 mg. São Paulo. 93p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2005.

SRIVATSAN, V.; DASGUPTA, A.; KALE, P.; DATLA, R.R.; SONI, D.; PATEL, M.; PATEL, R.; MAVADHIYA, C. Simultaneous determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in human plasma by highperformance liquid chromatography. *J. Chromat. A* 1031: 307–313, 2004.

STEINDEL, M.; DIAS, N.E.; DE MENEZES, C.L.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, A.J. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60: 71-79, 1993.

STURM, N.R.; VARGAS, N.S.; WESTENBERGER, S.J.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 33: 269-279, 2003.

SUASNÁBAR, F.; ARIAS, E.D.; PIACENZA, S.M.; INGARAMO, M.; DEL BARCO, M.; AMICONE, N.

Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Rev Inst Med Trop* 42: 99-109, 2000.

SZTAJZEL, J; COX, J; PACHE, JC; BADAQUI, E; LERCH, R; RUTISHAUSER, W. Chagas' disease may also be encountered in Europe. *Eur. Heart J* 17: 1289, 1996.

TAFURI, W.L. Patogenia da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop.* 29: 194-199, 1987.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F.J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 83: 115-119, 1986.

TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* 277-292, 1988.

TIBAYRENC, M. & BRENIERE, S.F. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 83: 249-255, 1988.

TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABE, C.; GUERRINI, F.; SKARECKY, D.; AYALA, F.J. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 90: 1335-1339, 1993.

TIBAYRENC M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* 36: 47-115, 1995.

TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid.Biol.Dis.* 2: 12, 2003.

TOLEDO, M.J.; LANA, M.; CARNEIRO, C.M.; BAHIA, M.T.; MACHADO-COELHO, G.L.; VELOSO,

V.M.; BARNABE, C.; TIBAYRENC, M.; TAFURI, W.L. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp.Parasitol.* 100: 161-172, 2002.

TOLEDO, M.J.; BAHIA, M.T.; CARNEIRO, C.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; TIBAYRENC, M.; BARNABE, C.; TAFURI, W.L.; LANA, M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob.Agents Chemother.* 47: 223-230, 2003.

TOLEDO, M.J.O.; TAFURI, W.L.; BAHIA, M.T.; TIBAYREC, M.; LANA, M. Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Antimicrob.Agents Chemother.* 11-22, 2004.

TORRES, J.P.; ORTIZ, S.; SOLARI, A. *Trypanosoma cruzi* isolate from Chile are heterogeneous & composed of mixed populations when characterization by Schizodeme & Southern analyses. *Parasitol.* 128: 161-168, 2003.

TOZER, T. M.; ROWLAND, M. Introdução a farmacocinética e farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica. Porto Alegre: Artmed, 2009. 336 p.

UNITED STATES NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE - Chemical Identification/Dictionary, Benznidazole [INN] RN: 22994-85-0. Disponível em: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/ChemFull.jsp?calledFrom=lite>. Acesso em Novembro de 2009.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, 2001.

UNO, T.; SHIMIZU, M.; SUGAWARA, K.; TATEISHI, T. Sensitive Determination of Itraconazole and Its Active Metabolite in Human Plasma by Column-switching High-performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection. *Ther Drug Monit.* 28: 526-531, 2006.

URBINA, J.A.; LAZARDI, K.; MARCHAN, E.; VISBAL, G.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R.;

MALDONADO, R.A.; PAYARES, G.; DE, S.W. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 580-591, 1993.

URBINA, J.A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr Opin Infect Dis* 14: 733–741, 2001.

URBINA, J.A. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des* 8: 287–295, 2002.

URBINA, J.A. & DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19: 495-501, 2003.

URBINA, J. Specific Chemotherapy of Chagas disease: Relevance, Current Limitations and New Approaches. *Acta Trópica* 115: 55-68, 2010.

VAGO A.R.; MACEDO A.M.; OLIVEIRA R.P.; ANDRADE L.O.; CHIARI E.; GALVAO L.M.; REIS D.; PEREIRA M.E.; SIMPSON A.J.; TOSTES S.; PENA S.D. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.* 149: 2153-2159, 1996.

VAN PEER, A.; WOESTEBORGH, R.; HEYKANTS, J.; GASPARINI, R.; GAUWENBERGH, G. The effects of food and dose on the oral systemic availability of itraconazole in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 36(4): 423-6, 1989.

VARHE, A.; OLKKOLA, K.T.; NEUVONEN, P.J. Oral triazolam is potentially hazardous to patients receiving systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole. *Clin Pharmacol Ther*, 56: 601–607, 1994.

VERRECK, G.; SIX, K.; DEN MOOTER, G.V.; BAERT, L.; PEETERS, J.; BREWSTER, M.E. Characterization of solid dispersions of itraconazole and hydroxypropylmethylcellulose prepared by melt extrusion – part I. *Inter. J. Pharm.* 251: 165-174, 2003.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am. Heart J.* 127: 151-162, 1994.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. World Health Organ.* 53: 55-65, 1976.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 2007. *Report of scientific group in Chagas disease.* Buenos Aires, Argentina, April 17-20, 2005. Update July 2007.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Control of Chagas disease. Report of a Expert Committee. *WHO Technical Report Series.* 811: 95, 1991.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases, 2010.

WONG, J.W.; NISAR, U.R.; YUEN, K.H. Liquid chromatographic method for the determination of plasma itraconazole and its hydroxy metabolite in pharmacokinetic/bioavailability studies. *J.Chromat. B.* 798: 355-360, 2003.

WOO, J.S.; SONG, Y.K.; HONG, J.Y.; LIM, S.J.; KIM, C.K. Reduced food-effect and enhanced bioavailability of a self-microemulsifying formulation of itraconazole in healthy volunteers. *Europ.J.Pharma.Scis.* 33: 159-165, 2008.

WORKMAN, P.; WHITE, R.A.S.; WALTON, M.I.; OWEN, L.N.; TWENTYMAN P.R. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *Br. J. Cancer,* 50: 291-303, 1984.

YAMAOKA, K.; NAKAGAWA, T.; UNO, T. Statistical moments in pharmacokinetics. *J.*

Pharmacokinet. Biopharm. 6: 547-558, 1978.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. A New Concensus for Trypanosoma cruzi Intraespecific nomenclature: Second Revision Meeting Recomends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104: 1051-1054, 2009.

ANEXOS

10. ANEXOS