



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
ELABORAÇÃO DE PROJETO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



SUZANA MARQUES DE JESUS

**ESTUDO DA FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA DO BENZNIDAZOL NO
MODELO CÃO**

OURO PRETO – MG
2023

Suzana Marques de Jesus

**ESTUDO DA FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA DO BENZNIDAZOL NO
MODELO CÃO**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
da Universidade Federal de Ouro Preto, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Dr^a Cláudia Martins Carneiro
Co- orientadora: Dr^a Lorena Cera Bandeira

OURO PRETO – MG

2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

J58e Jesus, Suzana Marques de.
Estudo da farmacocinética pré-clínica do Benznidazol no modelo cão..
[manuscrito] / Suzana Marques de Jesus. - 2023.
56 f.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro.
Coorientadora: Dra. Lorena Cera Bandeira.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola
de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Chagas, doença de. 2. Chagas, doença de - Tratamento. 3.
Farmacocinética. 4. Quimioterapia combinada. I. Carneiro, Cláudia
Martins. II. Bandeira, Lorena Cera. III. Universidade Federal de Ouro Preto.
IV. Título.

CDU 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Suzana Marques de Jesus,

“ESTUDO DA FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA DO BENZNIDAZOL NO MODELO CÃO”.

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Membros da banca

Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto

Dra. Lorena Cera Bandeira - Co-orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Guilherme de Paula Costa - Examinador - Universidade Federal de Ouro Preto

Me. Viviane Flores Xavier - Examinadora - Universidade Federal de Ouro Preto

Cláudia Martins Carneiro, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 03/05/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Martins Carneiro, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 03/05/2023, às 01:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0518036** e o código CRC **290C5EBE**.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha avó
Maria Caetano Marques (*in memorian*)
A pessoa mais incrível. Sem o seu amor, afeto,
carinho e proteção isso não seria possível.
Guardo você em cada passo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me ajudar a enfrentar os obstáculos da vida e fazer com que os meus objetivos fossem alcançados.

Agradeço a toda minha família, em especial Juliana, pelo incentivo e apoio. Agradeço aos meus tios Ângela e Everaldo por terem me inspirado a chegar até aqui. Agradeço aos meus irmãos, minhas sobrinhas e meus primos pelos momentos alegres e leves que compartilhamos.

Agradeço ao Juninho pelo carinho, companheirismo e compreensão nessa etapa final. Agradeço também a sua família em especial aos seus pais Aloísio e Silvania pelo acolhimento, pelos momentos de alegria e pelas comidas.

Agradeço as meninas do grupo FarmaFriends, em especial a Pauliana por terem feito essa jornada ser inesquecível. Vocês foram fundamentais.

Agradeço os meus amigos de infância, em especial a Milena e Luís Paulo que mesmo distantes sempre torceram por mim.

Agradeço a Manuelita, por ter me encorajado chegar até aqui. Obrigado pelos conselhos, carinho e os cajuzinhos.

Agradeço as minhas companheiras Thais Fernanda e Bia pelas conversas, pela execução dos projetos no laboratório e pelos cafés da tarde. Agradeço a Lu por todo o suporte técnico e emocional durante essa caminhada.

Agradeço ao Laboratório de Imunopatologia pela oportunidade, em especial a Cláudia e a Lorena. Obrigado pela compreensão e ajuda em toda essa etapa. Obrigado por me aprimorarem e despertar esse amor pela ciência.

Agradeço a todos integrantes do Limp e NUPEB/UFOP em especial a Luísa e ao Leonardo foi extremamente gratificante acompanhar vocês e aprender ainda mais. Obrigado pela paciência e dedicação comigo.

Agradeço as minhas companheiras de trabalho Gi e Nath pelo entendimento e suporte nessa etapa. Admiro vocês a cada dia mais.

Agradeço a agência de fomento PIBIC/CNPq pela bolsa.

“Eu sou parte de uma equipe.
Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence.
De certa forma termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas.”

Ayrton Senna da Silva

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), e apresenta duas fases principais, a fase aguda e a fase crônica. Na fase crônica, cerca de 30% dos indivíduos irão desenvolver a forma cardíaca e/ou digestiva da doença. O benznidazol (BNZ) é o único fármaco disponível para o tratamento da doença de Chagas (DCh), embora útil na fase aguda apresenta baixa eficácia terapêutica na fase crônica com reações adversas frequentes e intensas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto das diferentes fases da infecção pelo *T. cruzi* sobre os parâmetros farmacocinéticos do benznidazol no modelo canino e como objetivo específico visou (i) Validar o método de análise do benznidazol em soro de cães experimentalmente infectados; (ii) Investigar a disposição cinética do benznidazol após dose múltipla de 3,5mg/Kg/12h em cães infectados pelo *T. cruzi* e tratados durante a fase aguda da infecção; (iii) Investigar a disposição cinética do benznidazol após dose múltipla de 3,5mg/Kg/12h em cães infectados pelo *T. cruzi* e tratados durante a fase crônica da infecção; (iv) Comparar os parâmetros farmacocinéticos do benznidazol obtidos de cães infectados pelo *T. cruzi* na fase aguda e crônica da doença. Para cumprir com o objetivo foram investigados 19 cães (10 na fase aguda e 9 na fase crônica), com 10 a 12 meses de idade, pesando 15-30 Kg. As amostras seriadas de sangue foram coletadas nos tempos 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12h após a administração de dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h de benznidazol. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os parâmetros farmacocinéticos do BNZ foram calculados no programa Phoenix WinNonlin (versão 7.0). Os dados foram comparados utilizando o teste de Mann-Whitney ($p \leq 0.05$) com auxílio do software R (versão 3.4.3). A infecção crônica pela cepa Be-78 de *T. cruzi* aumenta os valores de $C_{\text{máx}}$ (10,55 vs 17,97), C_{ss} (7,08 vs 12,56), C_{min} (4,32 vs 8,25) e AUC (84,98 vs 150,76) e reduziu os valores de V_{dss} (13,92 vs 9,20) e CL_{ss} (0,99 vs 0,56) quando comparado com os dados de fase aguda. Este estudo evidencia que a infecção crônica experimental pela cepa Berenice-78 de *T. cruzi* influencia a farmacocinética do BNZ. Outras análises ainda são necessárias para melhor compreensão das diferenças observadas até o momento.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Benznidazol, Farmacocinética

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), it has two main phases, an acute phase and a chronic phase. In the chronic phase, about 30% of individuals will develop the cardiac and/or digestive form of the disease. Benznidazole (BNZ) is the only drug available for the treatment of Chagas disease (DCh), although useful in the acute phase, it has low therapeutic efficacy in the chronic phase with frequent and intense reactions. The present study aimed to evaluate the impact of the different stages of *T. cruzi* infection on the pharmacokinetic parameters of benznidazole in the canine model and as a specific objective aimed to (i) Validate the method of analysis of benznidazole in serum from experimentally infected dogs; (ii) Investigate the kinetic disposition of benznidazole after a multiple dose of 3.5mg/Kg/12h in dogs infected with *T. cruzi* and treated during the acute phase of the infection; (iii) Investigate the kinetic disposition of benznidazole after a multiple dose of 3.5mg/Kg/12h in dogs infected with *T. cruzi* and treated during the chronic phase of the infection; (iv) Compare the pharmacokinetic parameters of benznidazole obtained from dogs infected with *T. cruzi* in the acute and chronic phases of the disease. To meet the objective, 19 dogs (10 in the acute phase and 9 in the chronic phase) were investigated, aged 10 to 12 months, weighing 15-30 kg. Serial blood samples were collected at times 0.25; 0.5; 0.75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12 hours after administration of multiple oral doses of 3.5 mg/Kg/12 hours of benznidazole. Analyzes were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and BNZ pharmacokinetic parameters were calculated using the Phoenix WinNonlin program (version 7.0). Data were compared using the Mann-Whitney test ($p \leq 0.05$) with the aid of the R software (version 3.4.3). Chronic infection with the Be-78 strain of *T. cruzi* increases C_{max} (10.55 vs 17.97), C_{ss} (7.08 vs 12.56), C_{min} (4.32 vs 8.25) and AUC values (84.98 vs 150.76) and included V_{dss} (13.92 vs 9.20) and CL_{ss} (0.99 vs 0.56) values when compared with acute phase data. This study shows that chronic experimental infection by the Berenice-78 strain of *T. cruzi* influences the pharmacokinetics of BNZ. Further analyzes are still needed to better understand the differences observed so far.

Keywords: Chagas disease; benznidazole; Pharmacokinetics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global de casos de doença de Chagas,.....	13
Figura 2 - Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> em esfregaço de sangue corado com giemsa	15
Figura 3 - Ciclo evolutivo do parasito no hospedeiro invertebrado	16
Figura 4 - Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 5 - Delineamento experimental	26
Figura 6 - Cromatogramas referentes às análises do BNZ em soro canino.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Total de óbitos por doença de Chagas entre 2007 a 2017	14
Tabela 2 - Parâmetros de validação do método de análise do benznidazol em soro.	36
Tabela 3 - Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e curta duração para as amostras CQB e CQA	38
Tabela 4 - Parâmetros farmacocinéticos do benznidazol administrado em dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h, por 60 dias, em cães SRD, nas fases aguda (n=6) e crônica (n=5) da infecção experimental pela cepa Be-78 de <i>T. cruzi</i> . Os valores estão expressos como mediana (IQ25-75%).	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC: Área sob a curva
BNZ: Benznidazol
CCC: Cardiopatia Chagásica Crônica
CEUA: Comitê de Ética em Experimentação Animal
CL: Clearance
CLAE: A cromatografia líquida de alta eficiência
CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CQ: Controle de qualidade
CQA: Controle de qualidade de alta concentração
CQB: Controle de qualidade de baixa concentração
CQM: Controle de qualidade de média concentração
CV: Coeficiente de variação
CYP3A4: Isoforma 3A4 do citocromo P450
DAD: Detector de arranjo de diodo
DCh: Doença de Chagas
ERP: Erro relativo padrão
ESF: Exame de sangue a fresco
Ka: Constante de absorção
Kel: Constante de eliminação
LAFEPE: Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
PBS: Tampão fosfato-salino
LIMP: Laboratório de Imunopatologia
LIQ: Limite inferior de quantificação
LSQ: Limite superior de quantificação
Mrp2: Proteína associada à resistência a múltiplos fármacos
NFX: Nifurtimox
NUPEB: Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
OMS: Organização Mundial da Saúde
OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde
P-gp: Glicoproteína P
SDR: Sem raça definida
SRAG: Síndrome respiratória aguda grave
SUS: Sistema Único de Saúde
T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*
T_{1/2}: Meia-vida de eliminação
T_{máx}: Tempo para concentração máxima
UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto
Vd: Volume de distribuição

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	DOENÇA DE CHAGAS	12
1.2	Agente etiológico	15
1.3	Ciclo evolutivo.....	15
1.4	Mecanismos de transmissão.....	17
1.5	Quadro clínico.....	18
1.6	Tratamento	19
1.7	Farmacocinética do Benznidazol	21
1.8	Validação Bioanalítica do método para quantificação do BNZ.....	23
2.	JUSTIFICATIVA	24
3.	OBJETIVOS.....	24
4.	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	Análise farmacocinética.....	33
4.2	Análise estatística	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Análise do benznidazol em soro	34
5.2	Validação do método de análise do benznidazol em soro.....	36
5.3	Avaliação da farmacocinética pré-clínica	40
6.	CONCLUSÕES	44
7.	ANEXO 1	45
8.	REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DCh), uma zoonose amplamente distribuída no continente americano, completou mais de cem anos de seu descobrimento. Entretanto, muitos aspectos relacionados ainda necessitam de esclarecimentos. A doença apresenta importantes questões socioculturais e político-econômicos que envolvem iniquidade e globalização, que muitas vezes não são consideradas (MALAFAIA, 2009).

Em fevereiro de 1909, Carlos Chagas consultou uma paciente chamada Berenice, com apenas 2 anos de idade e que seria o primeiro caso de DCh descrito na literatura. A criança apresentava febre alta, hepatoesplenomegalia, edema de face e presença de parasita no sangue (Carlos Chagas) que foi descrito como “tripanossomacruz” (COUTINHO; DIAS, 1999) em homenagem a Oswaldo Cruz. O relatório original de Chagas é o único na história da medicina, onde um único cientista descreveu em detalhes o ciclo de transmissão, vetor, hospedeiros, um novo organismo infeccioso (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010) e as manifestações clínicas. A DCh se tornou conhecida por tripanossomíase americana sendo então causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

A DCh estava restrita aos pequenos mamíferos das matas e campos da América, desde a Patagônia até o sul dos Estados Unidos. Esses animais (tatus, gambás, roedores) convivem com o inseto denominado "barbeiro" silvestres, e por meio de um mecanismo biológico, entre eles circula o *T. cruzi*, agente etiológico da DCh que tem a capacidade de infectar centenas de espécies de hospedeiros mamíferos (LUZ, 2013), inclusive o ser humano. Devido aos processos de colonização na sociedade humana moderna, em muitos lugares aconteceram desequilíbrios ecológicos (desmatamentos, queimadas) e os barbeiros foram desalojados, invadindo as habitações rústicas e pobres dos lavradores e colonos, fazendo com que a doença chegasse ao homem e aos mamíferos domésticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1989). Vale destacar, que uma análise de múmias da região do Vale do Peruaçu (MG), aponta que a infecção pelo parasito já acontecia em terras brasileiras há pelo menos 4.500 anos (FIOCRUZ, 2007).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a DCh é endêmica em 21 países das Américas. Existem cerca de 6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*

Tabela 1- Total de óbitos por doença de Chagas entre 2007 a 2017

Ano	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Total de óbitos por ano	4.725	5.096	4.741	4.876	4.673	4.650	4.628	4.428	4.472	4.461	4.543

Fonte: Ministério da Saúde, 2020

Na economia, mundialmente a DCh causa perdas de aproximadamente 7 bilhões de dólares anuais (PORTAL CHAGAS, 2016). No Brasil, utilizando indicadores de mortalidade, essa estimativa representa uma perda mínima estimada de 5,6 milhões de dólares por ano devido à ausência dos trabalhadores no local de trabalho (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2020).

Uma avaliação dos gastos por doença de Chagas em todo o mundo mostrou que ela apresenta custos superiores a outras doenças infecciosas, a exemplo da cólera (LEE *et al.*, 2013). Na saúde pública, por exemplo, Da Silva e cols no período de 2008- 2018 avaliaram através da plataforma DATASUS o perfil dos registros hospitalares em decorrência de DCh na região nordeste e concluíram que durante todo o período, foram gastos R\$4.935.785,87 em internações hospitalares nesta região.

O investimento com os medicamentos para as doenças negligenciadas é pequeno quando comparado com o gasto total, uma vez que se trata de fármacos que não se trazem um retorno financeiro para a indústria farmacêutica; portanto, há pouca inovação nessa área. Dessa forma, os medicamentos utilizados são aqueles desenvolvidos há mais de 50 anos (GARCIA, 2011). 90% dos problemas de saúde continuam recebendo apenas 10% dos recursos. Esses números exibem a existência de uma política de pesquisa excludente (SOARES SOBRINHO *et al.*, 2007).

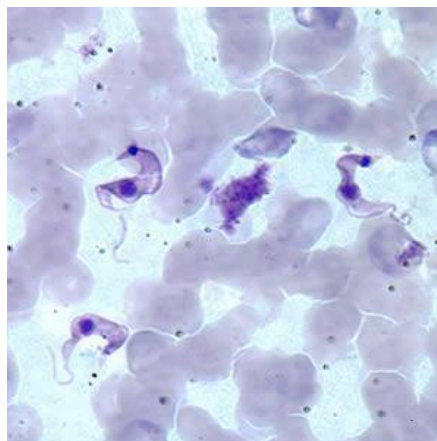
Frente a crise sanitária causada pela COVID-19, o Ministério da saúde alterou a Portaria de Consolidação nº 4/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para incluir a doença de Chagas crônica na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). No período de março a agosto de 2020, foram registrados 125.691 óbitos por COVID-19, dos quais 0,2% (n=207) faziam menção

à doença de Chagas enquanto comorbidade. Em relação aos óbitos por doença de Chagas como causa básica, foram registrados no país 1.746 óbitos, dos quais 29 registros mencionam a COVID-19 ou a Síndrome respiratória aguda grave (SRAG) enquanto comorbidades que tenham agravado ou contribuído tanto diretamente ou indiretamente ao óbito.

1.2 Agente etiológico

O *T. cruzi* (Figura 2), agente etiológico da DCh, é um protozoário flagelado que pertence à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (MASSARO, REZENDE, CAMARGO, 2008). Apresenta diferentes tipos de cepas que se diferenciam quanto à morfologia, antigenicidade, patogenicidade, composição genética, infectividade (COURA, 2003) e susceptibilidade ao tratamento (FILARDI & BRENER, 1987). É considerado multi-hospedeiro, visto que possui capacidade de infectar diversas espécies de hospedeiros mamíferos e transmitir através triatomíneos hematófagos da família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae* (PORTAL CHAGAS, 2017).

Figura 2 - Tripomastigotas de *T. cruzi* em esfregaço de sangue corado com giemsa.



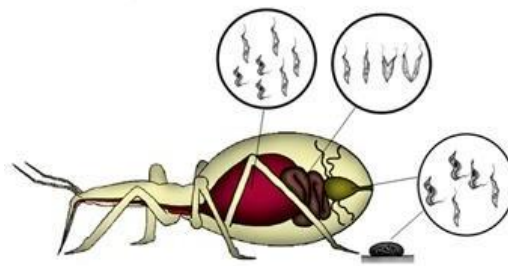
Fonte: CDC – DPDx, 2021

1.3 Ciclo evolutivo

O triatomíneo se infecta ao ingerir as formas tripomastígotas presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado durante o hematofagismo. No intestino médio, essas

formas tripomastigotas se diferenciam em epimastígotas que se multiplicam por divisão binária simples, realizando a manutenção da infecção no vetor (PERIN, 2019). Após migrarem para o reto, se transformam em tripomastigotas metacíclicas, onde são eliminados junto com as fezes e a urina do triatomíneo (JANSEN *et al.*, 2000) (Figura 3).

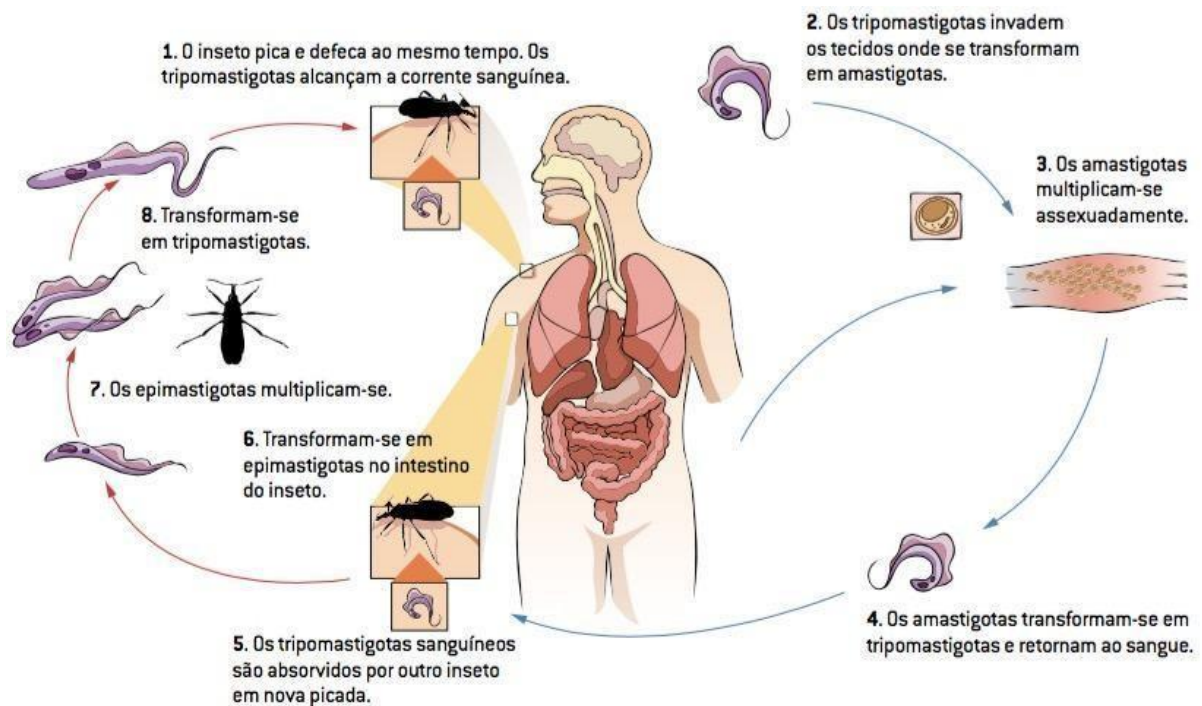
Figura 3 - Ciclo evolutivo do parasito no hospedeiro invertebrado



Fonte: Portal da Doença de Chagas, 2017

Para que ocorra a infecção em humanos faz-se necessário carrear o material depositado pelo triatomíneo à mucosa ou ao ferimento na pele, fato que ocorre normalmente ao coçar o local. Vale ressaltar que o parasito não tem capacidade de penetrar a pele intacta. As tripomastigotas metacíclicas, uma vez no organismo do hospedeiro vertebrado, infectam novas células e, dentro delas, se convertem em amastigotas replicativas que em um determinado momento, com a diferenciação das amastigotas em tripomastigotas provoca a ruptura da célula do hospedeiro, liberando dessa vez as tripomastigotas (GUARNER, 2019) que infectam células vizinhas ou caem na circulação disseminando-se para invadir outras células de diferentes órgãos e tecidos, repetindo-se o ciclo (DIAS, JCP., e COURA, JR, 1997). A Figura 4 evidencia o ciclo evolutivo.

Figura 4 - Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: CDC 2019 - Adaptada

1.4 Mecanismos de transmissão

Dentre os principais mecanismos de transmissão destacam-se: contato com o vetor (triatomíneos), via oral (comida contaminada), transfusão de sangue e através da placenta. Outros mecanismos menos frequentes, incluem os acidentes de laboratório, manuseio de animais infectados, transplante de órgãos, transmissão sexual (feridas, espermatozoides ou fluidos menstruais) e pela infecção induzida criminalmente por inoculação ou por via oral (COURA, 2007).

Com a implementação de programas muito bem-sucedidos, implantados no Brasil a partir da década de 1980, envolvendo o combate ao vetor, a melhoria das condições habitacionais e o controle sorológico efetivo nos bancos de sangue, houve uma diminuição significativa da transmissão no campo e nas cidades (PORTAL CHAGAS, 2017). Em reconhecimento, o país recebeu em 2006 a Certificação Internacional de Interrupção da Transmissão da doença pelo *T. infestans*, concedida pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e OMS (FIOCRUZ, 2013).

Atualmente no Brasil, a via oral vem se destacando como principal mecanismo de transmissão, e corresponde pela quase totalidade dos casos novos ocorridos na última década (ALEJANDRO, 2017). Segundo o Ministério da Saúde, das infecções ocorridas no país no período de 2008 a 2017, 72% foram por transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açai, bacaba, entre outros).

1.5 Quadro clínico

A DCh é caracterizada por uma fase aguda com duração de 4 a 8 semanas após a infecção pelo *T. cruzi* sendo que a maioria dos indivíduos permanecem assintomáticos e quando a resposta imune é insuficiente para erradicar completamente o patógeno, há a evolução para a fase crônica da doença. Nesta fase cerca de 30% dos indivíduos desenvolve a forma mais severa da doença com complicações clínicas graves, principalmente cardiovasculares (ALBAREDA *et al.*, 2006; NUNES, 2018).

A fase aguda é caracterizada pela presença do protozoário no sangue do paciente podendo apresentar sinais de infecção, como sinal de Romaña e o Chagoma de Inoculação (CAVALCANTE *et al.*, 2019). Alguns indivíduos podem apresentar sintomas que incluem febre, edema, adenomegalia, hepatoesplenomegalia e ou meningoencefalite além de dilatação cardíaca e derrame pericárdico.

A fase crônica inicia-se quando há uma baixa parasitemia, geralmente semanas após o início da infecção (COURA, 2003), e o diagnóstico é baseado na detecção de IgG contra antígenos de *T. cruzi* ou testes moleculares. Essa fase inclui duas formas de doença: uma forma indeterminada (latente ou pré-clínica), e uma forma determinada, ou com expressão clínica, que se subdivide em cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (SIMÕES *et al.*, 2018).

A forma indeterminada representa aproximadamente 60-70% dos casos, onde os pacientes apresentam sorologia reativa e podem permanecer sem qualquer manifestação clínica durante toda a vida ou evoluírem para formas clínicas definidas (NUNES, 2018). Cerca de 30% dos pacientes infectados evoluem para a Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) e em torno de 10% desenvolvem a forma digestiva da doença (BASTETTI *et al.*, 2014).

1.6 Tratamento

Em 1967, foi introduzido no mercado o nifurtimox (3-metil-4 {(5-nitrofurfurilidene) amino} tiomorfoline-1-,1-dioxide), produzido pelo Laboratório Bayer e lançado com o nome comercial de Lampit[®], na forma de comprimidos com 120 mg de princípio ativo sendo a primeira droga usada no tratamento da fase aguda da doença de Chagas (BRENER, 2000). Devido a sua toxicidade, teve sua comercialização suspensa na Argentina, Chile, Uruguai e Brasil na década de 80 (CANÇADO, 2002; COURA & DE CASTRO, 2002; BERN, 2011). Atualmente nestes países, o único fármaco disponível para o tratamento é o benznidazol (BNZ) [N-benzil-2-(2-nitro-1H-imidazol) acetamida] considerado um derivado 2-nitroimidazólico (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006) que foi sintetizado em 1972, por Wineholt e Liebman e produzido pelo laboratório Hoffman - La Roche, na Suíça (CANÇADO, 2000). No momento atual é fabricado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE).

O BNZ é proposto ser um composto de classe 4 no Sistema de Classificação Biofarmacêutica com base em sua baixa solubilidade em água e coeficiente de partição (MAXIMIANO *et al.*, 2010), porém estas propriedades físico-químicas podem estar relacionadas aos efeitos adversos observados e com a sua baixa eficácia principalmente na fase crônica da doença.

O mecanismo de ação do BNZ ainda não está completamente elucidado, alguns autores como Castro; Diaz De Toranzo, (1988) e Urbina, (2002) relatam a presença de reações de redução do grupo nitro (NO₂). Há a formação de ligações covalentes entre o radical nitro formado com macromoléculas do *T. cruzi*. O radical nitro formado exerce o efeito tripanocida do BNZ através de ligações covalentes com macromoléculas do parasita: DNA nuclear e mitocondrial, lipídeos e proteínas (LESLIE, 2017).

De acordo com a bula, a dose diária para o tratamento adulto é de 5 a 7 mg/kg de peso corporal, devendo ser dividida em duas doses, uma após o café da manhã e outra após o jantar, com intervalo aproximado de 12 horas entre elas. O tratamento deve ser mantido durante 30 a 60 dias consecutivos, com uma dose máxima diária recomendada de 300mg/dia. (LAFEPE, 2013). Em 2011, surgiu uma apresentação que atendesse às necessidades das crianças registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e adicionado à Lista de Medicamentos Essenciais da OMS para crianças em 2013. A posologia adaptada do BNZ para crianças consiste em 12,5 mg por

comprimido, duas vezes ao dia, por 60 dias (DNDi, 2008; WHO, 2013). O medicamento é distribuído pelo Ministério da Saúde gratuitamente através do Sistema Único de Saúde (SUS).

Quando avaliado o tratamento em humanos, de acordo com o Consenso Brasileiro de doença de Chagas, cerca de 30% dos usuários de BNZ apresentam reações adversas (PONTES *et al.*, 2010) que são classificadas em 3 grupos: 1) Sintomas de hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas (que surgem entre o 7º e o 10º dia de tratamento), febre, edema, linfadenopatia, dor muscular e nas articulações; 2) Depressão de medula óssea, trombocitopenia púrpura e agranulocitose, nas manifestações mais severas; 3) Polineuropatia, parestesia e polineurite dos nervos periféricos (COURA & DE CASTRO, 2002) fazendo com que ocorra interrupção do tratamento com taxas variando de 15 a 20% dos pacientes (KRATZ *et al.*, 2018; MOLINA *et al.*, 2015; MORILLO *et al.*, 2015). Diante disso, observa-se a importância de investigar o BNZ no sentido de evitar hospitalização e sequelas devido ao aparecimento das reações adversas a medicamentos, demonstra também a necessidade de uma revisão na atual posologia e esquema de tratamento.

Os dados atuais de cura parasitológica evidenciam que o sucesso da quimioterapia com BNZ está intimamente relacionado com a fase da infecção em que o tratamento é administrado apresentando uma maior eficácia terapêutica na fase aguda da doença (CALDAS; SANTOS; NOVAES, 2019). Porém, isso raramente acontece devido à natureza inespecífica dos sintomas nesta fase e ao baixo acesso aos cuidados de saúde em áreas remotas afetadas pela doença (MAGALHÃES *et al.*, 2022).

Uma investigação da taxa de cura, utilizando quimioterapia específica com BNZ em pacientes com doença de Chagas aguda e crônica, observou a cura em 76% dos pacientes agudos e de apenas 8% dos crônicos. A hipótese do autor, é que na doença crônica o *T. cruzi* persiste nos tecidos conseguindo, assim, escapar da ação do medicamento (CANÇADO, 2002). Machado-De-Assis e *cols* (2013) compararam as avaliações laboratoriais e clínicas de pacientes com doença de Chagas, revelou que o tratamento etiológico com BNZ pode beneficiar os pacientes na evolução clínica da doença de Chagas e no prognóstico. O tratamento da fase crônica tardia visa reduzir os níveis de parasitemia, evitar o aparecimento ou progressão de lesões viscerais e interromper a cadeia de transmissão (OLIVEIRA; MARGIOTO, 2014). Mas, para Pérez-Molina e *cols* (2009) a eficácia do tratamento na infecção crônica tardia é duvidosa mesmo que os dados geralmente apontem para um efeito benéfico.

1.7 Farmacocinética do Benznidazol

A farmacocinética pré-clínica é uma ferramenta importante para auxiliar no alcance da posologia ideal, além de possibilitar a compreensão da ocorrência dos efeitos adversos. O principal objetivo é garantir que as doses administradas sigam dentro da janela terapêutica que garanta a eficácia e segurança para o paciente (LEONARDI, 2019). Este processo é apoiado em princípios farmacocinéticos que promovem e auxiliam na determinação adequada e/ou ajustes na posologia, na compreensão da ação dos fármacos, no desenvolvimento de novos fármacos além de promover uma utilização mais racional do medicamento.

Mesmo sendo utilizado e desenvolvido a décadas, ainda não há informações claras a respeito da farmacocinética e farmacodinâmica do BNZ (ALONSO-PADILLA *et al.*, 2019) e, portanto, diversos modelos experimentais vêm sendo utilizados em busca de melhores esclarecimentos. Workman e *cols* (1984) investigaram a farmacocinética detalhada do benznidazol em camundongos, cães e ovelhas com o objetivo de fornecer dados para a estimativa das doses necessárias para quimiossensibilização no ser humano. Com o mesmo intuito, Davanço e *cols* (2015) avaliaram a farmacocinética do BNZ após administração de dose única oral de BNZ em ratos, desenvolveram e validaram um método bioanalítico para a quantificação do BNZ em plasma, concluindo que os parâmetros farmacocinéticos podem ser utilizados para futuros ensaios pré-clínicos do BNZ e em associação com outros medicamentos ou de novas formulações. E em seguida, avaliaram a farmacocinética pré-clínica do BNZ administrado na forma farmacêutica de comprimidos de liberação prolongada em coelhos demonstrando que houve um prolongamento da liberação do fármaco a partir da matriz polimérica e aumento da permanência do fármaco *in vivo*. Com o propósito de avaliar a cinética do BNZ aliado as ciclodextrinas, Leonardi e *cols* (2013) observaram em ratos a melhora da biodisponibilidade oral, da taxa de dissolução e o aumento na concentração plasmáticas, com valores de AUC até 3,7 vezes e $C_{máx}$ aumentado 2,5 vezes em comparação com BNZ sozinho. Já Moreira e *cols* (2012) avaliaram a farmacocinética do BNZ aliado a Itraconazol no modelo murino a fim de avaliar os possíveis mecanismos que influenciam na melhora da terapia, após a verificação de alteração em parâmetros farmacocinéticos os pesquisadores sugeriram que o principal efeito dessa interação é o acúmulo de BNZ no sistema biológico. Esse efeito pode contribuir para a melhora da eficácia terapêutica, além

do sinergismo dos diferentes mecanismos de ação do benznidazol e do itraconazol contra o *T. cruzi in vivo*. Melo e cols (2019) avaliaram o BNZ em camundongos Swiss após diferentes esquemas terapêuticos obtendo como resultado que a resposta terapêutica ao BNZ parece não ser dose-dependente.

A farmacocinética em humanos foi pouco estudada até o momento, com literatura científica bem restrita (DAVANÇO, 2015). Os primeiros ensaios farmacocinéticos com BNZ foram publicados por Raaflaub e Ziegler (1979) e, segundo esses autores, o BNZ é rapidamente absorvido a partir do trato gastrointestinal, com picos de concentração plasmática de 2,2 a 2,8 µg/mL entre 3 a 4 horas após a administração por via oral na dose de 100 mg. O fármaco é rapidamente e uniformemente distribuído no plasma com valor de volume de distribuição (Vd/F) igual a 0,56 L/kg. A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) é de 12 horas e a taxa de ligação a proteínas plasmáticas é de cerca de 40%. A eliminação do fármaco é de 60 a 67% por via renal (metabólitos) e de 22 a 28% por via fecal (RAAFLAUB, 1980).

Soy, em 2015, com o objetivo de construir um modelo de farmacocinética populacional para caracterizar a farmacocinética do BNZ em adultos com DCh crônica, observou em estudos de modelagem e simulação que o regime de 2,5 mg/kg/12h pode levar a exposição excessiva dos pacientes e o regime de 2,5 mg/kg/24h mantém as concentrações plasmáticas mínimas de BNZ dentro do intervalo alvo recomendado para a maioria dos pacientes. Molina e cols (2017) em um estudo farmacocinético de fase I, aberto, não randomizado do BNZ realizado com 8 voluntários adultos saudáveis concluiu que os regimes de dose (150 mg / 12 h ou 100 mg / 8 h) atingiram um intervalo de concentração de estado estacionário acima da dose terapêutica experimental mínimo notando algumas alterações em parâmetros farmacocinéticos quando comparados o sexo masculino e feminino.

Apesar da existência de alguns estudos farmacocinéticos do BNZ em algumas espécies animais, a farmacocinética pré-clínica do BNZ ainda é pouco explorada e com resultados insatisfatórios. Devido à escassez dessas informações, compreende-se que a experimentação animal pode auxiliar na melhoria da eficácia do tratamento, identificação dos efeitos colaterais, investigação de novas aplicações terapêuticas e na determinação dos parâmetros farmacocinéticos que podem trazer informações acerca da dosagem e o intervalo de administração. Além disso, sabe-se que para a realização de estudos em humanos é necessária estar fundamentada na experimentação prévia realizada em

animais, em laboratórios ou em outros fatos científicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Em 1988, Tafuri e colaboradores descreveram que o cão seria o modelo mais próximo do almejado para o estudo da DCh pois seria capaz de desenvolver de forma adequada a fase aguda e indeterminada semelhante ao observada no ser humano. Guedes e cols (2002) investigaram o papel deste modelo experimental para as fases aguda e crônica da doença de Chagas, antes e após os tratamentos terapêuticos e os resultados também foram positivos quanto ao uso deste modelo em pesquisas envolvendo a quimioterapia da DCh. O modelo experimental é relevante para estudos de quimioterapia para o controle da doença de Chagas.

1.8 Validação Bioanalítica do método para quantificação do BNZ

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tornou possível a análise de compostos orgânicos, incluindo drogas nas últimas duas décadas. Esse rápido aumento e aprimoramento da metodologia analítica com CLAE permitiu aos pesquisadores e cientistas lidar com outros desenvolvimentos científicos e instrumentais em seus campos de trabalho (COLLINS *et al.*, 2006). É uma técnica utilizada na separação dos vários componentes de uma mistura de substâncias, com o objetivo de identificar esses componentes, quantificá-los ou purificá-los.

O desenvolvimento de um método bioanalítico deve ser guiado pelas diretrizes estabelecidas na RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Os parâmetros de desempenho analítico mais comumente analisados são: seletividade, efeito residual (*carry over*), precisão, exatidão, linearidade, estabilidade, limite inferior de quantificação e recuperação (EMEA, 2011; BRASIL, 2012; US-FDA, 2013).

Diversos autores desenvolveram e validaram métodos para a quantificação do BZN em diferentes modelos e matrizes biológicas utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (GUERRERO *et al.*, 2011; PADRO *et al.*, 2012; PINAZO *et al.*, 2012; ALTCHER *et al.*, 2014; DAVANÇO *et al.*, 2014; DAVANÇO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2012; PERIN *et al.*, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que: (i) A doença de Chagas é uma doença negligenciada; (ii) O benznidazol é o único fármaco disponível para o tratamento da doença de Chagas no Brasil; (iii) A limitada eficácia e segurança do benznidazol no tratamento padrão da DCh, pode ser devido a propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do fármaco; (iv) A escassez de dados na literatura a respeito da sua farmacocinética, inclusive no modelo cão; (v) que o modelo cão é considerado um bom modelo para a doença de Chagas experimental. O presente estudo propôs investigar os parâmetros farmacocinéticos do BNZ na fase aguda e crônica da doença de Chagas.

3. OBJETIVOS

Geral

Avaliar o impacto das diferentes fases da infecção pelo *T. cruzi* sobre os parâmetros farmacocinéticos do benznidazol no modelo canino.

Específicos

- I. Validar o método de análise do benznidazol em soro de cães experimentalmente infectados;
- II. Investigar a disposição cinética do benznidazol após dose múltipla de 3,5mg/Kg/12h em cães infectados pelo *T. cruzi* e tratados durante a fase aguda da infecção;
- III. Investigar a disposição cinética do benznidazol após dose múltipla de 3,5mg/Kg/12h em cães infectados pelo *T. cruzi* e tratados durante a fase crônica da infecção;
- IV. Comparar os parâmetros farmacocinéticos do benznidazol obtidos de cães infectados pelo *T. cruzi* na fase aguda e crônica da doença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

O protocolo de pesquisa nº **2017/38** foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto-MG (CEUA/UFOP) e, posteriormente, foi encaminhado para o Centro de Ciência Animal da UFOP (CCA/UFOP), local da realização dos experimentos (Anexo 1).

Delineamento experimental

Animais

Foram investigados 19 cães sem raça definida (SDR), com idade entre 10 a 12 meses e peso entre 15 a 30 kg. Os cães foram mantidos no canil do CCA/UFOP, seguindo as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Inóculo e infecção

A obtenção do inóculo com a cepa Berenice-78 de *T. cruzi* foi realizado no 14º dia de infecção em camundongos *Swiss* (pico de parasitemia para cepa Be-78), mediante retirada do sangue do plexo orbital. Em cada passagem, o número de formas tripomastigotas foi determinado de acordo com a técnica descrita por Brener (1962). Para o ajuste foi usado um tampão fosfato-salino PBS estéril pH 7,2. Com a obtenção dos inóculos padronizados, os cães foram inoculados pela via intraperitoneal com 2.000 tripomastigotas sanguíneas da cepa Be-78 por quilograma de peso corporal. Após infecção, os animais foram avaliados diariamente quanto aos sinais clínicos, e a parasitemia foi realizada diariamente segundo Brener (1962) até 5 dias depois da primeira negatificação.

Protocolo experimental

Dez (10) cães foram randomicamente selecionados para compor o grupo Fase aguda que corresponde a um mês pós-infecção e nove (9) cães foram randomicamente selecionados para compor o grupo Fase crônica que corresponde a 1 ano pós-infecção. Para cada fase de infecção os animais foram distribuídos em dois grupos quanto à instituição ou não do tratamento com BNZ. A dosagem utilizada foi baseada na posologia

máxima da bula do medicamento. A Figura 5 ilustra a divisão dos grupos.

Fase Aguda (n=10)

- Grupo I ou controle (n=4, 2 machos e 2 fêmeas): animais infectados e não tratados;
- Grupo II (n=6, 4 machos e 2 fêmeas): dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h de BNZ durante 60 dias consecutivos.;

Fase Crônica (n=9)

- Grupo I ou controle (n=4, 2 machos e 2 fêmeas): animais infectados e não tratados;
- Grupo II (n=5, 1 macho e 4 fêmeas): dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h de BNZ durante 60 dias consecutivos.;

Figura 5 - Delineamento experimental



Extração de materiais biológicos

Coleta de sangue

O método de coleta de sangue utilizado em todo o estudo foi por punção da veia

cefálica. A contenção do animal foi realizado com uso de cordas de algodão e mãos para amordaçar a boca. Após garrotear a pata dianteira do animal, foi realizada a assepsia do local a ser puncionado com algodão embebido em álcool 70°Gl. Aspira-se o sangue e após retirar a agulha, pressiona-se a região com algodão umedecido com água oxigenada 20 volumes.

Para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos, amostras seriadas de 5mL de sangue dos cães foram coletadas em seringas não heparinizadas após a administração do BNZ nos tempos 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12h. As coletas foram realizadas após 10, 30, 40 e 60 dias de tratamento com BNZ.

A administração dos fármacos por via oral foi realizada com uso de provendas e/ou palatilizantes, estimulando o reflexo de deglutição/tosse pela compressão manual do terço médio da traqueia para garantir a ingestão das formas farmacêuticas. Os animais não foram submetidos ao jejum ou restrição hídrica antes da administração dos fármacos. O sangue coletado foi transferido para tubos de 5 mL com gel ativador de coágulo (Olen®) previamente identificados, acondicionados em caixa térmica com gelo e encaminhados para o Laboratório de Imunopatologia do NUPEB/UFOP. As amostras de soro para análise cromatográfica foram obtidas por centrifugação (2500 rpm por 10 minutos a 4 °C / centrífuga refrigerada Eppendorff® modelo 5810r), separadas em 2 replicatas nos tempos 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12h (análise de BNZ). Todas as amostras foram armazenadas a – 80 °C até o momento da análise.

Para garantir a higidez dos cães, foram realizadas avaliações hematológicas e bioquímicas, entre e após as fases do estudo.

Análise cromatográfica

A análise do BNZ como concentração total foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD). O sistema CLAE foi constituído por cromatógrafo da Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-20AT, auto injetor modelo SIL-20A HT, forno CTO-20A e sistema controlador modelo SCL 20A, equipado com detector DAD modelo SPD-M20A operando a 324 nm.

Preparo das amostras

As amostras de soro branco foram obtidas dos cães incluídos neste estudo. Foram coletadas amostras de soro de todos os cães em dias e horários distintos (não tratados com

BNZ), e após foi realizado uma mistura destes soros.

Em tubos cônicos de 1,5 mL, alíquotas de 100 µL de soro foram enriquecidas com 5 µL da solução de padrão interno (omeprazol). As misturas foram acrescidas com 500 µL de acetonitrila e agitadas por 10 minutos em agitador tipo *vortex*. A seguir, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 13800 rpm. As fases orgânicas foram transferidas para tubos cônicos de 1,5 mL e evaporadas a vácuo usando evaporador rotatório. Os resíduos foram reconstituídos com 100 µL da fase móvel, agitados por 1,5 minuto em agitador tipo *vortex*, centrifugados por 5 minutos a 13800 rpm, e então 85 µL do sobrenadante foram coletados e 20 µL submetidos à análise cromatográfica.

Análise do benznidazol em soro empregando CLAE-DAD

O método de análise do benznidazol em soro empregando CLAE-DAD foi desenvolvido com base no procedimento analítico anteriormente desenvolvido e validado em plasma de camundongo (MOREIRA DA SILVA *et al.*, 2012; PERIN *et al.*, 2017) pelo nosso grupo de pesquisa e seus colaboradores.

Soluções padrão e Reagentes

A solução estoque de cloridrato de benznidazol (99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 4000 µg de base livre/mL de acetonitrila (ACN). A partir dessa solução foram realizadas diluições para obtenção das soluções de uso, nas concentrações 2; 4; 10; 20; 100, 200; 400; 500; 1000 e 2000 µg de benznidazol/mL de ACN. A solução de omeprazol (padrão interno - PI, 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 2000 µg de base livre/mL de ACN e diluída para 200 µg /mL de ACN. Todas as soluções padrão foram armazenadas a -20°C.

Os solventes empregados para diluição das soluções padrão, preparo da fase móvel e das amostras foram obtidos da J.T.Baker (Fairfield, EUA) como grau de cromatografia.

A água ultrapura utilizada nos experimentos foi obtida em sistema de purificação Milli-Q Direct 8[®] (Millipore, Molsheim, França).

Validação do método de análise do benznidazol em soro

O método de análise do BNZ em soro de cão experimentalmente infectado foi validado de acordo com as recomendações da ANVISA para métodos bioanalíticos, sendo efeitos matriz e residual, limite de quantificação, linearidade, recuperação, precisão, exatidão, estabilidade e seletividade os parâmetros que foram avaliados.

Curvas de calibração em soro

As curvas de calibração representam a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Foram construídas em triplicata utilizando alíquotas de 100 µL de soro branco enriquecidas com 5 µL de cada solução padrão de uso de BNZ e do PI e submetidas aos respectivos processos de extração descritos anteriormente. Assim, as concentrações de BNZ foram de 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 20; 25; 50 e 100 µg /mL de soro.

As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação foram obtidos das razões das áreas dos picos plotadas (padrão/PI) em função das respectivas concentrações séricas.

Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) que é caracterizado pela menor concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz foi estabelecido para BNZ em 0,1 µg/mL de soro. A partir disso, foram realizadas análises de 10 replicadas destas concentrações para verificar se estas se enquadrariam nos valores determinados de precisão e exatidão. O LIQ foi definido como a menor concentração sérica analisada com CV e erro padrão relativo (EPR) inferiores a 20%.

Linearidade

A linearidade foi definida como a maior concentração sérica (limite superior de quantificação) que apresentou relação linear com a resposta do detector na situação de inclusão do LIQ. Foram avaliadas amostras de soro enriquecidas com concentrações

crescentes de BNZ (em triplicata para cada concentração) em relação às aquelas empregadas na construção das curvas de calibração e, a seguir, submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica.

Para a aprovação das curvas, os padrões de calibração deveriam apresentar um desvio de até 15% e o LIQ um desvio de até 20%. O coeficiente de correlação linear deveria ser igual ou superior a 0,98.

Efeito Residual

O efeito residual é gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras anteriores foi avaliado com 3 injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada de matriz adicionada de BNZ em concentração acima da maior concentração da curva de calibração (200 µg/mL soro). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % da resposta do PI.

Amostras de controle da qualidade em soro

As amostras de controle da qualidade (CQs) consistem em uma amostra de matriz branco (soro), adicionada de BNZ em concentrações específicas, usadas para validar e monitorar o desempenho do método bioanalítico. Existem 3 tipos de amostras de controle da qualidade: controle da qualidade de baixa concentração, média concentração, alta concentração. O controle da qualidade de baixa concentração (CQB) representa uma amostra de matriz adicionada de uma concentração de BNZ até 3 vezes o limite inferior de quantificação (LIQ), ponto mais baixo da curva analítica. O controle da qualidade de média concentração (CQM) representa uma amostra de matriz adicionada de uma concentração de BNZ próxima à média entre o ponto mais alto e o mais baixo da curva. E o controle da qualidade de alta concentração (CQA) representa uma amostra de matriz adicionada de uma concentração de BNZ entre 75% e 85% do maior ponto da curva

analítica. Os controles da qualidade foram preparados nas concentrações de BNZ de 0,2 (CQB), 50 (CQM) e 80 µg /mL (CQA).

Para aprovação da corrida analítica, no mínimo 67% do total de CQs e no mínimo 50% dos CQs de cada concentração devem apresentar desvio menor ou igual a 15% em relação aos seus respectivos valores nominais. Os controles da qualidade para análise das amostras em soro foram armazenados à - 20°C até a análise.

Efeito Matriz

Estudo realizado para verificar se há supressão iônica ou aumento de resposta do fármaco em análise ou do padrão interno devido à interferência de algum componente endógeno presente na matriz biológica. A investigação do efeito de matriz durante a quantificação de compostos endógenos ou exógenos e/ou seus metabólitos é um importante parâmetro a ser avaliado durante o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico (CASSIANO e cols 2009). Para a sua realização foram utilizadas mistura de amostras de soro de todos os cães incluídos neste estudo. Estas amostras foram coletadas em dias e horários distintos (incluindo amostras hemolisadas), no intuito de aumentar a variabilidade na qualidade do soro.

Os soros foram processados de acordo com o descrito em “Preparo de amostras”. Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a equação a seguir:

$$FMN = \frac{(\text{resposta do analito em matriz})/(\text{resposta do PI em matriz})}{(\text{resposta do analito em solução})/(\text{resposta do PI em solução})}$$

O coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%. O CV é expresso em porcentagem e calculado conforme a equação abaixo:

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

Recuperação

A recuperação foi avaliada em quintuplicata em amostras de soro enriquecidas com soluções padrão CQB e CQA de BNZ. As amostras foram analisadas como acima descrito e a recuperação calculada por meio da comparação direta das áreas dos picos das amostras extraídas com as áreas dos picos obtidos de soluções padrão adicionadas a extratos de soro branco.

Estabilidade

Visa determinar se a concentração de um analito se mantém dentro de limites estabelecidos, numa dada matriz, sob condições específicas. Para assegurar que a estabilidade do analito seja mantida nas condições de preparo, análise e estocagem das amostras, vários tipos de estabilidade devem ser avaliados durante a validação de um método analítico. O ensaio garante que todos os passos do método (matriz, anticoagulante, condições de armazenamento, extração e análise). Os ensaios devem ser realizados utilizando amostras CQB e CQA em triplicata e os resultados devem ser ± 15 % em relação a concentração nominal da curva de calibração (EMEA, 2011).

Precisão e exatidão

O estudo de precisão mede a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz este é dividido em precisão intracorrida e precisão intercorridas. Foram utilizadas amostras de CQA, CQM e CQB. As soluções preparadas em soro foram armazenadas a -20°C até a análise. Para o estudo de precisão intracorrida analisou-se 5 replicatas de cada controle da qualidade e uma curva de calibração.

O estudo de precisão intercorridas foi composto por análises realizadas em 3 dias diferentes. Para que o método seja considerado preciso, o coeficiente de variação, entre os CQs de mesmas concentrações, deve ser igual ou inferior a 15%, exceto o LIQ, que aceita um CV de até 20%.

O estudo de exatidão que é a concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência intracorrida e intercorridas foi realizado da mesma maneira que o

estudo de precisão, porém o seu cálculo é baseado no Erro Padrão Relativo, obtendo então valores de até 15% do valor nominal, exceto para o LIQ, que aceita um EPR de até 20% do valor nominal. O EPR é calculado conforme a equação a seguir:

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Concentração teórica})}{(\text{Concentração teórica})} \times 100$$

4.1 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos do BNZ foram calculados a partir das concentrações séricas ao longo do tempo de 12h de coleta das amostras por meio do modelo monocompartimental, empregando o software Phoenix 64 / WinNonLin versão 7.0 (Pharsight, Certara™ Company).

Os parâmetros de exposição calculados foram: C_{max} (concentração sérica máxima) T_{max} (tempo para alcançar C_{max}), AUC 0-12 (área sob a curva concentração sérica versus 12h), t_{1/2el} (meia-vida de eliminação), C_{ss} (concentração no estado de equilíbrio), V_d/F (volume de distribuição aparente no estado de equilíbrio), CL/F (clearance total aparente no estado de equilíbrio), K_{el} (constante de velocidade de eliminação), Flutuação (diferença entre concentração plasmática máxima e mínima comparada com a concentração plasmática média em um intervalo de 12h).

4.2 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do software R: *A language and environment for statistical computing*, versão 3.4.3 (R foundation for statistical computing, Viena, Áustria, 2014) para obtenção da mediana e intervalo de interquartil 25-75% (IQ25-75%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O acompanhamento da fase aguda (n= 10) foi iniciado um mês após a infecção e para a cronificação dos animais (n=9) foi aguardado o período de um ano. A taxa de infectividade foi de 100% em ambas as fases da infecção. Para a confiabilidade nos resultados foi avaliado a saúde dos animais incluídos neste estudo. Os animais conseguiram responder bem ao tratamento sem manifestar efeitos adversos. Os exames bioquímicos e hematológicos para a avaliação das funções renais, hepáticas e musculares apresentaram resultados normais. Além disso, não houve alterações no peso dos animais permanecendo constante até o final do estudo.

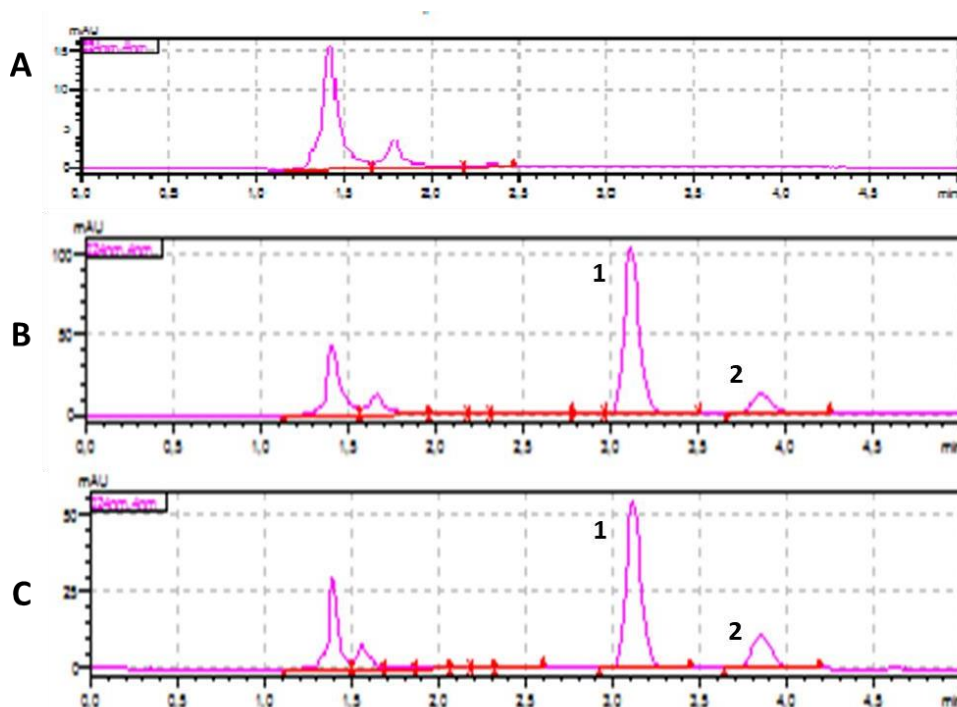
5.1 Análise do benznidazol em soro

O presente estudo apresenta pela primeira vez, a análise do benznidazol em soro de cão infectado pelo *T. cruzi* utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD).

Com base nas propriedades físico-químicas do BNZ e na literatura, foram realizados testes de abordagem direta com a coluna analítica C18 (Phenomenex®, Gemini-NX, 150mm x 4,6mm x 5µm), no modo de fase reversa. Fases móveis com diferentes proporções da mistura água: acetonitrila foram empregadas variando-se a temperatura (30 a 45°C) e vazão (0,7 a 1,2 mL/min). Já o detector DAD operou a 324 nm pois neste comprimento de onda, observou-se uma região de maior absorvidade e seletividade para uma solução de BNZ na concentração de 100 µg/mL.

Dentre todas as condições experimentadas com a coluna acima citada, a fase móvel constituída de mistura de água ultrapura:acetonitrila (65:35, v/v) na vazão de 1 mL/min, temperatura de 40°C e tempo de corrida cromatográfica de 5 minutos, foi a eleita para o estudo (PERIN, 2017). Os cromatogramas obtidos das análises do BNZ em soro estão apresentados na figura 6.

Figura 6 - Cromatogramas referentes às análises do BNZ em soro canino.



(A) Soro branco; (B) Soro branco enriquecido com 5 µg de BNZ/mL; (C) Soro de cão após 6 h de administração de dose múltipla de 3,5 mg/Kg/12h de BNZ. Picos: 1- BNZ; 2- omeprazol (PI). O eixo X corresponde ao tempo de retenção dos analitos e o eixo Y corresponde ao sinal analítico.

Pode-se observar diferenças na composição e ou proporção da fase móvel utilizada, dimensões da coluna cromatográfica (comprimento) e vazão, mas em nenhum estudo foi utilizado o detector de arranjo de diodo. Davanço e cols (2014), avaliou BNZ em plasma de ratos empregado um sistema com um detector de UV-vis. A detecção ocorreu em 324 nm, a fase móvel era constituída de água ultrapura-acetonitrila (65:35) por eluição isocrática. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 0,55 mL / min, o volume de injeção foi de 1 µL e o tempo de execução foi de apenas 2 min e a coluna mantida a 45 ° C. Já Silva e cols (2012), realizaram a separação cromatográfica de BNZ e Itraconazol (ITC) em plasma de camundongos com a fase móvel constituída por uma mistura (60:40v/v) de acetonitrila e água ultrapura, bombeada isocraticamente a 1 mL / min. Os comprimentos de onda UV selecionados para quantificar BNZ e ITC foram de 324 e 263 nm, respectivamente, a uma temperatura de 40 °C e um volume de injeção de 25 µL. Perin e cols (2017), utilizaram fase móvel composta pela mistura de acetonitrila e água ultrapura (30:70 v/v), com fluxo de 1,0 mL/min, em temperatura de 40 °C, comprimento de onda

de 324 nm, volume de injeção de 20,0 µL utilizando soro de camundongos como matriz biológica.

Para estudos utilizando o plasma humano, Guerrero e cols (2010) utilizaram a fase móvel composta pela mistura de acetonitrila e água ultrapura (40:60 v/v), com fluxo de 0,9 mL/min, detecção em comprimento de onda de 324 nm e volume de injeção de 100 µL. Padró e cols (2012) em seu estudo utilizou fosfato tamponado contendo metanol (58:42; pH 2,70, 25 mM) com o fluxo 1 mL/min, detecção em comprimento de onda em 320 nm e volume de injeção com 5 µL, essa metodologia produziu melhorias significativas em relação aos métodos relatados anteriormente na literatura. Altched e cols (2014) realizou a análise de CLAE em plasma humano por eluição isocrática com uma taxa de fluxo de 1,0 ml / min com detecção de UV em 313 nm com a composição da fase móvel de tampão de glicina / acetonitrila (75 ± 25 v / v). No entanto, não existem métodos padronizados de CLAE- DAD propostos para uso rotineiro em estudos clínicos em cães, sabe-se que a especificidade da matriz é muito importante devido a potenciais interferências de metabólitos na detecção e quantização do fármaco.

5.2 Validação do método de análise do benznidazol em soro

A validação da metodologia analítica desenvolvida para este trabalho foi realizada de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para métodos bioanalíticos (RDC 27, ANVISA, 2012) e os resultados obtidos na validação do método de análise do BNZ em soro estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros de validação do método de análise do benznidazol em soro.

Parâmetro	BNZ
Efeito Matriz (CV%)	7,83
Linearidade (µg/mL)	0,1 – 100,00
Equação da reta	$y = 3,35643x - 0,01370$
Coefficiente de correlação linear	$r = 0,9999$
Limite de Quantificação (µg/mL)	0,1
Precisão Intercorridas (CV%)	
CQB (n=5)	4,54

CQM (n=5)	8,34
CQA (n=5)	5,35
Precisão Intra-Corridas (CV%)	
CQB (n=5)	5,18
CQM (n=5)	4,27
CQA (n=5)	3,63
Exatidão Intercorridas (EPR%)	
CQB (n=5)	3,47
CQM (n=5)	1,32
CQA (n=5)	5,26
Exatidão Intra-corrida (EPR%)	
CQB (n=5)	1,00
CQM (n=5)	0,96
CQA (n=5)	2,19

Controle da qualidade de alta concentração (CQA); Controle da qualidade de baixa concentração (CQB); Controle da qualidade de média concentração (CQM); Coeficiente de variação (CV) $[(\text{Desvio padrão}/\text{média}) \times 100]$; Erro Padrão Relativo (EPR)= $[(C_{\text{experimental}} - C_{\text{nominal}})/C_{\text{nominal}}] \times 100$.

O método não apresentou efeito matriz e os coeficientes de variação entre todos os FMNs foram inferiores a 15%.

As curvas de calibração construídas empregando as razões de áreas *versus* concentração apresentaram linearidade em um intervalo de 0,1-100 µg de BNZ /mL de soro com coeficientes de correlação linear superiores a 0,99.

Os coeficientes de variação e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de precisão e exatidão intra e intercorridas em soro (Tabelas 1) foram inferiores a 15%.

Os valores da recuperação do método de extração do BNZ (extração líquido-líquido) com acetonitrila foram de aproximadamente 72% para o BNZ. Não foi apresentado efeito residual de acordo com os procedimentos descritos.

E os testes de estabilidade estão dentro da variação permitida de 15 % para as amostras de CQB e CQA (Tabela 3).

Tabela 3 - Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e curta duração para as amostras CQB e CQA

Estabilidade	%Desvio
Pós 3 ciclos de congelamento e descongelamento	
CQB	0,5
CQA	8,55
Pós-processamento (24 horas)	
CQB	0,9
CQA	14,89
Curta duração (4 horas)	
CQB	0,3
CQA	12,32

Controle da qualidade de alta concentração (CQA); Controle da qualidade de baixa concentração (CQB); % desvio= porcentagem de desvio da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal ou $\% \text{ desvio} = [(C_{\text{experimental}} - C_{\text{nominal}}) / C_{\text{nominal}}] \times 100$.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que em menos de trinta anos passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para esse crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (TONHI *et al.*, 2009). A CLAE é definida como um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição entre duas fases. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante o desenvolvimento cromatográfico, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, resultando em migrações diferenciais destes componentes (MCMASTER, 1994). Vários métodos bioanalíticos que utilizam técnicas cromatográficas foram propostos para determinar as concentrações de BNZ em diversas matrizes biológicas como urina, leite e plasma animal e humano (GUERRERO *et al.*, 2010; PADRO *et al.*, 2012; PINAZO *et al.*, 2012; MARSÓN *et al.*, 2013; ALTCHER *et al.*, 2014; DAVANÇO *et al.*, 2014; DAVANÇO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2012; PERIN *et al.*, 2015).

Estes métodos foram desenvolvidos empregando a CLAE que opera com fase móvel líquida sob pressão e com métodos de detecção sensíveis possibilitando análises de rapidez comparável àquela obtida em cromatografia gasosa fornecendo resultados altamente satisfatórios.

A validação de métodos bioanalíticos aplicados a estudos farmacocinéticos ou para a quantificação, baseia-se na interpretação das diretrizes preconizada pela ANVISA que é fundamental para o estudo proposto. A cromatografia acoplada com arranjo de diodo aqui validado pode ser considerado um método inovador frente aos métodos pré-existentes.

O efeito matriz ocorre quando substâncias inerentes à matriz biológica coeluem com os compostos de interesse. Logo, as concentrações séricas observadas não sofreram nenhuma influência da matriz utilizada no estudo visto que todos os coeficientes de variação FMNs foram inferiores a 15% (Tabela 2). Assim, a seleção das condições de preparo de amostra na análise do BNZ em materiais biológicos é uma tarefa difícil e a otimização de preparo de amostra merece atenção especial levando em consideração a natureza do analito (MARTINEZ *et al*, 2015).

As curvas de calibração construídas empregando as razões de áreas *versus* concentração abrangem concentrações lineares do BNZ de 0,1-100 µg/mL de soro com coeficientes de correlação linear superiores a 0,99. O intervalo linear abrange todas as concentrações experimentadas. O método empregando CLAE-DAD mostra sensibilidade compatível com as exigências dos nossos estudos de farmacocinética.

Em relação ao limite de quantificação observado no estudo (0,1 µg/mL), é importante destacar que é o menor quando comparado aos demais. Apenas Davanço e cols (2015) apresentaram um valor próximo (0,156 µg/mL) utilizando uma metodologia Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) com vazão de 0,55mL/min e tempo de análise de 2 minutos. Deste modo, o método é mais sensível quando comparado com os dados disponíveis na literatura, sendo a menor concentração do analito de interesse na amostra, quantificada com valores aceitáveis de precisão e exatidão.

Os resultados obtidos para os coeficientes de variação e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de precisão e exatidão asseguram a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados, podendo assim, ser utilizado como método de referência para outros estudos que envolvam a quantificação do BNZ em soro.

5.3 Avaliação da farmacocinética pré-clínica

Com o intuito de compreender a cinética do BNZ em soro de cães infectados pela cepa Be-78 de *T. cruzi*, o nosso grupo de pesquisa propôs avaliar os parâmetros farmacocinéticos após o tratamento com regime de dose múltipla oral de 3,5mg/Kg/12h de BNZ.

Em 1980, Raaflaub realizou o primeiro estudo de farmacocinética do BNZ com doses múltiplas variando de 3 a 7mg/kg em pacientes Chagásicos crônicos e como resultados obteve que a meia-vida de eliminação do benznidazol variou entre 11,7 e 15,5 h entre os 8 indivíduos investigados. A maior concentração máxima ($C_{\text{máx}}$) foi de 16,4 µg/ml e a menor concentração (C_{min}) foi de 5,4 µg/ml demonstrando que todos os oito pacientes, durante o período do tratamento (10° a 30° dia), o fármaco apresentava as concentrações tripanocidas consideradas eficazes (3-6 µg/ml). Vale ressaltar que para o pesquisador não ocorria uma indução de enzimas microssomais com as doses de BNZ aplicadas em terapia humana. Mas, em 2012 Rigalli e cols demonstrou em células HepG2 (um tipo celular que com propriedades bioquímicas, morfológicas e funcionais dos hepatócitos humanos) que o benznidazol produziu um aumento na expressão (proteína e mRNA) da classe P-gp, MRP2 e para CYP3A4 exibiu uma diminuição da atividade. Ou seja, o tratamento dessas células com BNZ aumentou seu próprio efluxo, por meio de uma regulação positiva de P-gp. Modificações na atividade em proteínas de transporte e de biotransformação podem alterar a farmacocinética e a eficácia do benznidazol.

As concentrações séricas de BNZ avaliadas foram quantificadas até o último tempo de coleta planejado no protocolo, 12 horas após a administração de dose múltipla no regime proposto. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Concentração máxima ($C_{\text{máx}}$); Concentração Mínima (C_{min}); Concentração plasmática no estado de equilíbrio (C_{ss}); Tempo necessário para atingir a máxima concentração ($T_{\text{máx}}$); Área sobre a curva (AUC); Volume de distribuição no estado de equilíbrio (V_{dss}); Constante de velocidade de eliminação (K_{el}); Taxa de eliminação do fármaco (CL_{ss}); Flutuação que é a diferença entre concentração plasmática máxima e mínima comparada com a concentração plasmática média em um intervalo de 12h. Os parâmetros farmacocinéticos (Tabela 4) estão expressos como mediana (IQ25-75%).

Tabela 4 - Parâmetros farmacocinéticos do benznidazol administrado em dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h, por 60 dias, em cães SRD, nas fases aguda (n=6) e crônica (n=5) da infecção experimental pela cepa Be-78 de *T. cruzi*. Os valores estão expressos como mediana (IQ25-75%).

Parâmetro (unidade)	Infectados	
	Fase aguda	Fase crônica
C_{max} (µg/mL)	10,55 (8,37 – 12,20) °	17,97 (16,08 – 23,11)
C_{ss} (µg/mL)	7,08 (6,18 – 8,32) °	12,56 (10,26 – 16,37)
C_{min} (µg/mL)	4,32 (2,77 – 5,72) °	8,25 (4,48 – 11,68)
T_{max} (h)	2,50 (2,00 – 4,00)	3,00 (2,00 – 6,00)
AUC₀₋₁₂ (µg.h/mL)	84,98 (74,20 – 99,92) °	150,76 (123,07 – 196,56)
V_{dss} (L)	13,92 (10,80 – 20,36) °	9,20 (6,04 – 10,93)
CL_{ss} (L/h)	0,99 (0,84 – 1,13) °	0,56 (0,43 – 0,68)
K_{el} (h⁻¹)	0,07 (0,05 – 0,09)	0,08 (0,05 – 0,10)
t_{1/2el} (h)	10,30 (7,83 – 15,38)	9,09 (7,19 – 15,22)
Flutuação (%)	92,26	81,84

°Infectados (fase aguda) x infectados (fase crônica): diferença dos parâmetros entre os grupos citados (p<0,05).

Os animais infectados e tratados na fase aguda e na crônica apresentaram um C_{máx} que é o pico plasmático, o qual representa a concentração máxima de 10,55 µg/mL e 17,97 µg/mL respectivamente. Já o seu oposto, C_{min} que é a mínima concentração alcançada por um fármaco antes da administração de uma segunda dose foi de 4,32 µg/mL para os animais na fase aguda e 8,25 µg/mL para os animais da fase crônica. O parâmetro C_{ss} que é o ponto em que a taxa de eliminação do fármaco é igual à taxa de biodisponibilidade, ou seja, encontra-se em concentração constante (estado de equilíbrio) apresentou um valor de 7,08 µg/mL para os animais que compõe a fase aguda e 12,56 µg/mL para os animais que compõe a fase crônica. O tempo necessário para atingir a máxima concentração (T_{máx}) foi bem similar entre os grupos com 2,50 h para os animais da fase aguda e de 3h para os animais da fase crônica. Os grupos apresentaram uma área sobre a curva de 84,98 e 150,76 µg.h/mL, valores referentes aos animais de fase aguda e crônica respectivamente, esse parâmetro indica qual representa a medida fiel da quantidade da droga que penetrou o sangue. O V_{dss} corresponde ao volume de distribuição no estado de equilíbrio e foi de

13,92 (fase aguda) e 9,20L (Fase crônica). O CLss foi de 0,99 (fase aguda) e 0,56L/h (fase crônica). A constante de velocidade de eliminação foi bastante similar com resultados de 0,07 e 0,08 h⁻¹ enquanto que o tempo necessário para eliminar 50% do fármaco foi de 10,30 e 9,09h. Nota-se que os primeiros valores são referentes a fase aguda enquanto o segundo valores são referentes a fase crônica. A flutuação observada foi de 92.26 % para o grupo dos animais presentes na fase aguda da doença e 81,84% para o grupo na fase crônica sendo esse parâmetro a diferença entre concentração plasmática máxima emínima comparada com a concentração plasmática média em um intervalo de 12h. Como pode ser observado, a infecção crônica pela cepa Be-78 de *T. cruzi* aumentou os valores de C_{máx} (10,55 vs 17.97), C_{ss} (7.08 vs 12.56), C_{min} (4.32 vs 8.25) AUC (84.98 vs 150.76) e ainda reduz os valores de V_{dss} (13.92 vs 9.20) e CLss (0.99 vs 0.56) quando comparados com os animais na fase aguda, inferindo alterações na farmacocinética do BNZ.

Durante um processo farmacocinético, primeiramente o fármaco é absorvido e essa etapa corresponde a transferência do fármaco do seu local de administração para a corrente sanguínea. Os parâmetros C_{máx} (10,55 vs 17,97) e C_{min} (4,32 vs 8,25) AUC₀₋₁₂ (84,98 vs 150,76), C_{ss} (7,08 vs 12,56), dos animais presentes na fase crônica apresenta valores superiores quando comparados com os animais da fase aguda. Esses resultados velocidade de absorção do BNZ varia de acordo com a fase da doença.

Na corrente sanguínea, temos a disponibilidade do fármaco. Na fase aguda, notamos que o parâmetro C_{ss} 7,08 µg/mL está acima do necessário para atingir concentrações antiparasitárias, justificando a eficácia do medicamento nesta fase da doença. Após a absorção o fármaco é distribuído. O fármaco sai da corrente sanguínea e migra para as células dos tecidos. Na fase crônica da doença de chagas em cães, o parâmetro V_{dss} (13,92 vs 9,20 L) é inferior quando comparado aos animais de fase aguda. Considerando que na fase crônica da doença o parasito se encontra predominantemente nos tecidos, esse dado contribui para o entendimento da baixa eficácia terapêutica nessa fase da doença.

Decorrido o tempo de sua ação, o fármaco será eliminado do organismo. Notamos que a infecção crônica reduz o parâmetro Clss de (0,99 vs 0,56 L/h).

Observa-se que a infecção crônica pela cepa Be-78 de *T. cruzi* promove alterações significativas nos parâmetros farmacocinéticos do BNZ no modelo canino. Faz-se

necessário levar em consideração essas modificações para próximos estudos de formulações que envolvam o BNZ.

Suponha-se que a interação entre o parasito e hospedeiro durante as diferentes fases da doença estabele um perfil de inflamatório diferente. Já é sabido que determinada citocinas têm a capacidade de alterar a atividade e expressão de proteínas de transporte e enzimas de metabolismo. Faz-se necessário a realização de outros estudos para compreender melhor o que pode levar o perfil cinético diferenciado do benznidazol na fase aguda e crônica da doença de Chagas

O nosso grupo já havia observado que a infecção crônica promovia alterações nos parâmetros farmacocinéticos no modelo murino. De Jesus e cols (2021) propôs observar o perfil cinético do BNZ em camundongos infectados pela cepa Be-78 de *T.cruzi* na fase crônica da doença. Houve um aumento dos valores da constante de taxa de absorção (K_a) (3,92 versus 1,82 h^{-1}), volume aparente de distribuição (V/F) (0,089 versus 0,036 litros) e depuração aparente (CL/F) (0,030 versus 0,011 litros / h) e reduziu os valores do tempo para a concentração máxima de fármaco no soro (T_{max}) (0,67 versus 1,17 h) e meia-vida de absorção ($t_{1/2a}$) (0,18 versus 0,38 h) quando comparados com os dados obtidos para animais sadios inferindo alterações nos processos de absorção, distribuição e eliminação do BNZ.

Morilla e cols (2005) na tentativa de realizar um comparativo entre o BNZ vs o BNZ a lipossoma em ratos, utilizando um tratamento com uma dose única de 0,2 mg/kg pela via intravenosa, o BNZ sozinho promovia um C_{max} de 1,64 mg/mL, T_{max} de 0,5 h, com uma área sob a curva de 9,16 mg.h/mL; O volume de distribuição de 102 mL/Kg e um clearance 21,9 mL/h.Kg. Com o mesmo intuito, Moreira e cols (2012) investigaram o BNZ sozinho e associado ao Itraconazol e observaram que camundongos Swiss, tratados oralmente com 5 mg de BNZ isolado possuiu um C_{max} de 151,3 $\mu g/Kg$; T_{max} de 2,2 h; $T_{1/2}$ de 1,64 h; CL/F 416,74 mL/h.Kg e Vd/F de 2.112,33 mL/Kg. Utilizando do mesmo modelo animal, porém com 30 dias de tratamento e uma dose de 100 mg/kg de BNZ, Perin e cols (2017) quantificaram um valor de C_{max} de 41,61 $\mu g/mL$; T_{max} de 0,83 h; $T_{1/2}$ de 2,03 h; CL/F de 13,29 mL/h e Vd/F de 38,81 mL. Por sua vez, Leonardi e cols (2013) com o objetivo de avaliar o BNZ sozinho e aliado as ciclodextrinas ao tratarem ratos com dose de 10 mg/kg por via oral relataram um C_{max} de 665,2 ng/mL; T_{max} de 2 h; ASC de 455,7 ng.h/mL do BNZ sozinho.

Portanto, podemos resumir que os dados de dose múltipla oral do BNZ têm a

capacidade de alcançar as concentrações plasmáticas máximas em um curto período de tempo, os dados sugerem que há uma absorção rápida. O BNZ mostrou ser altamente distribuído pelo organismo. Uma vez, que apresentou valores altos no parâmetro do volume de distribuição (PERIN,2019).

Existe na literatura alguns dados acerca da farmacocinética do BNZ, nota-se que os experimentos pré-clínicos apresentam grandes variações nos parâmetros farmacocinéticos, variações na dose utilizada, via de administração, modelo experimental. Portanto, faz-se necessários escolha de um modelo animal que apresente valores que mais se aproxime do homo sapiens.

Com o objetivo de fornecer uma base de dados para a estimativa das doses necessárias do benznidazol para uma quimiossensibilização no homem, em 1984 Workman e cols realizaram estudos de farmacocinética do BNZ em cães com as doses de 25 e 50 mg/kg pela via oral observou um $C_{m\acute{a}x}$ entre 38,9-59,8 $\mu\text{g/mL}$; $T_{m\acute{a}x}$ entre 3-5h; $T_{1/2}$ entre 6-10 h e ligação às proteínas de 52-59%.

É sabido que o cão consegue reproduzir ambas as fases da infecção (ANDRADE, 1984; LANA *et al.*, 1991; GUEDES *et al.*, 2010) por causa das semelhanças e evolução filogenética aproximada aos humanos. Pesquisadores demonstraram que o cão é um bom modelo animal para estudar a quimioterapia da DCh com base nos testes sorológicos, na avaliação da função cardíaca (eletrocardiograma) na lesão, exame parasitológico e avaliação pós-tratamento (CALDAS *et al.*, 2013, CUNHA *et al.*, 2019).

A farmacocinética é um campo que visa explicar a absorção, distribuição e eliminação de um fármaco na corrente sanguínea. Apresenta como principal objetivo garantir que as doses administradas estejam dentro da janela terapêutica. Este processo é apoiado em princípios farmacocinéticos que promovem uma utilização mais racional do medicamento (WIENS, *et al* 2016; ICTQ). Esses resultados, podem auxiliar numa melhor compreensão acerca da farmacocinética do BNZ, bem como na determinação adequada e/ou ajustes na posologia, na compreensão da ação dos fármacos, nas novas formulações. Além de contribuir no delineamento de uma farmacoterapia mais racional para a doença de Chagas envolvendo o BNZ.

6. CONCLUSÕES

O método de análise do benznidazol em soro empregando CLAE-DAD validado neste trabalho apresenta limites de confiança compatíveis com a aplicação em estudos de disposição cinética do benznidazol em cães experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*.

A infecção crônica experimental pela cepa Berenice-78 do *T. cruzi* promove alterações significativas nos parâmetros farmacocinéticos elevando os valores de C_{max} , C_{ss} , C_{min} e AUC 0-12 e reduzindo V_{dss} e CL_{ss} quando comparados com cães na fase aguda da doença.

7. ANEXO 1



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-I, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone: (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
E-mail: ceua@ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2017/38, intitulado "Influência da doença de Chagas na atividade das enzimas do sistema citocromo P450, das proteínas de transporte e na farmacocinética e biodistribuição do benznidazol no modelo cão.", que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a) **Claudia Martins Carneiro**, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP - CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Cão / SRD	18	04-10 meses	Macho	CCA/UFOP
Cão / SRD	18	04-10 meses	Fêmea	CCA/UFOP

Restrição de dieta: (X) sim () não

Especificar a dieta:

Este Certificado expira em: 01/02/2019

Ouro Preto, 6 de setembro de 2017.

Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da CEUA/UFOP.

8. REFERÊNCIAS

ALBAREDA, María Cecilia; *et al.* Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. **International Immunology**, v. 18, n. 3, p. 465–471, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16431876/>>. Acesso em: 6 Mar. 2021.

ALTCHEH, J. *et al.* Population pharmacokinetic study of benznidazole in pediatric Chagas disease suggests efficacy despite lower plasma concentrations than in adults. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2907, 2014

ALEJANDRO M. HASSLOCHER MORENO. Laboratório de Pesquisa Clínica em Doenças de Chagas/ Instituto Nacional de Infectologia Evando Chagas/fiocruz (org.). **Mecanismos de transmissão**: mecanismos de transmissão da doença de chagas. Mecanismos de transmissão da doença de Chagas. 2017. Portal da Doença de Chagas. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/transmissao/>. Acesso em: 01 mar. 2021.

ALONSO-PADILLA, J. *et al.* Strategies to enhance access to diagnosis and treatment for Chagas disease patients in Latin America. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 17, n. 3, p. 145–157, mar. 2019.

A doença de Chagas ainda existe: SBAC. Disponível em: <<https://www.sbac.org.br/blog/2018/04/16/a-doenca-de-chagas-ainda-existe/>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

BANDEIRA, Lorena Cera. INFLUÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS NA FARMACOCINÉTICA DO BENZNIDAZOL NO MODELO CÃO. Orientador: Prof^a. Dr^a. Cláudia Martins Carneiro. 2022. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia - **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/NUPEB**, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2022.

BERN, Caryn. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2527–2534, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21714649/>>. Acesso em: 4 Mar. 2021.

BESTETTI, Reinaldo B. ; RESTINI, Carolina Baraldi A. Precordial chest pain in patients with chronic Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, v. 176, n. 2, p. 309–314, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25127335/>>. Acesso em: 01 mar. 2023.

BULA – Benznidazol Disponível em: <https://www.lafepe.pe.gov.br/wp-content/uploads/2018/08/benznidazol_bula_profissional_bilingue.pdf>.

Boletim Epidemiológico. 2020 Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/wp-content/uploads/2021/11/Boletim-epidemiologico-2020.pdf>>.

Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. Disponível em:

<https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222016000500007>.

Acesso em: 13 mar. 2021.

Brener Z. Terapêutica experimental na doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade Z, BarraL-Neto M (eds.). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2.^a ed. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan** Ed.p. 379-388. 2000.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2^a ed. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2000, 431 p

CALDAS, I. S. *et al.* Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitology Research**, v. 103, n. 2, p. 413–421, jul. 2008.

CALDAS, I. S.; SANTOS, E. G.; NOVAES, R. D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 15, p. 1797–1807, 13 out. 2019.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29–37, fev. 2002.

CANÇADO, J. R. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benznidazole. In: Brener Z, Andadre ZA, Barral-Neto M (Eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, p.389-405. 2000.

CASTRO. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 1, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3151755/>>. Acesso em: 01 mar. 2023.

Carlos Chagas. ICC – **Instituto Carlos Chagas**. Disponível em: <<https://www.icc.fiocruz.br/carlos-chagas-3/>>. Acesso em: 2 fev. 2023.

CDC - DPDx - American Trypanosomiasis. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/>>. Acesso em: 12 set. 2022.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, jan. 2002.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113–122, out. 2007.

COLLINS, C.H, BRAGA G. L, BONATO P.S, *Fundamentos de cromatografia*, Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.

COUTINHO, M.; DIAS, J. C. P. A DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 2, p. 11–51, 1 jan. 1999.

CUNHA, Lucas Maciel; *et al.* Benznidazole, itraconazole and their combination in the treatment of acute experimental chagas disease in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 204, p. 107711, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489419300335>>. Acesso em: 3 dez. 2022

DA SILVA, Alison Pontes; *et al.* **PERFIL DOS REGISTROS HOSPITALARES EM DECORRÊNCIA DE DOENÇA DE CHAGAS NA REGIÃO NORDESTE, BRASIL, 2008-2018.** [s.l.], [s.d.]. Disponível em: <http://www.editorarealize.com.br/editora/anais/conapesc/2019/TRABALHO_EV126_MD4_SA10_ID1204_31072019230536.pdf>. Acesso em: 15 Mar. 2021.

DAVANÇO, M. G. farmacocinética do benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada. p. 153, [s.d.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” **FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS CAMPUS DE ARARAQUARA.** [s.l.: s.n., s.d.]. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/132571/000856204.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 01mar. 2023.

DAVANÇO, M. G.; DE CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G. Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: application in a preclinical pharmacokinetic study. **Biomedical chromatography: BMC**, v. 29, n. 7, p. 1008–1015, jul. 2015.

Doença de Chagas. Agência Fiocruz de Notícias. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>>. Acesso em: 13 Mar. 2021.

DIAS, JCP., and COURA, JR., org. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: Editora **FIOCRUZ**, 1997. 486 p. ISBN 85-85676- 31-0. Available from SciELO Books

DIAS, João Carlos Pinto; *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222016000500007>. Acesso em: 13 Mar. 2021.

DE LANA, M. *et al.* Experimental Chagas’ disease in dogs. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 87, n. 1, p. 59–71, 1992. DE LANA, M. Experimental studies of Chagas disease in animal models. **Telleria J and Tibayrenc M (Org).** American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. 2ed. Oxford: Ed. ELSEVIER 2017; p. 299-314, 2017. doi: 10.1016/B978- 0-12-801029-7.00014-9

DNDi – Drugs for Neglected Diseases Initiative. Disponível em: <<https://dndi.org/>>

Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção. Disponível em:

<<https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 16 mar. 2021.

Doença de Chagas. Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/d/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 3 Mar. 2021.

EMA. 2011. Guideline on Bioanalytical Method Validation. (EMA/CHMP/EWP/192217/2009). London, UK: EMA. EMA, Bioanalytical method validation - European Medicines Agency, European Medicines Agency, disponível em: , acesso em: jun. 2022.

FILARDI, L.S. ; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of Trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3130683/>>. Acesso em: 01 mar. 2023.

Encontrado indício mais antigo da doença de Chagas no Brasil. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/encontrado-ind%C3%ADcio-mais-antigo-da-doen%C3%A7a-de-chagas-no-brasil>>. Acesso em: 30 fev. 2023.

GARCIA, S. *et al.* Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1521–1528, abr. 2005.

Garcia; DE MAGALHÃES, Carlos; *et al.* **607 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS NO BRASIL E GASTOS FEDERAIS COM MEDICAMENTOS.** 2011, [s.l.: s.n., s.d.]. Disponível em: <https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/1577/1/td_1607.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2022.

GUARNER, Jeannette. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 164–169, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31006555/>>. Acesso em: 01 mar. 2023.

GUEDES, P. M. DA M. *et al.* The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. **Acta Tropica**, v. 84, n. 1, p. 9–17, 1 out. 2002.

GUERRERO, L *et al.* A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 49, Issue 1, p. 77–82, Nov 2010.

ICTQ - **Farmacocinética Clínica e Farmacodinâmica.** Disponível em: <<https://ictq.com.br/varejo-farmaceutico/838-farmacocinetica-clinica-e-farmacodinamica>>. Acesso em: 26 set. 2022.

JANSEN, Ana Maria *et al.* A Ecologia e a Complexidade dos Ciclos de Transmissão do Trypanosoma cruzi na Natureza. In: ARAÚJO-JORGE, Tania C. de *et al.* **Doença de Chagas: manual para experimentação animal.** 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2000. Cap.3. p. 33-38.

Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/cdbjg/pdf/araujo-9788575413937.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2022

LAFEPE, BENZNIDAZOL. Responsável técnico: Leduar Guedes de Lima. Recife: LAFEPE Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, 2013. Bula de Remédio

Lafepe produzirá remédio para crianças portadoras do Mal de Chagas | Lafepe. , [s.d.]. Disponível em: <<https://www.lafepe.pe.gov.br/noticias/lafepe-produzira-remedio-para-criancas-portadoras-do-mal-de-chagas>>. Acesso em: 18 mar. 2021

LEE, Bruce Y; BACON, Kristina M; BOTTAZZI, Maria Elena; et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 342–348, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23395248/>>. Acesso em: 01 mar. 2023.

LEONARDI, D.; BOMBARDIERE, M.E. ; SALOMON, C.J. Effects of benznidazole:cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 543–548, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24120966/>>. Acesso em: 26 mar. 2023.

LESLIE, Raphael; DE, Moura; FERRAZ **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO IN VITRO DE DRUG DELIVERY SYSTEM pH-DEPENDENTE À BASE DE BENZNIDAZOL E ZIF-8 VISANDO A OBTENÇÃO DE UMA TERAPIA ALTERNATIVA PARA A DOENÇA DE CHAGAS.** [s.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/23771/4/TESE%20Leslie%20Raphael%20de%20Moura%20Ferraz.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

LIDANI, K. C. F. et al. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Frontiers in Public Health**, v. 7, 2019.

LIMA, R. DE S.; TEIXEIRA, A. B.; LIMA, V. L. DA S. Doença de chagas: uma atualização bibliográfica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 51, n. 2, 2019.

LOZANO, V. F. Avaliação da atividade antiparasitária e efeito sinérgico de compostos cumarínicos comparados ao benznidazol em duas cepas de *Trypanosoma cruzi*. São Paulo. Dissertação. **Universidade Bandeirantes de São Paulo**. 2011. Disponível em: <<https://repositorio.pgskroton.com/bitstream/123456789/3389/1/VALQUIRIA%20FERRAZZI%20LOZANO.pdf>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

LUZ, Paola Rosa. Associação do polimorfismo gênico da lectina ligante de manose e da ficolina-2 na doença de chagas crônicas. **Ufpr.br**, 2020. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/30044?show=full>>. Acesso em: 06 set. 2022.

MACHADO-DE-ASSIS, G. F. *et al.* A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years

after intervention. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 873–880, nov. 2013. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/mioc/a/sGFwgrnG9FVwnKTYWJmRXbv/?lang=en>>. Acesso em: 26 mar. 2023.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human–host interactions. **The Lancet Microbe**, v. 3, n. 9, p. e711–e722, set. 2022. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lanmic/article/PIIS2666-5247\(21\)00265-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanmic/article/PIIS2666-5247(21)00265-2/fulltext)>. Acesso em: 06 mar. 2023.

MALAFIA, G. A importância do encorajamento de estudos sobre as doenças tropicais negligenciadas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 609–610, out. 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/QjQMpqmV3ZNDSDW6PjR4dsC/?lang=pt>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

MARIN-NETO, J. A. et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 319–324, jul. 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/mioc/a/c5NrCHc6bMd9BX6qyc3k5zM/?lang=en>>. Acesso em: 26 mar. 2023.

MASSARO, Débora Cristina; REZENDE, Denise Silva ; CAMARGO, Luis Marcelo Aranha. Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 2, p. 228–240, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbepid/a/SmB4WbhhpZ8VpGtpSwqFHVz/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

MAXIMIANO, F.P.; COSTA, G.Y.C.; SOUZA, J.; CUNHA-FILHO, M.S.S. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Química Nova**, v. 25, p. 1-6, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/Ypjm8vWyyBV8CnLf3wnSLBc/?lang=pt>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

MELO, L. H. P. DE. Novas estratégias para o tratamento da doença de Chagas com benznidazol : eficácia, farmacocinética, farmacocinética populacional e relação farmacocinética/farmacodinâmica no modelo camundongo. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. **Boletim Epidemiológico** [Internet]. 2020 abr 17; 51(n.esp.):1-43. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Doença de Chagas: Textos de apoio. Brasília: **Ministério da Saúde**. Sucam, 1989. 52p. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/22doenca_chagas.pdf>.

Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO - RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012. Disponível em:

<https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em: 26 jul. 2022.

Ministério da Saúde. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html>. Acesso em: 27 set. 2022.

MOLINA, I. *et al.* Pharmacokinetics of Benznidazole in Healthy Volunteers and Implications in Future Clinical Trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 24 mar. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5365666/>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

Novo consenso para tratamento de pacientes com Chagas | DNDi América Latina. Disponível em: <<https://www.dndial.org/2016/comunicacao-e-informacao/press-releases/consensochagasbrasil2016/>>. Acesso em: 13 mar. 2021.

NGUYEN, Tina; MUHAMMAD WASEEM. **Chagas Disease**. Nih.gov. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459272/>>. Acesso em: 16 Mar. 2021.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: editora Atheneu. 2005. p. 85-108.

NUNES, M. C. P. *et al.* Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v. 138, n. 12, 2018. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000599>>. Acesso em: 01 Mar. 2021.

OLIVEIRA, J. P. D.; MARGIOTO, A. P. tratamento etiológico da doença de chagas: um antigo problema de saúde pública. **Uningá Review**, v. 20, n. 2, p. 6, 2014. Disponível em: <<https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/1580>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

PADRÓ, J.M.; MARSÓN, M.E.; MASTRANTONIO, G.E.; *et al.* Development of an ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of nifurtimox and benznidazole in human plasma. **Talanta**, v. 107, p. 95–102, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914013000027?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 jan. 2023.

Paediatric Benznidazole | DNDi. Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). Disponível em: <<https://dndi.org/research-development/portfolio/paediatric-benznidazole/>>. Acesso em: 18 Mar. 2021.

PEREIRA, Karen Signori; SCHMIDT, Flávio Luis; GUARALDO, Ana M.A.; *et al.* Chagas' Disease as a Foodborne Illness. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 441–446, 2009.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19350996/>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

PÉREZ-MOLINA, J. A. *et al.* Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1139–1147, dez. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19819909/>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

PERIN, Luísa; *et al.* Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Benznidazole after Oral Administration in Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28167558/>>. Acesso em: 6 Mar. 2021

PERIN, L. *et al.* Population pharmacokinetics and biodistribution of benznidazole in mice, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 8, p. 2213-21, 2020.. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32356873/>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

PONTES, V. M. O. DE *et al.* Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 182–187, abr. 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/QGmDg4hKLq5nDvTdcSSf59z/?lang=pt>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

Portal Chagas. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/consenso-nacional-propoe-ampliar-tratamento-para-pacientes-com-doenca-de-chagas/>>. Acesso em: 13 mar. 2021.

Portal da Doença de Chagas - Fisiologia –. Fiocruz.br. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/vetor/fisiologia/>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

Portal Chagas. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/ecologia/biogeografia/>>. Acesso em: 7 set. 2022.

Portal Chagas. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/patogenia/>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

Portal da Doença de Chagas. CONSENSO NACIONAL PROPÕE AMPLIAR TRATAMENTO PARA PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS –. 2016, [s.d.]. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/blog/consenso-nacional-propoe-ampliar-tratamento-para-pacientes-com-doenca-de-chagas/>>. Acesso em: 02 ago. 2022

RAAFLAUB, J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung*, v. 30, n. 12, p. 2192-2194, 1980. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6783051/>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W. H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung*, v. 29, p. 1611-1614, 1979. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/583230/>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

RAJÃO, M. A. *et al.* Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309–321, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24347026/>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, abr. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20399979/>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

RIGALLI, J. P. *et al.* Regulation of Biotransformation Systems and ABC Transporters by Benznidazole in HepG2 Cells: Involvement of Pregnane X-Receptor. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3521711/>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

RODRIGUES, Dirceu. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul** Insuficiência Cardíaca na Doença de Chaga; - Ano XIII, nº 03, 2004, [s.d.]. Disponível em: <<http://sociedades.cardiol.br/sbc-rs/revista/2005/04/artigo07.pdf>>.

ROMANHA, A. J. *et al.* Experimental Chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* Infection: Essential Role of Endogenous Interferon- γ in Mediating Parasitologic Cure. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 6, p. 823–828, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article/186/6/823/2191273>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583–588, dez. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17049308/>>. Acesso em: 06 mar. 2023.

Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Boletim Epidemiológico Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-especial-de-doenca-de-chagas-numero-especial-abril-de-2022>>.

SIMÕES, M. V. *et al.* Chagas Disease Cardiomyopathy. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 2, p. 173–189, abr. 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/ijcs/a/X6TQyt7tnM7cQn5SLVTnYpz/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 2 fev. 2023.

SOARES SOBRINHO, J. L. *et al.* Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, 28 set. 2007. Disponível em: <<https://revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/1783>>. Acesso em: 2 fev. 2023.

SOY, D. *et al.* Population pharmacokinetics of benznidazole in adult patients with Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3342–3349, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4432184/>>. Acesso em: 2 fev. 2023.

TAFURI, W. *et al.* O cão como modelo experimental para o estudo da história natural da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, p. 77–77, 1 jun. 1988. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-76371?src=similardocs>>. Acesso em: 01 fev. 2023.

TONHI, E.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(dimethylsiloxane) immobilized on silica. *J. Chromatogr. A*, v. 1075, p. 87–94, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.110>

URBINA, Julio. Chemotherapy of Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 287–295, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11860367/>>. Acesso em: 2 fev. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Integrating Neglected Tropical Diseases into Global Health and Development: Fourth WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Geneva: World health organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO; 2017 **Who.int**, 2017. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/255011>>. Acesso em: 10 set. 2022.

WORKMAN, P; WHITE, R A; WALTON, M I; *et al.* Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. **British Journal of Cancer**, v. 50, n. 3, p. 291–303, 1984. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1976805/>>. Acesso em: 6 Mar. 2021.

WHO- Chagas disease. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 13 mar. 2021.

WHO Model Lists of Essential Medicines. Who.int. Disponível em: <<https://www.who.int/groups/expert-committee-on-selection-and-use-of-essential-medicines/essential-medicines-lists>>. Acesso em: 18 Mar. 2021.

WIENS, Matthew O.; KANTERS, Steve; MILLS, Edward; *et al.* Systematic Review and Meta-analysis of the Pharmacokinetics of Benznidazole in the Treatment of Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7035–7042, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5118981/>>. Acesso em: 2 fev. 2023.