



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Escola de Farmácia

Departamento de Análises Clínicas

Laboratório de Imunopatologia



BEATRIZ OLIVEIRA PAIVA

Quantificação tecidual do anti-chagásico benznidazol: aspectos regulatórios e técnicos no desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica

Ouro Preto - MG

2023

BEATRIZ OLIVEIRA PAIVA

Quantificação tecidual do anti-chagásico benznidazol: aspectos regulatórios e técnicos no desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica

Monografia apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto como requisito da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (TCC007) para obtenção do título de Bacharel em Farmácia pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Área de concentração: Farmácia

Orientadora: Prof^a Dr^a Cláudia Martins Carneiro

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lorena Cera Bandeira

Ouro Preto

2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P149q Paiva, Beatriz Oliveira.

Quantificação tecidual do anti-chagásico benznidazol [manuscrito]:
aspectos regulatórios e técnicos no desenvolvimento de uma
metodologia bioanalítica. / Beatriz Oliveira Paiva. - 2023.
37 f.: il.: color.. + Quadros 1 e 2.

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

1. Chagas, doença de. 2. Antiparasitários. 3. Farmacocinética. I.
Carneiro, Claudia 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

Beatriz Oliveira Paiva,

“Quantificação tecidual do anti-chagásico benznidazol: aspectos regulatórios e técnicos no desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica”

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

Aprovada em 30 de agosto de 2023.

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

Doutoranda Viviane Flores Xavier - Examinadora - Universidade Federal de Ouro Preto

Dr. Guilherme de Paula Costa - Examinador - 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 11/09/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Martins Carneiro, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 11/09/2023, às 20:53, 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 **0587848** e o código CRC **5AFC487C**.

DEDICATÓRIA

Para vovô Érico, com amor.

Ouro Preto era seu lugar favorito no mundo. Gostaria de poder compartilhar mais histórias dessa cidade tão especial com você.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Ruth Maria. Não há palavras para descrever o quanto lhe admiro e como me sinto protegida ao saber que está ao meu lado. Você é como uma fortaleza para mim e para Baba.

À minha irmã Bárbara por acreditar em mim e por ser minha maior motivadora e motivação. Obrigada por ter topado entrar nessa jornada maluca comigo em 2016, tenho certeza que estaremos juntas em muitas mais.

Ao meu pai Flávio, você é uma inspiração para mim. Tenho orgulho de ser sua filha e, num futuro muito muito próximo, colega de profissão.

Aos meus queridos avós, Érico (*in memoriam*), Ruth, José e Maria Célia. Obrigada pelos ensinamentos e pelo carinho, cuidado e aconchego sempre que precisei. Eu não poderia ter exemplos melhores.

Agradeço aos meus familiares, em especial meus tios Henrique e Eduardo e minhas tias Márcia e Juliana. O apoio de vocês foi fundamental para que eu conseguisse chegar até aqui.

Mais especial ainda, à minha tia Betinha. Com você conheci o amor mais puro que se pode ter.

Agradeço imensamente às três cientistas que fizeram com que eu me apaixonasse pela pesquisa: Cláudia, Lorena e Luísa! Mulheres como vocês movem o mundo e inspiram garotas como a Beatriz do primeiro período de Farmácia.

Aos colegas do Laboratório de Imunopatologia e do Laboratório de Morfopatologia, com vocês aprendi tanto. Tenho admiração por cada um de vocês. Em meio ao trabalho árduo fiz grandes amigos que irei levar para toda a vida, em especial João Vitor, Luciana e Suzana.

À Thais Fernanda, a melhor parceira de laboratório que eu poderia ter. Nossa amizade e companheirismo fizeram com que as horas de trabalho se tornassem puro lazer.

Agradeço às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo custeio deste projeto.

Aos amigos aspirantes a farmacêuticos, em especial Lorena, Mariana, Renata e Vinícius. Vocês tornaram as aulas e as infinitas horas de estudos prazerosas. Vou levá-los comigo para toda vida.

Ao meu melhor amigo, Amaro. Mesmo sem saber absolutamente nada sobre doença de Chagas ou farmacocinética, sempre foi um dos meus maiores fãs.

Por fim, ao lugar que me ensinou tanto e que me transformou na mulher que sou hoje, minha república Poucas & Boas. Vocês foram minha base durante todos esses anos em Ouro Preto. Agradeço pelos incontáveis momentos incríveis que passei ao lado de tantas mulheres maravilhosas.

Amo demais todos vocês.

RESUMO

Quantificação tecidual do anti-chagásico benznidazol: aspectos regulatórios e técnicos no desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica

O benznidazol (BNZ) é o único recurso disponível para o tratamento da doença de Chagas no Brasil. Apesar de ser utilizado desde a década de 1970, existem poucos estudos sobre a biodistribuição deste fármaco. É sugerido que sua variável eficácia na fase crônica se deva ao fato de apresentar limitada penetração tecidual. O presente estudo propõe discutir aspectos regulatórios e técnicos essenciais para o desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica para quantificar o anti-chagásico benznidazol em amostras de matrizes biológicas caninas, já que, até então, não há registro de desenvolvimento ou validação de um método para análise de tecido de cães. Para tal, pesquisou-se, em literatura, estudos que descreviam técnicas de extração, separação e análise de BNZ em material biológico e comparou-se os critérios de validação preconizados pelas agências regulatórias do Brasil, Estados Unidos e Europa (Anvisa, FDA e EMA, respectivamente). Finalmente, foram selecionadas condições iniciais de extração e cromatográficas adequadas para o desenvolvimento do método bioanalítico de análise de biodistribuição do benznidazol. A técnica de extração mais recomendada foi a extração líquido-líquido: é simples, rápida, de baixo custo e possui boa recuperação, precisão e exatidão. A separação foi realizada pelo método cromatográfico CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) com detector de arranjo de diodos (DAD) no comprimento de onda de 324 nm. As soluções reagentes e as condições iniciais selecionadas para desenvolvimento do método foram: a acetonitrila (ACN) é ideal para ser usada tanto como solvente extrator quanto para fazer parte da fase móvel, em uma composição 30:70 de ACN:água; o volume de injeção foi de 20 µL, com vazão de 1,0 mL/min, utilizando coluna cromatográfica e pré-coluna C18; como padrão interno foi selecionado o fármaco omeprazol; as análises foram realizadas à temperatura de 40 °C.

Palavras-chave: doença de Chagas, benznidazol, farmacocinética, biodistribuição, desenvolvimento, validação, método bioanalítico.

ABSTRACT

Tissue quantification of the anti-chagasic drug benznidazole: regulatory and technical aspects in the development of a bioanalytical methodology

Benznidazole (BNZ) is the only resource available for Chagas disease's treatment in Brazil. Despite being used since the 1970s, there are few studies on the biodistribution of this drug. It is suggested that its variable effectiveness in the chronic phase is due to its limited tissue penetration. The present study proposes to discuss essential regulatory and technical aspects for the development of a bioanalytical methodology to quantify the anti-chagasic agent benznidazole in biological matrices' samples of dogs, since, until then, there is no record of development or validation of a method for canine tissue analysis. With this purpose, it was researched in literature for studies describing extraction, separation and analysis techniques for BNZ in biological material and compared some validation criteria recommended by regulatory agencies in Brazil, United States and Europe (Anvisa, FDA and EMA, respectively). Finally, adequate extraction and chromatographic conditions were selected for the development of a bioanalytical method for benznidazole's biodistribution analysis. The most suitable extraction technique was liquid-liquid extraction: it is simple, fast, low cost and has good recovery, precision and accuracy. Separation was done by the HPLC (high efficiency liquid chromatography) chromatographic method with a diode-array detector (DAD) at a wavelength of 324 nm. The reagent solutions and initial conditions selected for this method's development were: acetonitrile (ACN) is an ideal solvent to be used as an extractor solvent and to be part of the mobile phase, in a 30:70 composition of ACN:water; The injection volume was of 20 µL, with a flow rate of 1,0 mL/min, using a C18 chromatographic column and a C18 pre-column; As an internal standard, the drug omeprazole was selected; The analysis was carried out at a temperature of 40 °C.

Keywords: Chagas disease, benznidazole, pharmacokinetics, biodistribution, development, validation, bioanalytical method.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global de casos de doença de Chagas	10
Figura 2: Estrutura química do benznidazol	15
Figura 3: Delineamento	22

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Métodos bioanalíticos disponíveis na literatura para a quantificação do fármaco benznidazol.....	24
Quadro 2: Parâmetros preconizados pelas agências regulatórias para a validação de método bioanalítico.....	27

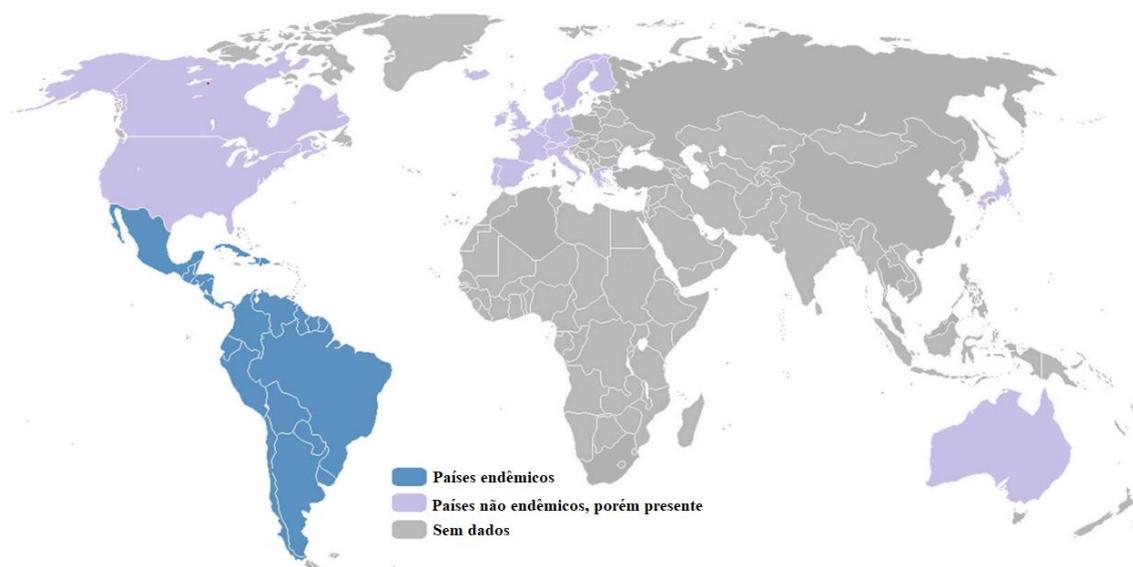
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Justificativa	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Revisão da literatura	21
3.2. Critérios de validação preconizados pelas agências regulatórias	21
3.3. Condições iniciais para o desenvolvimento do método bioanalítico	21
3.4. Delineamento	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Métodos bioanalíticos disponíveis na literatura para a quantificação do fármaco benznidazol.....	23
4.2. Critérios de desenvolvimento e validação preconizados pelas agências regulatórias do Brasil, Estados Unidos e Europa.....	25
4.3. Condições iniciais para a metodologia de análise de biodistribuição do benznidazol	27
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DCh), também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença tropical cujo agente etiológico é o parasito *Trypanosoma cruzi*. Ela está incluída no grupo de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Ministério da Saúde do Brasil, sendo endêmica em 21 países das Américas (DNDi, 2023). Atualmente, é estimado que 6-7 milhões de pessoas no mundo todo estejam infectadas pelo *T. cruzi* (WHO, 2020) e que aproximadamente 30 mil novos casos surjam anualmente, sendo que 12 mil pessoas venham a óbito todos os anos por conta das manifestações clínicas da doença de Chagas (DNDi, 2023).

Figura 1: Distribuição global de casos de doença de Chagas.



Fonte: SANGENITO, 2020 - Adaptada.

Apesar da maior prevalência de casos em países da América Latina, um aumento notável no número de casos de DCh em países não endêmicos foi observado nas últimas duas décadas, sendo as migrações humanas apontadas como o fator crítico para o aparecimento da DCh em áreas onde não havia sido descrita anteriormente (Pinazo, 2015), já podendo ser identificadas ocorrências nos Estados Unidos, Canadá, alguns países da Europa - principalmente na Espanha - e na região do Pacífico Ocidental, em países como a Austrália, Nova Zelândia e Japão (Lidani,

2019). Neste contexto, a enfermidade em questão é um problema epidemiológico, político, social e econômico a nível mundial.

A doença e o protozoário foram descobertos e descritos, em 1909, pelo cientista Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas. Entre os anos de 1907 e 1909, Chagas fez parte da equipe de Oswaldo Cruz no combate à malária em Minas Gerais, mais precisamente na cidade de Lassance. Dentre outros achados, suas pesquisas o levaram a encontrar uma nova espécie de protozoário circulando entre insetos hematófagos chamados de “barbeiros”.

Em busca de informações sobre as principais enfermidades que acometiam os moradores daquela região, chegou ao seu encontro, em 1909, uma criança febril de 2 anos de idade chamada Berenice. Nas amostras biológicas da paciente, Chagas se deparou novamente com a espécie peculiar de protozoário que possuía como características singulares um cinetoplasto grande e movimentação intensa. Berenice é, então, a primeira ocorrência documentada em humanos da doença de Chagas (De Lana e Tafuri, 2004). Seu descobrimento é um feito incomparável já que Chagas descreveu o parasito e seu ciclo evolutivo, o vetor e seus hábitos (Fiocruz, 2019).

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado que possui diferentes tipos de cepas ou linhagens quanto à morfologia, antigenicidade, patogenicidade, composição genética, infectividade (Coura, 2003). O seu ciclo de vida inicia-se quando o inseto triatomíneo, comumente chamado de “barbeiro”, pica uma pessoa ou outro animal infectado, sugando, então sangue contendo as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*, tornando-se um barbeiro infectado (Sucen, 2019). No intestino do inseto, o protozoário sofre alterações morfológicas e, então, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas que multiplicam-se, realizando a manutenção da infecção no vetor. Após migrarem para a região do reto do barbeiro, se transformam em tripomastigotas metacíclicas, forma infectante para este parasito (Jansen, 2000). Ao realizar o repasto sanguíneo, o barbeiro elimina simultaneamente fezes contendo as tripomastigotas metacíclicas que, em contato com tecidos cutâneos e mucosas lesionados, irão infectar outro humano ou mamífero. As tripomastigotas metacíclicas, uma vez no organismo do hospedeiro vertebrado, infectam novas células e, em seu interior, transformam-se em formas amastigotas replicativas. A replicação exacerbada do protozoário provoca a ruptura das células

infectadas, liberando, então, formas tripomastigotas (Guarner, 2019). Os parasitos irão infectar células vizinhas ou cair na circulação sanguínea, se disseminando e se difundindo para diferentes órgãos e tecidos. O hospedeiro infectado porventura entrará em contato com outro inseto vetor e, por fim, irá infectá-lo, fechando assim o ciclo.

Dentre as principais formas de transmissão podemos evidenciar o contato das fezes contaminadas com os tecidos lesionados pela picada do vetor, transfusão de sangue, via oral, através da placenta (Coura, 2003; OMS, 2021). Atualmente, em nosso país, a via oral se sobressai como principal mecanismo de transmissão já que essa via é a responsável pela infecção em grande maioria dos casos novos ocorridos na última década (Moreno, 2017).

A DCh apresenta-se em duas fases bem distintas: fase aguda e fase crônica. A fase aguda da doença caracteriza-se pela presença do parasito no sangue que pode ser facilmente detectado pelo método de Brener. Este método foi desenvolvido pelo pesquisador Zachary Brener no ano de 1962, baseando-se no método de Pizzi (1957). A metodologia, utilizada em parasitemias, consiste em colocar uma alíquota de 5 μ L de sangue em uma lâmina cobrindo-a com lamínula de 22 x 22 mm e analisar o material ao microscópio. Realiza-se a contagem determinando, assim, o número de parasitos em 50 campos, aplicando-se, em seguida, o fator de correção do microscópio para obter-se a carga parasitária do hospedeiro (Brener, 1962).

Pelos vasos sanguíneos, as tripomastigotas se disseminam por todo organismo do hospedeiro, multiplicando-se predominantemente no baço, fígado e linfonodos (Coura, 2003). A maioria dos casos é assintomática, porém, quando aparente, possui sintomas inespecíficos como febre leve a alta, edema generalizado e edema localizado no fígado e baço, mal-estar e inflamação dos gânglios linfáticos (Funasa, 2000). É possível ocorrer insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas em situações raras. Em alguns casos, no entanto, há o aparecimento de sinais específicos desta doença: sinal de Romaña e chagoma de inoculação (De Lana e Tafuri, 2004; Pérez-Molina, 2018).

Como na maioria das infecções, as manifestações clínicas se interrompem sem o conhecimento da origem dos sintomas e sem a necessidade de intervenção médica. O diagnóstico, que poderia ser feito facilmente por meio do exame de sangue a fresco, raramente

é realizado (Prata, 2001). Após a fase aguda e suas manifestações, evolui-se para a fase crônica da doença, quando o paciente pode passar por um longo período assintomático que dura anos ou desenvolver sintomas na vida adulta (Westphalen, 2012).

Sendo assim, a fase crônica pode ser assintomática ou sintomática, com suas manifestações aparecendo mais tarde, 20 a 40 anos depois da infecção inicial. As ocorrências sintomáticas podem ser observadas em aproximadamente 40% dos pacientes infectados (Fiocruz, 2017), sendo possíveis as formas cardíaca, digestiva ou mista. A inflamação é o principal determinante da progressão da doença na fase crônica, assim como a virulência da cepa e o tropismo tecidual (Pérez-Molina, 2018).

A forma cardíaca ocorre em 20-30% dos pacientes infectados pelo *T. cruzi*. Ela ocorre não apenas devido à presença do parasito no tecido, mas também em razão da interação parasito-hospedeiro que gera uma inflamação determinante para a patologia desta doença. Ambos fatores levam à alteração na fisionomia do miocárdio, ocasionando quadros de arritmia cardíaca e insuficiência cardíaca congestiva (Brener, 1987; Prata, 2001), sendo, então, de grande relevância devido à frequência em que é acometido, às características do acometimento e às graves consequências que gera ao paciente.

Do ponto de vista anatômico, a miocardiopatia chagásica crônica é caracterizada pelo aumento progressivo do coração devido à dilatação das câmaras. Corroborando com o aspecto macroscópico do órgão, o padrão histopatológico do coração mostra pontos de inflamação, fibrose e uma morfologia desordenada dos miócitos (Muñoz-Saravia, 2012). A miocardiopatia chagásica crônica vem sendo atribuída a múltiplos fatores como imunodepressão e dilatação da microvasculatura associadas a uma resposta inadequada do hospedeiro, podendo resultar em danos permanentes ao coração, sendo frequentes os casos de morte súbita (Prata, 2001; Coura, 2003). Este quadro se manifesta em homens e mulheres com frequência comparável, geralmente aparecendo entre as idades 30 e 50 anos (Muñoz-Saravia, 2012).

A forma digestiva acontece em aproximadamente 8-10% dos pacientes. A prevalência de envolvimento gastrointestinal varia entre áreas geográficas, provavelmente devido ao tipo de cepa do *T. cruzi* circulando em cada região (Prata, 2001). Ainda que seja observado com

menos frequência do que a forma cardíaca, a forma digestiva também pode levar à perda da qualidade de vida do paciente infectado, já que esta forma da doença é caracterizada pelas alterações morfológicas e funcionais causadas pelo aumento considerável do esôfago e cólon, condições chamadas de “mega-esôfago” e “mega-cólon”. Seus principais sintomas são disfagia, odinofagia, regurgitação, pirose, soluço, aspiração, tosse, sialorréia e perda de peso (Brener, 1987; De Lana e Tafuri, 2004; Pérez-Molina, 2018).

Existem diversos estudos recentes focados na progressão da doença cardíaca, mas infelizmente poucas publicações tentam compreender o envolvimento gastrointestinal. Embora a patogênese da forma digestiva não esteja bem esclarecida, sugere-se que a inflamação seja um dos pontos essenciais para a progressão da doença, principalmente por afetar neurônios do plexo mioentérico - que coordenam principalmente as contrações no trato gastrointestinal - tanto no esôfago quanto no cólon (Neto, 2022). Essas alterações digestivas levam a distúrbios na absorção, motilidade e secreção, perda do peristaltismo e, conseqüentemente, interrupção da passagem de alimentos ou bolo fecal (Echeverria, 2019; Neto, 2022). Por fim, a forma mista é determinada pela presença simultânea da forma cardíaca e digestiva.

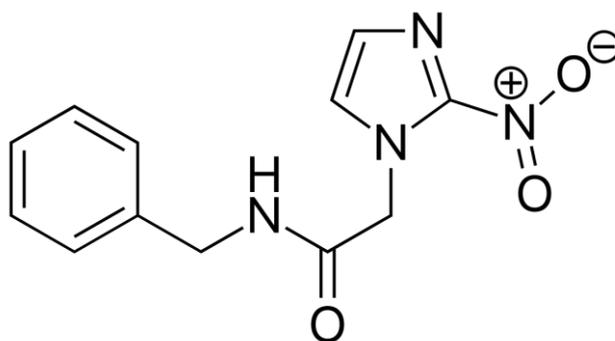
Nas décadas de 60 e 70 foram desenvolvidos os principais fármacos utilizados para o tratamento da DCh, sendo eles, o Nifurtimox (NFX) e o Benznidazol (BNZ). O NFX, entretanto, não é distribuído no Brasil e em alguns outros países da América Latina há vários anos, já que apresentou efeitos secundários severos (Sobrinho, 2009). Dessa forma, o BNZ é o único recurso medicamentoso de caráter etiológico disponível em território brasileiro, porém, está longe de ser um agente terapêutico adequado.

O benznidazol (N-benzil-2-nitro-1H-imidazol-1-acetamida), cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{12}N_4O_3$, é um fármaco derivado da classe dos nitroimidazóis com atividade antiprotozoária (Figura 2). Ele foi primeiramente sintetizado em 1972, por Wineholt e Liebman e produzido pelo laboratório Hoffman - La Roche, na Suíça (Cançado, 2000). Atualmente, é fabricado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe). Está disponível na clínica na forma de comprimidos de 100 mg para adultos e 12,5 mg para crianças de até dois anos de idade (Martindale, 2005; Lafepe, 2013) e sua posologia consiste na administração oral de 2,5–3,5 mg/kg em adultos e 2,5–5 mg/kg em crianças, duas ou três vezes ao dia, com regime de

tratamento de 60 dias, não excedendo dose diária de 300 mg de benznidazol (Lafepe, 2013). O medicamento é distribuído pelo Ministério da Saúde gratuitamente através do Sistema Único de Saúde (SUS).

Administrado por via oral, o BNZ é absorvido em maior quantidade no intestino delgado. O fármaco vai para a circulação porta, passando pelo fígado, onde é metabolizado para então ser distribuído para circulação sanguínea (Larini, 2008). Ainda que utilizado há vários anos, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação deste fármaco. Contudo, sabe-se que o benznidazol atua como pró-fármaco, sendo ativado dentro do parasito por uma enzima nitro-reductase tipo I NADH-dependente. O grupo nitro é, então, reduzido a um grupo amino, com a formação de vários intermediários de radicais livres e metabólitos eletrofílicos. A reação de redução resulta na geração de um metabólito citotóxico, que provoca a adição de grupos incomuns ao DNA do parasito, impedindo a formação de novas cadeias de DNA (García-Huertas, 2021).

Figura 2: Estrutura química do benznidazol.



Apesar de ser um medicamento eficaz na fase aguda da doença, possui eficácia variável na fase crônica (Caldas, 2019). Estudos recentes que discutem a cura parasitológica demonstram que o sucesso do tratamento com BNZ está principalmente relacionado com a fase da infecção em que se inicia o tratamento. Existem também algumas hipóteses para explicar a diferença de eficácia terapêutica entre as fases da doença: é possível que, como durante a fase

crônica o *T. cruzi* permanece nos tecidos, ele presumivelmente consegue escapar da ação do fármaco (Cançado, 2002).

Outra explicação para essa ineficácia na fase crônica são os resultados de alguns estudos farmacocinéticos e de biodistribuição. Em tais estudos, o BNZ não só apresentou uma penetração tecidual limitada como também revelou ter uma baixa biodisponibilidade devido ao metabolismo de primeira passagem no fígado, o que reduziria consideravelmente a ação do fármaco nos órgãos alvo (Perin, 2017). Há ainda uma crença passada, que persistiu até o final da década de 1990, que levou à desconfiança sobre a utilidade do tratamento antiparasitário na infecção crônica pelo *T. cruzi*: atribuía-se a miocardiopatia crônica e os “megas” apenas a respostas anti-autoimunes, sendo a presença do parasito nos tecidos irrelevante para a patogênese (Urbina, 2003; Bern, 2011). Esse pensamento adiou os estudos e descobertas acerca do BNZ.

Adicionalmente, um fator que complica o manejo farmacológico para esta doença é que o BNZ é um fármaco que apresenta efeitos secundários de certa importância, uma vez que 30% dos pacientes apresentam alguma das reações adversas (Maximiano, 2010). Tal fator é uma das causas mais comuns do abandono do tratamento. Desse modo, foram observadas reações de menor gravidade como leve perda de peso, parestesia, náuseas e vômito em 5-30% dos pacientes em tratamento. Outros efeitos adversos como dermatite e fotossensibilização foram percebidos em cerca de 35-40% dos pacientes e, em maior gravidade, a neuropatia periférica atingiu até 30% deles. Além disso, reações menos comuns mas que também demandam a suspensão imediata do uso do fármaco como, por exemplo, a supressão da medula óssea foi observada em menos de 1% dos pacientes (Bern, 2011).

Para que haja melhora no tratamento já existente ou até mesmo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a DCh, é necessário entender melhor o comportamento do BNZ nos fluidos biológicos (sangue, urina e tecidos). No entanto, são escassas as informações a respeito da farmacocinética, farmacodinâmica e biodistribuição deste fármaco. E, apesar dos conhecimentos serem restritos neste aspecto, sabe-se que o BNZ apresenta limitações sendo então sugerido que tais limitações estejam relacionadas com as suas propriedades farmacocinéticas (Lamas, 2006; Urbina, 2010; Moreira da Silva, 2012).

A farmacocinética é um ramo das Ciências Farmacêuticas que estuda, a partir de modelos matemáticos, a concentração do fármaco nos líquidos e tecidos do organismo ao longo do tempo (Kok-Young, 2015). Em termos quantitativos, ela estuda os processos de absorção, distribuição, metabolismo (ou biotransformação) e excreção de um fármaco (Storpirtis, 2011). Nesse contexto, a partir de estudos de farmacocinética, foi possível observar que o BNZ apresenta baixa biodisponibilidade, reduzida distribuição tecidual e parasitária, alto clearance e/ou curta meia-vida de eliminação (Lamas, 2006; Urbina, 2010; Moreira da Silva, 2012). Além disso, aspectos relativos às suas propriedades físico-químicas (Maximiano, 2010) e da auto indução dos seus sistemas de biotransformação (CYP3A hepática e GST intestinal) e transporte (P-gp e MRP2) (Perdomo, 2013) podem contribuir para sua ineficácia na promoção da cura parasitológica dos pacientes.

A fim de buscar mais esclarecimentos no que se refere aos estudos farmacocinéticos, diversos modelos experimentais vêm sendo empregados. O uso de modelos animais no estudo dos fármacos é uma etapa mais que necessária para garantir que parâmetros como a eficácia e a segurança sejam seguidos. Estes modelos são usados na fase pré-clínica do desenvolvimento de um novo fármaco devido à semelhança estrutural e fisiológica entre o homem e as espécies frequentemente empregadas (Van Meer, 2014).

Um dos primeiros a investigar detalhadamente a farmacocinética do BNZ foi Workman e *cols* (1984). Neste estudo foram utilizados camundongos, cães e ovelhas com o objetivo de estimar as doses necessárias que produziriam efeitos no corpo humano. De forma mais tardia, Davanço e *cols* (2014) desenvolveram e validaram um método bioanalítico para a quantificação do BNZ em plasma com o intuito de avaliar a farmacocinética do BNZ após administração de dose única oral de BNZ em ratos e, em outro estudo, pesquisou a farmacocinética pré-clínica do BNZ em coelhos. Outros autores realizaram estudos acerca da farmacocinética do BNZ quando aliado a outros fármacos, como é o caso dos trabalhos de Moreira da Silva e *cols* (2012) que utilizou camundongos e Leonardi e *cols* (2013) que utilizou ratos para seu estudo. Recentemente, Perin e *cols* (2020) avaliaram a farmacocinética do BNZ após diferentes esquemas terapêuticos em modelo murino.

Embora seja de grande importância, assim como a farmacocinética, a biodistribuição do BNZ é pouco estudada nos diferentes modelos animais. O termo “biodistribuição” refere-se ao movimento do fármaco do sangue para os tecidos após ser absorvido e distribuído (Kok-Young, 2015) e para que seja quantificado em tais tecidos, é necessário o desenvolvimento de um método bioanalítico. Estes são essenciais para a obtenção de respostas que esclareçam a problemática envolvendo o uso de BNZ na quimioterapia da DCh. No entanto, o desenvolvimento de um método cromatográfico é uma tarefa complicada, já que uma grande variedade de parâmetros interfere no resultado final do método. Frente a essa realidade, o método desenvolvido deve ser eficiente e estar em conformidade com critérios específicos para que seja validado e, subsequentemente, reproduzível.

Os processos de validação podem ser aplicados para análise de medicamentos das mais diversas classes farmacológicas e propósitos terapêuticos. A validação de métodos analíticos é o procedimento através do qual se comprova que uma determinada metodologia analítica é aceitável para o propósito a qual foi desenvolvida (Brito, 2003), ou seja, garante a confiabilidade nos resultados obtidos experimentalmente. Para tal objetivo, agências regulatórias como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), Food and Drug Administration (FDA) e European Medicines Agency (EMA) orientam sobre os processos de validação de métodos bioanalíticos e implementam resoluções visando o aperfeiçoamento dos métodos bioanalíticos já definidos.

Em suma, o grande trunfo dos métodos bioanalíticos está relacionado à sua aplicação como ferramenta no estudo, planejamento e desenvolvimento de novos fármacos ou de novas formulações. No caso do BNZ, especificamente, o estudo da biodistribuição tecidual pode ajudar no sentido de melhorar o esquema terapêutico e possivelmente a biodisponibilidade do fármaco e a adesão ao tratamento (Davanço, 2014).

1.1. Justificativa

Considerando que:

(i) O benznidazol é o único fármaco disponível para o tratamento da DCh no Brasil; (ii) A limitada eficácia e segurança do benznidazol no tratamento padrão da DCh, pode ser devido a propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do fármaco; (iii) A escassez de dados na literatura a respeito da sua biodistribuição, o presente estudo propõe discutir aspectos regulatórios e técnicos fundamentais para o desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica para quantificar o anti-chagásico benznidazol em amostras de tecidos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Discutir aspectos regulatórios e técnicos necessários para o desenvolvimento de um método analítico para quantificação de benznidazol de acordo com as recomendações da Anvisa, FDA e EMA para métodos bioanalíticos.

2.2. Objetivos específicos

- I.* Revisar os métodos bioanalíticos para quantificação do BNZ disponíveis na literatura;
- II.* Comparar os critérios de validação preconizados pelas agências regulatórias do Brasil, Estados Unidos e Europa;
- III.* Selecionar as condições de extração e condições cromatográficas para o desenvolvimento do método analítico para análise de biodistribuição do benznidazol em tecido de cão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Revisão da literatura

Foi realizada uma busca em bancos de dados e em plataformas digitais Pubmed e Google Acadêmico utilizando as seguintes palavras-chave em inglês: “*benznidazole*” e “*pharmacokinetics*”. Em seguida, após leitura e refinamento da pesquisa, foi elaborado um compilado com informações de artigos científicos de diversos autores. Foram excluídos aqueles trabalhos que abordavam a farmacocinética de outros fármacos, que tratavam-se de outros aspectos do comportamento do BNZ que não sua farmacocinética e aqueles que não explicitam o método analítico para a quantificação do BNZ. Dessa forma, dentre os artigos encontrados, foram mantidos para a confecção do quadro final aqueles que abordam o desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos e/ou a quantificação especificamente do benznidazol.

3.2. Critérios de validação preconizados pelas agências regulatórias

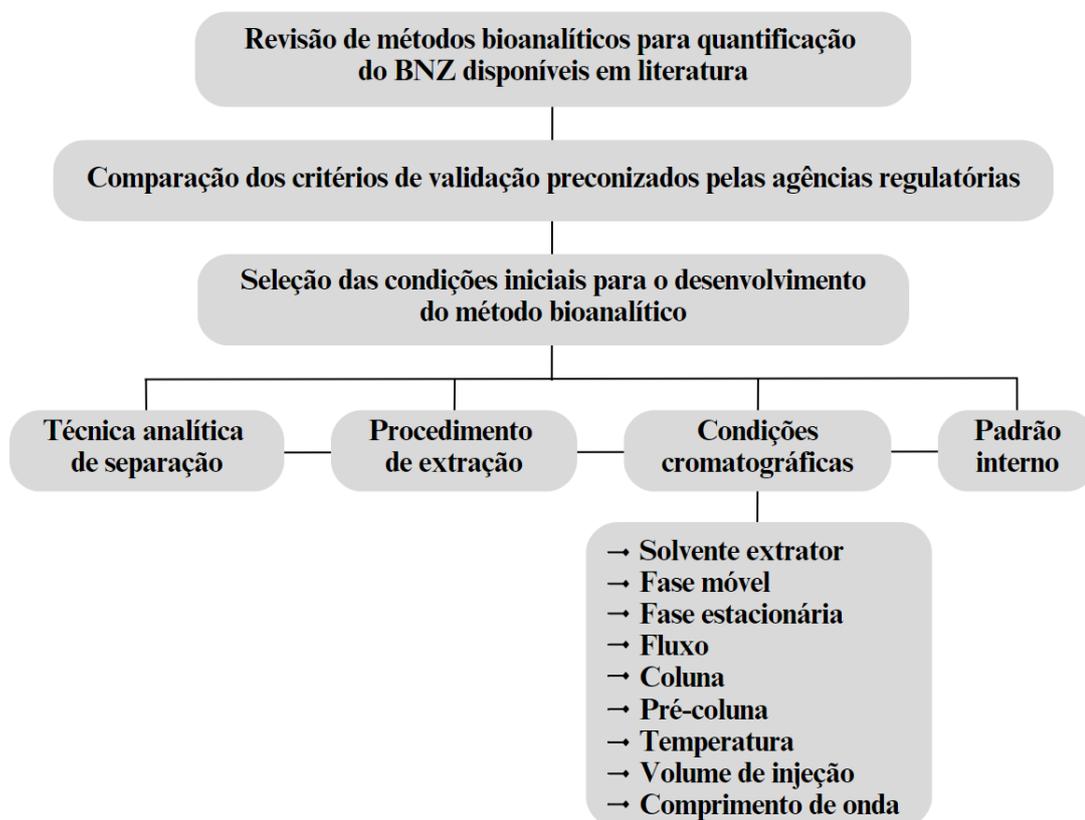
Foram avaliados os critérios de validação preconizados nos documentos que regulamentam a validação de métodos bioanalíticos de três agências: Anvisa, FDA e EMA. As orientações e critérios avaliados seguem a RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Anvisa, o guia “Validação de Método Bioanalítico - Orientação para a Indústria” do FDA e o “Guia de validação de métodos Bioanalíticos” do EMA.

3.3. Condições iniciais para o desenvolvimento do método bioanalítico

Por meio de uma revisão da literatura e uma consulta a livros didáticos acerca de fundamentos da cromatografia, foi realizada uma seleção das condições iniciais para o desenvolvimento da metodologia bioanalítica. Foram propostas as seguintes condições: técnica analítica de separação, procedimento de extração, solvente extrator, fase móvel, fase estacionária, fluxo, coluna e pré-coluna, temperatura de análise, volume de injeção, comprimento de onda e padrão interno.

3.4. Delineamento

Figura 3: Delineamento.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo visou avaliar, na literatura e em diretrizes de órgãos regulatórios, os aspectos normativos e técnicos para o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico de quantificação tecidual do fármaco anti-chagásico benznidazol.

4.1. Métodos bioanalíticos disponíveis na literatura para a quantificação do fármaco benznidazol

Na literatura, vários são os estudos *in vivo* que desenvolveram um método bioanalítico inovador ou que possuem dados farmacocinéticos relevantes para os mais variados modelos animais (Quadro 1). Apesar disso, pouco se sabe sobre a farmacocinética e biodistribuição no modelo de experimentação canino, ainda que seja um ótimo modelo para estudos envolvendo a DCh e para futuros estudos de perfil cinético envolvendo o BNZ.

A partir das pesquisas feitas, foram selecionados dez artigos científicos para compor o compilado. Os estudos foram publicados entre 1984 e 2020 e abordam a quantificação do benznidazol, sempre levando em consideração quais os requisitos mínimos para a reprodutibilidade e confiabilidade de resultados de acordo com as diferentes agências.

As técnicas bioanalíticas nos estudos foram propostas para determinar as concentrações do fármaco benznidazol em diversas matrizes biológicas. Foram observados e levados em consideração para a confecção do quadro final os critérios modelo experimental, fase móvel, solvente extrator, qual o tipo de material biológico utilizado, diluente, padrão analítico e padrão interno além de volume de injeção, comprimento de onda de detecção, vazão, temperatura e fase estacionária. Os achados são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1: Métodos bioanalíticos disponíveis na literatura para a quantificação do fármaco benznidazol.

Autor e ano	Modelo experimental	Fase estacionária	Solvente extrator	Fase móvel	Material biológico	Diluyente	Volume de injeção	Temperatura	Padrão interno	Vazão	Comprimento de onda
Workman, 1984	Cão, ovelha, camundongo	Radial-PAK C18	Metanol	Metanol:água (60:40, v/v)	Urina, ultrafiltrado, sangue e tecido	*	20 µL	*	1-(2-nitroimidazol-1)-3-etoxipropan-2-ol	4,0 mL/min	313 nm
Morilla, 2003	Rato	Kromasil C18	Acetonitrila: dimetil sulfóxido (1:1, v/v)	Água:acetonitrila (60:40, v/v)	Tecido	Água deionizada	20 µL	20°C	*	0,9 mL/min	324 nm
Silva, 2007	*	Lichrospher C18	Acetonitrila	Acetonitrila:água (50:50, v/v)	*	Acetonitrila	20 µL	25 a 80 °C	*	1,0 mL/min	316 nm
Bulffer, 2011	Rato	ODS Hypersil C18	Diclorometano	Metanol:água (60:40, v/v)	Sangue	Solução salina	*	*	*	0,2 mL/min	320 nm
Moreira da Silva, 2012	Camundongo	Gemini NX-C18	Éter etílico	Acetonitrila:água (60:40, v/v)	Plasma	*	25 µL	40°C	Diazepam	1,0 mL/min	324 nm
Leonardi, 2013	Rato	C18 de fase reversa	Acetonitrila: dimetilsulfóxido (50:50, v/v)	Acetonitrila:água (40:60, v/v)	Plasma	Ácido tricloroacético	20 µL	*	*	1,0 mL/min	324 nm
Marson, 2013	*	Lichrospher-100 C18	Solução aquosa de ácido tricloroacético	Água:acetonitrila (80:20, v/v)	Leite materno	*	*	*	*	1,2 mL/min	313 nm
Davanço, 2014	Rato	UHPLC HSS SB C18	Acetonitrila	Água:acetonitrila (65:35, v/v)	Plasma	*	1 µL	45°C	Benzocaína	0,55 mL/min	324 nm
Perin, 2017	Camundongo	Gemini NX-C18	Acetato de etila	Água:acetonitrila (70:30, v/v)	Plasma e tecido	PBS	20 µL	40°C	Omeprazol	1,0 mL/min	324 nm
Perin, 2020	Camundongo	Gemini NX-C18	Acetato de etila	Água:acetonitrila (70:30, v/v)	Plasma e tecido	*	20 µL	40°C	Omeprazol	1,0 mL/min	324 nm

(-) Não há informações disponíveis no artigo.

Quanto aos modelos experimentais, foram utilizados camundongos, ratos e ovelhas e em apenas um dos estudos foi utilizado o modelo cão. Foram utilizadas colunas de várias marcas e modelos diferentes, porém todas elas são formadas pela cadeia com 18 carbonos, também conhecida como C18. Os solventes extratores foram metanol, dimetilsulfóxido, diclorometano, éter etílico, ácido tricloroacético, acetato de etila e a acetonitrila. Na fase móvel foram utilizados metanol e acetonitrila combinados em diferentes proporções com a água. Os materiais biológicos analisados foram plasma, urina, leite materno e tecidos. Os volumes de injeção variaram de 1 microlitro a 25 microlitros, com sua maioria padronizando no volume de 20 microlitros. Em relação à temperatura, variou-se de 20 graus celsius a 80 graus celsius, com sua maioria ajustando a temperatura a 40 graus celsius. Quanto ao padrão interno, a informação não foi localizada em metade dos estudos. Para aqueles que o citaram, foram utilizados 1-(2-nitroimidazol-1)-3-etoxipropan-2-ol, diazepam, benzocaína e omeprazol. A vazão variou de 0,2 mL por minuto a 4,0 mL por minuto sendo que a maioria dos estudos utilizou uma vazão de 1,0 mL por minuto e um comprimento de onda de 324 nm.

4.2. Critérios de desenvolvimento e validação preconizados pelas agências regulatórias do Brasil, Estados Unidos e Europa

A validação é um processo contínuo que se inicia na proposta ou estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento, culminando na comprovação da eficiência do método. Os resultados obtidos na validação podem ser utilizados para avaliar a qualidade, confiabilidade e uniformidade dos resultados analíticos (Huber, 2007).

No Brasil, a RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 do Ministério da Saúde estabelece critérios para a validação de métodos analíticos. Neste documento é possível encontrar definições, diretrizes e parâmetros a serem seguidos no processo de legitimação do método desenvolvido (Anvisa, 2017). Na Europa, o “Guia de validação de métodos bioanalíticos” do EMA fornece recomendações para a validação de métodos bioanalíticos aplicados na análise de fármacos em matriz biológica obtidas em estudos toxicocinéticos em animais e em todas as fases de ensaios clínicos. O guia do FDA, “Validação de Método Bioanalítico - Orientação para a Indústria”, por sua vez, ajuda na validação de métodos bioanalíticos usados em farmacologia

clínica humana, biodisponibilidade e estudos de bioequivalência que requerem avaliação farmacocinética, toxicocinética ou concentração de biomarcadores (FDA, 2018).

De acordo com a RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, os parâmetros de desempenho analítico a serem analisados são precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade (Anvisa, 2017). Além dos já citados, o limite inferior de quantificação é também preconizado como parâmetro essencial para garantir a aceitabilidade e confiabilidade dos resultados analíticos (EMA, 2015). Podem ser ainda estudados outros parâmetros como o efeito da matriz na identificação, quantificação de um analito, efeito residual (*carry over*) e limite inferior de recuperação (Huber, 2007; FDA, 2018).

O Quadro 2 mostra os principais parâmetros para a validação de métodos bioanalíticos. Estes parâmetros são fundamentais para garantir a aceitação do desempenho e a confiança dos resultados analíticos de três diferentes órgãos regulatórios - Anvisa, FDA e EMA.

Observou-se uma certa concordância entre as agências e, como é possível observar no Quadro 2, os parâmetros analíticos obrigatórios para mais de duas agências foram seletividade, precisão, exatidão, linearidade, estabilidade e limite de quantificação inferior. Os únicos parâmetros obrigatórios para todas as três agências foram precisão e limite inferior de quantificação. Os únicos parâmetros obrigatórios para todas as três agências foram precisão e limite inferior de quantificação. De acordo com a RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Anvisa, o parâmetro “precisão” é definido como a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz e o parâmetro “limite inferior de quantificação” é definido como a menor concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz.

Quadro 2: Parâmetros preconizados pelas agências regulatórias para a validação de método bioanalítico.

PARÂMETRO	Anvisa	FDA	EMA
Seletividade	X		X
Precisão	X	X	X
Exatidão	X		X
Linearidade	X	X	
Efeito residual			
Estabilidade	X		X
Limite de quantificação inferior	X	X	X
Recuperação	X		
Curva de calibração			X
Função da resposta			X
Efeito matriz			X
Especificidade		X	
Limite de detecção		X	

4.3. Condições iniciais para a metodologia de análise de biodistribuição do benznidazol

Considerando um dos objetivos propostos no presente estudo e as características químicas do padrão analítico benznidazol, foram elencadas a seguir as condições iniciais que

foram utilizadas para o desenvolvimento do método analítico para análise de biodistribuição do BNZ.

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura. Esta técnica tem sido demasiadamente empregada já que possibilita uma considerável facilidade na separação, identificação e quantificação de espécies químicas (Collins, 2006). Estudos de desenvolvimento de metodologia bioanalítica dependem de técnicas sensíveis como, por exemplo, a cromatografia de alta eficiência (CLAE ou HPLC) e a espectrometria de massas. Na literatura, estão disponíveis diversos estudos que empregam, em sua maioria, a CLAE para determinar as concentrações de BNZ em matriz biológica (Workman, 1984; Morilla, 2003 e 2005; Silva, 2007; Moreira da Silva, 2012; Leonardi, 2013; Marson, 2013; Davanço, 2014).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica de separação que possui sensibilidade, ampla aplicabilidade e fácil adaptação para determinações quantitativas (Skoog, 2002). Além disso, a CLAE tem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução eficiência e detectabilidade. É uma técnica que proporciona um tempo de análise reduzido devido à alta eficiência da coluna e à vazão rápida da fase móvel através da coluna. É versátil já que pode ser empregada para análise de moléculas orgânicas ou inorgânicas sendo as amostras líquidas ou sólidas (Collins, 2006). Portanto, foi a técnica escolhida para o estudo.

A separação das substâncias presentes na matriz tem como objetivo identificar o componente de interesse, purificá-lo e quantificá-lo. As técnicas mais comuns empregadas para a extração de compostos presentes em fluidos biológicos são extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas ou líquidas. Deve-se escolher uma técnica de extração que seja simples, rápida, de baixo custo, capaz de gerar extratos relativamente livres de interferentes e ter adequada recuperação com boa precisão e exatidão para o analito estudado (Queiroz, 2001). O procedimento de extração que apresenta a melhor recuperação dos padrões analíticos é a extração líquido-líquido (Perin, 2017) e, portanto, foi a metodologia selecionada para essa validação.

Com base nas propriedades estruturais do benznidazol e na literatura disponível, foram selecionadas condições cromatográficas iniciais para a quantificação do padrão analítico BNZ.

No que diz respeito à fase móvel (FM), observou-se a constante utilização de Acetonitrila (ACN) e água ultra pura como FM em estudos de quantificação do BNZ em matriz biológica, como demonstrado no Quadro 1. Na CLAE, a FM desempenha dois papéis muito importantes: participa do processo de separação ao interagir com a amostra e promove o arraste dos componentes da amostra através do sistema cromatográfico. De um modo geral, o(s) solvente(s) escolhidos para serem empregados como FM devem ser de alto grau de pureza para não afetar a detecção do analito, solubilizar os compostos de interesse para que possa ser transportada através da coluna (Collins, 2006) e possuir baixa viscosidade e ponto de ebulição, características essenciais tanto na escolha da FM quanto da técnica de extração (Maximiano, 2010).

A proporção de ACN e água ultra pura na fase móvel, em modo isocrático, de 30:70 (v/v) obteve a melhor separação dos analitos nos estudos analisados (Perin, 2017) e, portanto, foi a fase móvel sugerida. Quando diz-se “modo isocrático”, refere-se à eluição. A eluição é a corrida cromatográfica propriamente dita. Sendo assim, o modo isocrático de eluição é aquele que permite a manutenção da força cromatográfica durante toda a análise, ou seja, permite que a FM interaja com os componentes da amostra de forma constante no decorrer do processo cromatográfico (Collins, 2006). A eluição isocrática é considerada favorável pois é simples, facilmente reproduzível e também de menor custo quando comparado com outros tipos de eluição.

No que se refere à extração, considera-se que, quando possível, o solvente extrator deve ser a própria FM ou algum dos componentes dela para que não haja precipitação de compostos durante a análise. Neste contexto, o solvente extrator mais adequado é a ACN. Outros solventes orgânicos foram considerados, porém, além deste solvente ser um dos constituintes da FM, o BNZ mostrou-se mais solúvel nele.

A vazão sugerida é de 1,0 mililitro por minuto utilizando como fase estacionária uma coluna de separação analítica NX-C18 e uma pré-coluna C18. Este fluxo é considerado o ideal

considerando as dimensões da coluna (150.0 x 4.6 mm) e tamanho de suas partículas (5.0 μm) e já foi utilizado em alguns estudos (Moreira da Silva, 2012). Tais colunas apresentam melhor desempenho cromatográfico com uma melhor resolução já que ela possui um “recheio” composto por uma sílica modificada com o grupamento octadecil, sendo ideal para as características de polaridade observadas para o BNZ. Este tipo de fase estacionária consiste de um líquido quimicamente ligado a um suporte cromatográfico que, no caso deste estudo, é a sílica modificada.

A sílica é um dos materiais mais utilizados em CLAE pois possui uma alta estabilidade química devido à ligação covalente entre ela e líquido que compõe a fase estacionária. Além disso, uma de suas características físicas mais favoráveis é que possui uma grande área superficial, possibilitando uma boa aceitação para os mais variados tipos de amostra e solvente, isto é, existe uma maior liberdade de escolha de fase móvel para as análises, por exemplo (Collins, 2006). Além disso, a coluna NX-C18 e pré-coluna C18 possuem seletividade exclusiva devido à ampla faixa de pH que oferecem, alta integridade estrutural e capacidade de carga aumentada devido a sua alta força mecânica.

A temperatura de 40 °C foi selecionada para a análise, corroborando com estudos de Moreira da Silva e *cols.* (2012) e Perin e *cols.* (2017 e 2020). O aumento da temperatura em relação à temperatura ambiente diminui a viscosidade da fase móvel, o que pode permitir uma melhor transferência de massa e um tempo de corrida curto, interessante em experimentos de biodistribuição, que possuem um número grande de amostras (Moreira da Silva, 2012). É importante ressaltar que a temperatura máxima suportada pelas colunas utilizadas é de 60 °C. Assim como o parâmetro temperatura, é também muito relevante atentar-se à pressão ideal para a coluna utilizada, que é de 1.500 PSI.

Nessas condições de separação, uma injeção de 20 μL mostrou-se a mais adequada. Este volume de injeção baseia-se nos trabalhos de Workman e *cols.* (1984), Morilla e *cols.* (2003 e 2005), Leonardi e *cols.* (2013) e Perin e *cols.* (2017), cujos testes realizados apontaram este volume de injeção como mais apropriado para as análises cromatográficas.

A detecção foi feita por absorvância no detector espectrofotométrico por arranjo de diodos (DAD) no comprimento de onda de 324 nanômetros, sugerido por Morilla e *cols.* (2003) e, posteriormente, aplicado em outros estudos (Moreira da Silva, 2012; Leonardi, 2013; Davanço, 2014; Perin, 2017 e 2020).

O funcionamento dos detectores espectrofotométricos baseia-se na absorvância da luz por parte do analito ao passar através dele radiação eletromagnética. O detector em questão, DAD, é um equipamento que realiza análises tanto qualitativas quanto quantitativas (Collins, 2006). Nele, são possíveis leituras em diferentes comprimentos de onda, contudo no comprimento de onda selecionado (324 nm) temos uma região de maior absorvância molar e seletividade para uma solução de BNZ.

O omeprazol (OPZ) foi o padrão interno escolhido para a quantificação. É um fármaco de estrutura química similar a substância a ser quantificada e de fácil aquisição. Foi escolhido pois apresentou boa detecção no mesmo comprimento de onda que o BNZ com uma separação bem definida dos picos de análise devido a seu tempo de retenção, ligeiramente maior do que o do padrão analítico de BNZ (Perin, 2017).

Assim, a partir das condições iniciais aqui elencadas, serão iniciados os testes para o estudo de biodistribuição do BNZ em amostras de tecido de cão. A análise dos cromatogramas obtidos será um direcionador para manutenção ou não de tais condições ao longo de todas as análises.

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi desenvolvido um novo método utilizando CLAE-DAD para quantificar o BNZ em tecido canino. Esta metodologia se mostra inovadora, visto que o único método disponível na literatura, para o modelo cão, foi descrito por Workman em 1984. O modelo cão é um bom modelo para estudos envolvendo a DCh já que desenvolvem uma infecção chagásica comparável à doença humana.

Diante do exposto, conclui-se que o desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica para a quantificação do benznidazol é essencial para estudos de biodistribuição na DCh. Levando-se em consideração os parâmetros cromatográficos previamente discutidos e selecionados, espera-se que esse método se prove eficaz, robusto e preciso para desvendar se a biodistribuição ocorre de maneira ampla, atingindo os órgãos de maior relevância na infecção pelo *T. cruzi*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **N Engl J Med** v.364, n.34, p. 2527, Jun 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 de maio. 2012.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, Suppl. 1, p. 205-213, Nov 1987.

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

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

CALDAS, I. S., *et al.* 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.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: **Editora UNICAMP**, 2006. 452p.

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

DAVANÇO, M.G. *et al.* Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: application in a preclinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 7, p. 1008-1015, 2014.

DE LANA & TAFURI. Parasitologia Humana. 11 ed. Pg. 85. São Paulo: **Atheneu**, 2004.

DNDi – Drugs for Neglected Diseases Initiative. **Doença de Chagas**. Disponível em: <<https://dndial.org/doencas/doenca-de-chagas/>>. Acesso em: Junho, 2023.

ECHEVERRIA, L. E., *et al.* American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, 33(1), p. 119–134. 2019.

ESTADOS Unidos da América. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). **Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry**. 24 de maio de 2018.

FUNDAÇÃO Nacional da Saúde - Funasa. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Aspectos Clínicos, Vigilância Epidemiológica e Medidas de Controle - Guia de bolso**. Brasília (DF), 2000. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/GBDIP001_total.pdf>. Acesso em: Junho, 2023.

FUNDAÇÃO Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. **Carlos Chagas**. 2019. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/historia/carlos-chagas/>>. Acesso em: Setembro, 2022.

FUNDAÇÃO Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. **Doença**. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/sessao/doenca/>>. Acesso em: Setembro, 2022.

GARCÍA-HUERTAS, P, *et al.* Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. **Biomed Pharmacother**. v. 142, 2021.

GUARNER, Jeannette. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 164–169, 2019.

HUBER, L. Validation of Analytical Methods: Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2a edição. **Nova Iorque: Informa Healthcare**, 2007.

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

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

LAMAS, M. C. *et al.* Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. **International journal of pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 239-243, 2006.

LEONARDI, D., *et al.* 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.

LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Frontiers in Public Health**, v. 7, artigo 166. 2019.

MARTINDALE. The complete drug reference, 34^o ed. **UK: Royal Pharmaceutical Society**, London, 2005.

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.

MOREIRA DA SILVA, R.; OLIVEIRA, L.T.; BARCELLOS, N.M.S.; SOUZA, J.; LANA, M. Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 3344-8, Jun 2012.

MORENO, A. M. H. Laboratório de Pesquisa Clínica em Doenças de Chagas/ Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/Fiocruz (org.). Mecanismos de transmissão da doença de Chagas. **Portal da Doença de Chagas**. 2017.

MORILLA, M.J., *et al.* Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n.2, p. 213-219. 2005.

MORILLA, M.J. *et al.* Liposomal Benznidazole: A High-Performance Liquid Chromatographic Determination for Biodistribution Studies. **Journal of Chromatographic Science**, v. 41. 2003.

MUÑOZ-SARAVIA, SG, Haberland A, Wallukat G, Schimke I. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Fail Rev**. 2012 Jan;17(1):45-64.

NETO, J. R. C., *et al.* Neuroprotective Treatments for Digestive Forms of Chagas Disease in Experimental Models: A Systematic Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022. 2022.

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

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, 391(10115), 82–94.

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

PERIN, L. *et al.* Population pharmacokinetics and biodistribution of benznidazole in mice, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 8, p. 2213-21, 2020.

PHENOMENEX. GEMINI 5 μ m NX-C18, 2020. Disponível em: <<https://www.phenomenex.com/ViewDocument?id=gemini+5+%CE%BCm+nx-c18&fsr=1>>. Acesso em: 16 de julho de 2023.

PINAZO, M. J.; GASCON, J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). **Acta Tropica**, v. 151, p. 16–20. 2015.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

SANGENITO, L. S., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009–2018) Survey. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 5(2), ed. 88. 2020.

SILVA, A.L.M., *et al.* Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de Benznidazol para a Doença de Chagas. **Química Nova**, v.30, p. 1163-1166, 2007.

SKOOG, D.A; *et al.* Ignez Caracelli. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Em: Princípios de Análise Instrumental 5^o ed, Porto Alegre: **Bookman**. Cap. 28, p. 641-676. 2002.

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

STORPIRTIS, S.; GAI, M.N.; CAMPOS, D.R.; GONÇALVES, J.D. Farmacocinética básica e aplicada. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2011. p. 221

SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias. **doença de Chagas**. Secretaria de Estado de Saúde. 2019. Disponível em: <<https://saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/doenca-de-chagas/doenca>> . Acesso em: Setembro de 2022.

UNIÃO Européia. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). European Medicines Agency (EMA). Guideline on bioanalytical method validation. Julho de 2015.

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

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, 2010.

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

WORKMAN, P. *et al.* Preclinical pharmacokinetics of benznidazole, **British Journal of Cancer**, v. 50, n. 3, p. 291–303, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, Who.int, disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1>, Acesso em: Setembro, 2022.