
**DELINEAMENTO DE
ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS
PARA O TRATAMENTO
DA DOENÇA DE CHAGAS**

José Lamartine Soares Sobrinho, ¹ Flávia Patrícia de Moraes Medeiros, ^{1,2} Mônica Felts de La Roca, ¹ Keyla Emanuelle Ramos da Silva, ¹ Luciana Neiva Antunes Lima ¹ e Pedro José Rolim Neto ¹

RESUMO

Estima-se que a prevalência global da doença de Chagas seja de 9,8 milhões de pessoas infectadas. Esta doença resulta da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), parasito pertencente a um ecossistema exclusivamente americano. A batalha pela interrupção de sua transmissão vetorial e transfusional já obteve êxito em países endêmicos como Chile, Uruguai e Brasil. Contudo, esses 9,8 milhões de pessoas infectadas não possuem um tratamento medicamentoso adequado. A terapêutica atual, cujo fármaco de escolha é o benznidazol na forma farmacêutica de comprimido de liberação imediata, não favorece a administração em neonatos, crianças e idosos. Cientistas de todo o mundo têm trabalhado no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento desta doença e os resultados vão desde a descoberta de novos alvos bioquímicos ao desenvolvimento de novas moléculas com potente ação tripanossomicida. Inúmeros agentes quimioterápicos já foram e estão sendo testados desde a descoberta da doença, em 1909, por Carlos Chagas. Esta revisão crítica trata da busca por uma nova quimioterapia e sugere a possibilidade de que formas mais adequadas de vetorização do benznidazol sejam capazes de associar vantagens terapêuticas ao fármaco de escolha para o tratamento proposto, de forma que a população infectada receba seus benefícios.

DESCRITORES: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Quimioterapia. Benznidazol. Tratamento específico. Desenvolvimento de fármacos.

-
- 1 Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM. Departamento de Ciências Farmacêuticas Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
 - 2 Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE).

Endereço para correspondência: Pedro José Rolim Neto, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Arthur de Sá, s/n. CEP 50714-521. Cidade Universitária, Recife, PE. Tel/Fax: (81) 3272-1383. E-mail: pedro.rolim@pesquisador.cnpq.br

Recebido para publicação em: 21/11/2006. Revisto em: 17/4/2007. Aceito em: 12/8/2007.

INTRODUÇÃO

Diversas pesquisas científicas relacionadas à doença de Chagas e à sua quimioterapia têm sido publicadas em periódicos nacionais e internacionais (Castro et al., 2006; Guedes et al., 2006; Urbina, 2001, 2002; Urbina & DoCampo, 2003). O interesse em realizar tais pesquisas científicas tem crescido significativamente no Brasil e em países vizinhos em razão do grande número de pessoas infectadas, aproximadamente 10 milhões, das quais 90% vivem em países em desenvolvimento.

Um fator agravante desse quadro tem sido o fato de os grandes centros mundiais não estarem interessados em realizar pesquisas que visem melhorar a terapêutica de doenças consideradas não lucrativas para as indústrias farmacêuticas internacionais. Algumas das indústrias que atualmente produzem os medicamentos destinados a tais doenças não demonstram interesse em dar continuidade a esta produção em virtude do baixo lucro que ela proporciona. Exemplo disso foi o que ocorreu em 3 de março de 2003, quando o grupo farmacêutico suíço Roche anunciou a doação ao governo brasileiro do direito de patente e de uso da tecnologia do medicamento Rochagan®, a base do fármaco benznidazol. O governo brasileiro concedeu ao Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) o direito de sua produção; conseqüentemente, este será o único laboratório, no mundo, a produzir um medicamento destinado ao tratamento da doença de Chagas (WebMedicos, 2006).

Dados divulgados pelo órgão internacional, *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (DNDi, 2006), relatam que apenas 1% dos 1.393 novos fármacos registrados entre 1975 e 1999 foram destinados às doenças tropicais. Esses números revelam a existência de uma política de pesquisa excludente, na qual apenas 10% da despesa mundial com pesquisa em saúde são gastos em doenças que representam 90% da carga global de doenças. Pesquisadores de todo o mundo, principalmente os latino-americanos, têm trabalhado para fornecer à população necessitada alternativas para este tratamento que, na maioria dos casos, se apresenta inadequado.

Este trabalho tem por objetivo proporcionar atualização aos profissionais das mais diversas áreas relacionadas à doença de Chagas e delinear alternativas para o seu tratamento.

DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descoberta e descrita pelo médico sanitário Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909). Trata-se de uma infecção transmissível causada pelo parasito *T. cruzi*, que pode lesar o coração, bem como os órgãos do aparelho digestivo (esôfago e intestino grosso). Sua transmissão exige a participação de um vetor, o triatomíneo, conhecido popularmente pelos nomes de barbeiro, fincão e chupança, entre outros. É um

artrópode da classe *Insecta*, ordem *Hemiptua*, família *Reduviidae* e subfamília *Triatomine* (Galvão, 2003; Gaunt & Miles, 2000).

Existem 118 espécies conhecidas de vetor, das quais 105 pertencem ao novo mundo. Todas essas espécies são vetores em potencial para o *T. cruzi*, no entanto apenas seis têm importância epidemiológica na América do Sul: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sórdida*, *P. megistus* e *Rhodnius prolixus* (WHO, 2006).

O *T. cruzi* faz parte de um ecossistema exclusivamente americano, sendo encontrado em extensas áreas do continente, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile, entre as latitudes 42°N e 49°S (Dias et al., 2002). É um protozoário flagelado da Ordem *Kinetoplastida*, Família *Trypanosomatidae*, caracterizado pela existência de um único flagelo e do cinetoplasto, uma organela que contém DNA e se localiza na mitocôndria. Suas formas evolutivas são os tripomastigotas (infectante), epimastigotas (formas de multiplicação no vetor e em culturas) e amastigotas (multiplicam-se dentro das células do hospedeiro) (Telleria et al., 2006).

Na natureza, a doença de Chagas consegue se manter como uma enzootia, passando de animal em animal através do inseto vetor. Entre os reservatórios estão os vertebrados domésticos (homem, cão, gato e roedores) e silvestres (marsupiais, quirópteros, carnívoros, endentados, roedores e primatas). O homem entra ocasionalmente no ciclo e o faz porque convive não apenas com o triatomíneo, mas também com os mamíferos infectados (Ceballos et al., 2006; Gonzalez et al., 2006).

A maior parte dos casos de infecção ocorre pela via vetorial, embora a via transfusional e a transmissão congênita sejam também epidemiologicamente importantes (Crisante et al., 2006; Sigman et al., 2006).

A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por febre, linfadenopatia e hepato-splenomegalia, no entanto normalmente ela passa despercebida, visto que seus sintomas são semelhantes aos de várias outras infecções. Os sinais característicos variam de acordo com a porta de entrada dos tripanossomas; quando esta é a conjuntiva ocular, ocorre edema bupalpebral unilateral, denominado sinal de Romana-Mazza. Quando o parasito penetra por outros locais da superfície corporal, a lesão é chamada de chagoma de inoculação. Entretanto, em alguns pacientes, principalmente crianças ou indivíduos imunodeficientes, quadros meníngeos graves e de insuficiência cardíaca (IC) podem estar associados, chegando a ocorrer óbito. É importante ressaltar que a gravidade da infecção depende também de outros fatores, como a virulência do parasito, o tamanho do inóculo e a suscetibilidade do paciente afetado (Almeida-Leite et al.; 2006; Cárdenas et al., 2004; Rassi et al., 2000).

Na fase crônica ocorre a forma indeterminada, na qual o paciente não apresenta sintomatologia importante do ponto de vista clínico, nem resultados anormais dos exames complementares do coração (ECG e radiografia do tórax) e do tubo digestório (esofagograma e enema opaco), sendo, assim, um portador

assintomático da doença de Chagas. Uma outra porcentagem de indivíduos infectados evolui com manifestações da doença, por exemplo, a miocardite grave com cardiomegalia, megaesôfago e megacólon, entre outras (Morell et al., 2006; Rassi Junior & Marin-Neto, 2000; Rassi Junior, 1998).

Na América Latina, as taxas de morbidade e mortalidade associadas à doença de Chagas possuem maior magnitude do que as relacionadas com a malária, a esquistossomose e a leishmaniose. Constitui, portanto, o maior problema de saúde pública das nações em desenvolvimento (DNDi, 2006; Lamas et al., 2006).

Durante anos, as estimativas apontavam a infecção de 20 milhões de pessoas pelo parasito e que outros 100 milhões se encontrariam em risco de contrair a doença (Castro et al., 2006; Guedes et al., 2006; OMS, 2002; Siles et al., 2006). Entretanto, Schofield et al. (2006) afirmam que, nos últimos 15 anos, grandes avanços foram conquistados no controle da doença de Chagas na maioria dos países endêmicos. Em 9 de junho de 2006, durante sua primeira reunião anual, a Comissão da Iniciativa do Cone Sul contra a doença de Chagas, criada em Brasília em julho de 1991, declarou formalmente que o Brasil está livre da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*. O Uruguai foi o primeiro país do Cone Sul a conseguir, em 1997, a interrupção da transmissão vetorial e transfusional. Em 1999, o Chile, áreas substanciais da Argentina, da Bolívia e do Paraguai, bem como partes da América Central também atingiram essa interrupção.

A prevalência global da doença foi reduzida das estimativas para 9,8 milhões de pessoas infectadas (NIH, 2006). De 100 milhões de pessoas que se estimava estar em risco de contrair a doença, 60 milhões vivem agora sem esse risco (Schofield et al., 2006).

Faz-se necessário ressaltar que, apesar dos grandes avanços epidemiológicos alcançados, está longe a erradicação da doença. Apesar do conhecimento sobre o ciclo de vida e do metabolismo do *T. cruzi* adquirido ao longo do tempo e dos conhecimentos da tecnologia farmacêutica, o tratamento medicamentoso disponível para a população infectada ainda se apresenta com reduzida eficácia na fase crônica e de alta toxicidade.

QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Os primeiros compostos desenvolvidos experimentalmente para o tratamento específico da tripanossomíase americana, após a sua descoberta em 1909, foram o atoxyl (arsênico), a tintura de fucsina, o tártaro emético (antimonial pentavalente) e o cloreto de mercúrio. Todos estes compostos se mostraram ineficazes no tratamento proposto (Croft, 1999; Coura & Castro, 2002).

No período de 1912 a 1962, diversos agentes quimioterápicos das mais variadas classes foram desenvolvidos e introduzidos na terapêutica. Em 1968, um médico brasileiro realizou uma avaliação metódica dos fármacos disponíveis para o *T. cruzi* em condições *in vitro* e *in vivo*. Com base nos resultados obtidos,

27 compostos e mais de 30 antibióticos foram considerados inativos (Brener, 1968). Evidenciou-se também que certos compostos avaliados apresentaram efeito supressor da parasitemia, porém não se mostraram curativos: o bisquinaldina, as aminoquinolinas (pentaquina, isopentaquina e primaquina), os arsênicos trivalentes, os aminoglicosídeos, nitrofuranos e os antibióticos (Brener, 1968).

Outros estudos sucederam-se, com os quais se buscava o desenvolvimento de novos fármacos e a avaliação de sua ação ante o parasito. Alguns desses estudos obtiveram resultados considerados bons ou excelentes, porém uma análise crítica das experiências realizada por Cançado (1968) apontou falhas metodológicas na execução dos estudos, uma vez que os resultados obtidos eram insatisfatórios e se baseavam apenas na redução dos sintomas clínicos, sendo ineficazes para a avaliação do tratamento da doença em sua fase crônica e não lograram a extinção do parasitismo.

Em 1967, foi introduzida na terapêutica uma classe de fármacos mais eficazes para o tratamento da doença de Chagas, os nitrofuranos (Bock et al., 1969). Entre estes, o nifurtimox revelou-se o mais efetivo. Em 1972, outro fármaco foi introduzido na terapêutica, este, um derivado 2-nitroimidazólico denominado de benznidazol, apresentou-se ainda mais eficaz para o tratamento proposto (Schofield et al., 2006). O nifurtimox é um 5-nitrofurano e o benznidazol, um 2-nitroimidazol (Croft et al., 2005).

O nifurtimox é tripanossomicida contra as formas amastigotas do *T. cruzi*. Seu mecanismo de ação envolve a redução parcial ao ânion radical seguida por auto-oxidação para regenerar o nitrofurano original e formar o radical ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila.

O *T. cruzi* mostra-se deficiente em mecanismos de destoxificação para metabólitos do oxigênio, particularmente o peróxido de hidrogênio, apresentando-se, assim, mais sensível ao estresse oxidativo do que às células vertebradas (Bernardes et al., 2006).

Desde a década de 1980, o nifurtimox teve a sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul. Isso se deu em razão da resistência apresentada pelas cepas e, sobretudo, pelo desinteresse do laboratório farmacêutico em continuar a produção de um medicamento não lucrativo (Coura & Castro, 2002).

Em contrapartida, a ação do benznidazol não envolve danos oxidativos. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, portanto pode ser pelo estresse reductivo, envolvendo a modificação covalente das macromoléculas em intermediários nitroreduzidos, ou por outras interações de nitroredução com os componentes do parasito (Urbina & DoCampo, 2003).

O nifurtimox e o benznidazol apresentam atividade significativa na fase aguda, com curas parasitológicas de até 80% em pacientes tratados, sendo esta cura definida como um resultado negativo para todos os testes parasitológicos e sorológicos (Rassi et al., 2000). Sua eficácia pode variar de acordo com a área

geográfica, provavelmente em consequência das diferenças na susceptibilidade ao fármaco entre diferentes cepas do *T. cruzi* (Coura et al., 1997).

Entretanto, o uso destes fármacos no tratamento da fase crônica é controverso. Os efeitos colaterais indesejáveis de ambos são o seu inconveniente principal, os mais freqüentemente observados no uso de nifurtimox são: anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência, complicações digestivas (náusea ou vômito, cólicas intestinais e diarreia) (Castro et al., 2006). No tratamento com benznidazol, as manifestações cutâneas são as mais notórias (hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas, edema generalizado, febre, linfadenopatia, dor articular e muscular) (Castro et al., 2006).

O benznidazol é totalmente absorvido por via digestiva. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em 2 a 4 horas, o tempo de meia-vida de eliminação plasmática é de 12 horas e seus metabólitos são eliminados rapidamente pela urina e pelas fezes (Roche, 2006). Sua dose diária é de 5 a 7,5 mg/kg de peso corporal, devendo ser dividida em duas ou três tomadas. O tratamento deve ser mantido por 30 a 60 dias consecutivos, durante a fase aguda, e por 60 dias durante a fase crônica. Crianças com menos de 40 kg podem receber 7,5 mg/kg de peso corporal, durante 60 dias (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005; Organização Panamericana de Saúde, 1999).

Em 1998, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estipulou exigências que devem ser atendidas por um fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas:

- cura parasitológica de casos agudos e crônicos;
- ação eficaz com uma única dose ou poucas doses;
- acessibilidade aos pacientes, graças a um custo reduzido;
- baixos efeitos colaterais e ausência de efeitos teratogênicos;
- nenhuma necessidade de hospitalização para o tratamento;
- nenhuma indução da resistência.

O desenvolvimento de fármacos mais efetivos e menos tóxicos requer um melhor conhecimento do ciclo de vida e do metabolismo do *T. cruzi*. Uma extensa distribuição da forma intracelular amastigota dos parasitos nos tecidos e células, durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas, é o fator que causa maior dificuldade para a ação de um fármaco específico, especialmente quando se compara com a leishmaniose, na qual as formas amastigotas estão restritas aos macrófagos (Croft, 1999).

Para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e eficazes, torna-se cada vez mais importante a seleção do alvo terapêutico, o que permitirá uma busca racional por agentes que provoquem a resposta desejada específica para o controle da doença. Vários processos bioquímicos têm sido apontados como alvos terapêuticos potenciais (DoCampo, 2001; Rodriguez, 2001) para a doença de Chagas, dentre eles destacam-se: enzima tripanotriosa redutasa (Salmon-Chemin et al., 2000), biossíntese de RNA mensageiro, biossíntese de lipídios, transilidase (Fairlamb, 1999) e enzimas do glicosomo envolvidas no metabolismo energético do parasito.

A tripanotonia redutasa do *T. cruzi* tem sido considerada uma enzima chave no metabolismo oxidativo do parasito. Os derivados nitrofuranos têm demonstrado que são capazes de produzir a inativação irreversível desta enzima. Chung et al. (2003) obtiveram um derivado a partir do nitrofural, o hidroximetilnitrofurazona, o qual se apresentou muito eficaz como tripanossomicida nos testes realizados *in vitro*.

O *T. cruzi* requer esteróis específicos para a proliferação e a viabilidade de células em todos os estágios de seu ciclo e é extremamente susceptível a inibidores da biossíntese de esteróis (Urbina, 2001). Os estudos realizados na Venezuela e no Brasil mostraram que possuem potencial ação tripanossomicida *in vitro* fármacos inibidores da biossíntese de esteróis, comercialmente disponíveis, aplicados com sucesso no tratamento de fungos, como o cetoconazol, o fluconazol e o itraconazol (Urbina, 2002). Entretanto, estudos demonstraram que estes compostos não são capazes de eliminar o parasito *in vivo* durante a infecção aguda ou crônica ou ainda de interromper o progresso da doença (Urbina, 2001; 2002).

Passou-se, então, a sintetizar novos compostos com similaridade estrutural com estes compostos estudados. Dentre eles, foram desenvolvidos derivados do triazol, o D0870 (Zeneca Farmacêutica) e o posaconazol (SCH 56592, Schering-Plough), capazes de induzir a cura parasitológica radical em modelos murinos das fases aguda e crônica da doença de Chagas. Estes foram os primeiros compostos relatados como capazes de curar a doença nessas fases. Foram também capazes de erradicar cepas de *T. cruzi* resistentes aos nitrofuranos e aos nitroimidazóis em ratos infectados, mesmo que estivessem imunossuprimidos. A notável atividade tripanossomicida destes derivados é atribuída à combinação de potência e atividade intrínseca seletiva anti-*Trypanosoma cruzi* e especiais propriedades farmacocinéticas (Urbina & DoCampo, 2003).

O posaconazol, um análogo estrutural do itraconazol, foi registrado em 2005 na União Européia, na Austrália e nos Estados Unidos, para a profilaxia e terapêutica de micoses sistêmicas refratárias e agentes convencionais, sendo também o candidato principal para pacientes com doença de Chagas. Mais recentemente, outros triazóis, tais como o ravuconazol (BMS 207 147; Bristol-Myers Squibb), o TAK-187 (Takeda Companhia Química) e o UR-9825 (Grupo Uriach), também demonstraram atividade tripanossomicida *in vitro* e *in vivo* (Urbina et al., 2003).

O *T. cruzi* contém uma protease responsável pela maior parte da atividade proteolítica do parasito em todos os seus estágios de vida, conhecida como cruzipaina ou GP57/51. Os inibidores seletivos desta protease obstruem a proliferação dos epimastigotas extracelulares e dos amastigotas intracelulares e interrompem a metaciclogênese, indicando que a enzima executa funções essenciais para a sobrevivência e o crescimento do parasito. Os inibidores da protease, como o N-metil-piperazina-r-ureia-F-hF-vinil-sulfonapentil ou o CRA-3316 (Celera Genomics), podem prolongar a sobrevivência e induzir a cura parasitológica em modelos murinos das fases aguda e crônica da doença de Chagas, com toxicidade mínima (Cazzulo et al., 2001).

Os tripanossomatídeos e os parasitos apicomplexos contêm organelas específicas, denominadas acidocalcissomos, organelas acídicas que contêm considerável fração do cálcio intracelular e possuem uma H⁺-ATPase vacuolar e/ou uma H⁺-pirofosfatase vacuolar para captação de H⁺, uma Ca²⁺/H⁺-ATPase, para captação de Ca²⁺ e uma Ca²⁺/nH⁺-ATPase para liberação de Ca²⁺. Bisfosfonados, análogos metabólicos do pirofosfato, são acumulados seletivamente no parasito e podem inibir as enzimas envolvidas nas reações inorgânicas e orgânicas do pirofosfato, tais como a síntese do farnesil-pirofosfato. Tais compostos têm potente e seletiva atividade anti-*Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo* (Urbina & DoCampo, 2003).

Parasitos tripanossomatídeos são absolutamente deficientes na biossíntese de purinas. A enzima-chave deste alvo é a hipoxantina-guanina-fosforibosil transferase (HGPRT), um alvo bioquímico válido nestes organismos. O interesse pela utilização do alopurinol no tratamento da doença de Chagas surgiu em virtude de seu mecanismo de ação e após a sua experimentação em animais, porém não demonstrou ação tripanossomicida na fase crônica da doença (Rassi et al., 2007). Este composto é um análogo da hipoxantina e age como um substrato alternativo da hipoxantina guanina-fosforibosil transferase, sendo incorporado ao RNA. Esta incorporação resulta em um nucleotídeo não fisiológico que bloqueia a síntese de um novo nucleotídeo. Diversos estudos já demonstraram sua potente ação tripanossomicida, porém estudos mais criteriosos devem ser realizados para avaliar a eficácia dos fármacos (Coura e Castro, 2002).

A seleção de compostos com potencial ação tripanocida, presentes em extratos de plantas e produtos naturais, levou à investigação de diversas classes de compostos responsáveis pela atividade antiparasitária, como naftoquinonas, terpenóides, isoflavonas e alcalóides (Bernardes et al., 2006). Um grande número de alcalóides tem sido testado para o *T. cruzi*. A atividade deles ante as formas epimastigotas foi associada à inibição da respiração celular. Dentre os compostos estudados, o que apresentou maior atividade antichagásica *in vitro* foi a apomorfina (Morello et al., 1994).

As plantas brasileiras *Virola surinamensis* e *Piper solmsianum*, oriundas da floresta amazônica e da mata atlântica, respectivamente, demonstraram ser ricas fontes de tetrahidrofurano, apresentando uma potente atividade *in vitro* contra as formas tripomastigotas do parasito (Bernardes et al., 2006).

Lirussi et al. (2004) realizaram estudos *in vitro* sobre as formas epimastigotas do *T. cruzi* com 17 extratos de plantas utilizadas na medicina chinesa. Sete extratos de plantas apresentaram uma atividade inibitória em relação aos parasitos, com percentual inferior a 25%; seis apresentaram resultados entre 25% e 60% e quatro plantas apresentaram uma atividade excelente, com a inativação de 100% dos parasitos, sendo estas a *Lithospermum erythrorhizon*, a *Saussurea lappa*, a *Melia toosendan* e a *Cinnamomum cassia*.

Estudos com os naftoimidazóis, derivados das naftoquinonas, substâncias encontradas nos ipês, árvores do gênero *Tabebuia*, demonstraram que estes

compostos são capazes de eliminar as três formas evolutivas do *T. cruzi* em células de camundongo, em cultura *in vitro*. Outros compostos derivados das naftoquinonas também têm demonstrado ação anti-*Trypanosoma cruzi*. Barreto (2006) sintetizou 60 derivados de naftoquinonas pertencentes aos grupos dos imidazóis, oxazóis, fenoxazóis e das fenazinas e com eles fez ensaios com formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*. Os compostos mais ativos foram três naftoimidazóis derivados de β -lapachona com grupamento fenila (N1), 3-indolila (N2) ou p-metil fenila (N3) ligado ao anel imidazólico. Estudos com N1, N2 e N3 demonstraram uma potente atividade sobre tripomastigotas, com potencial de toxicidade nas células mamíferas.

A própolis tem sido extensamente utilizada na medicina atual por apresentar uma potente atividade antimicrobiana. Um extrato etanólico de própolis apresentou atividade *in vitro* ante as formas epimastigotas, tripomastigotas e intracelular amastigotas do *T. cruzi*. Atribui-se esta atividade à presença de flavonóides no extrato (Higashi & De Castro, 1994). Contudo os experimentos *in vivo* apresentam resultados controversos. Marcucci et al. (2001) realizaram um estudo com a própolis brasileira, oriunda do estado do Paraná, no qual quatro derivados do ácido hidroxicinâmico foram isolados e testados com tripomastigotas do *T. cruzi*, apresentando um resultado abaixo da substância-controle, o cristal de violeta.

NOVAS ALTERNATIVAS DE VEICULAÇÃO DO BENZNIDAZOL

Apesar de não ser o fármaco ideal, o benznidazol é o de escolha para o tratamento da doença de Chagas e o único comercializado em diversos países da América do Sul. O conhecimento aprofundado sobre as propriedades físico-químicas e biológicas deste fármaco e os conhecimentos adquiridos sobre formas mais eficazes de vetorização poderão possibilitar o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença, que se tornem disponíveis para a população em um curto espaço de tempo e com menor custo que o de uma nova molécula a ser introduzida na terapêutica.

Hidrosolubilização do Benznidazol

A solubilidade de um fármaco constitui requisito prévio à absorção e à obtenção de resposta clínica para a maioria dos medicamentos administrados por via oral. O sistema de classificação biofarmacêutica constitui uma ferramenta científica para a classificação de fármacos com base em sua solubilidade em água e permeabilidade intestinal. Segundo este sistema os fármacos estão distribuídos em quatro categorias: I. Elevada solubilidade e elevada permeabilidade; II. Reduzida solubilidade e elevada permeabilidade; III. Elevada solubilidade e reduzida permeabilidade e IV. Reduzida solubilidade e reduzida permeabilidade (Lindenberg et al., 2004).

O benznidazol, classificado no grupo II, é fracamente solúvel em água e nos fluidos aquosos e sua absorção é limitada por sua velocidade de dissolução e solubilidade. A aplicação das técnicas de dispersão sólida ou de obtenção de lipossomas tem como objetivo alterar a sua solubilidade.

Dispersões Sólidas

As dispersões sólidas são obtidas mediante um processo tecnológico que consiste em dispersar um componente farmacologicamente ativo (fármaco) em um carreador ou matriz, no estado sólido, a fim de melhorar a solubilidade e a estabilidade, aumentar a taxa de dissolução, modular a ação terapêutica e a permeabilidade do fármaco pelas membranas absorptivas (Habib, 2001). A utilização de dispersões sólidas para a obtenção de complexos poderá ser utilizada na produção de comprimidos de liberação imediata, aumentando, assim, a absorção e diminuindo a concentração do fármaco administrado ao paciente.

Lipossomas

Neste direcionamento, Morilla et al. (2004) e Lamas et al. (2006) delinearão lipossomas que carregam o benznidazol com a finalidade de desenvolver uma forma farmacêutica que permitisse superar a baixa solubilidade do benznidazol em meio aquoso. Desse modo, seria possível aumentar a seletividade e reduzir a toxicidade do fármaco, contudo o método carrega como desvantagem a necessidade da administração por via endovenosa, o que representa um incômodo em tratamentos diários e prolongados. Outra desvantagem está relacionada com a viabilidade comercial de tal forma farmacêutica, uma vez que seu custo é consideravelmente mais elevado. Por se tratar de um medicamento destinado a uma doença negligenciada, o custo do produto final está relacionado com o acesso da população a esta alternativa terapêutica.

Suspensão

A tolerabilidade do benznidazol é maior em crianças do que em adultos, contudo este fármaco está disponível apenas para a administração oral, na forma farmacêutica de comprimido de liberação imediata, que não é a mais adequada para neonatos, crianças e idosos, em virtude das dificuldades de deglutição. Faz-se necessário o desenvolvimento de uma forma farmacêutica líquida que atenda às necessidades desta parcela da população; esta deve se apresentar na forma de suspensão, na qual as partículas do fármaco ficam finamente divididas e dispersas em um sistema homogêneo. A redução do tamanho das partículas possibilita o aumento da área superficial, acarretando, conseqüentemente, o aumento da absorção no trato gastrointestinal (Aulton, 2005). Atualmente o

Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) da UFPE, em parceria com o LAFEPE, desenvolve tal forma farmacêutica.

Comprimido de Liberação Prolongada

O único comprimido disponível no mercado apresenta uma liberação convencional do fármaco, o que requer a administração de duas a três doses diárias (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005). Tal medicamento foi desenvolvido pelo grupo Roche na década de 1970 e sua tecnologia foi cedida ao LAFEPE, que continuará a produzi-lo conforme preconiza o registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no ano de 2006. A veiculação deste fármaco em um comprimido de liberação prolongada permite a redução da toxicidade, graças à redução dos picos plasmáticos respectivos a cada administração do medicamento. O LTM e o LAFEPE já estão desenvolvendo tal forma farmacêutica com base nos sistemas matriciais. Estes sistemas, constituídos de polímeros hidrofílicos, liberam o fármaco de forma gradativa pelo mecanismo de dissolução e representam uma alternativa de baixo custo, quando comparada a outras técnicas de liberação controlada (Soares Sobrinho, 2007).

Dose Fixa Combinada

A fim de melhorar a conveniência do tratamento, formulações multidrogas na forma de dose fixa-combinada estão sendo amplamente promovidas como regime de primeira linha em programas de acesso a diversos tratamentos (Farias et al., 2006). O termo dose fixa-combinada (DFC) refere-se à associação de classes variadas de drogas em diversas combinações e em uma única forma farmacêutica. Dentre as vantagens de se desenvolver uma associação estão: baixo custo, eficácia e tolerabilidade semelhantes a outros esquemas terapêuticos, melhor adesão ao tratamento e menor número de comprimidos/cápsulas ingeridos. Esta última é uma das mais importantes características, visto que a situação contrária é justamente o principal motivo da ineficácia de grande parte dos tratamentos (Laurent et al., 2004). Observou-se, também, melhoramento de propriedades farmacocinéticas e biofarmacêuticas (solubilidade e permeabilidade) dos fármacos envolvidos, o que resulta em formulações mais estáveis (Kapoor et al., 2006).

Rassi et al. (1999) demonstraram um efeito protetor do benznidazol contra a reativação parasitária em pacientes chagásicos crônicos tratados com corticosteróides. Esse estudo corrobora os achados experimentais em camundongos, segundo os quais uma droga tripanossomicida previne a reativação da doença quando usada em associação com drogas imunossupressoras.

As evidências apontadas pelo estudo de Rassi et al. (1999) sugerem um possível benefício do uso de um tripanossomicida, como o benznidazol, na quimioprofilaxia primária da reativação de doença de Chagas em pacientes

chagásicos que vierem a necessitar do uso prolongado de corticosteróides. Contudo, deve-se analisar as evidências já existentes na literatura que corroborem tal indicação e quais os possíveis riscos associados (Nishioka, 2002).

Uma alternativa terapêutica de dose fixa combinada por meio da associação do benznidazol a corticosteróides visa à administração de corticosteróides em doses imunodepressoras, o que ocasiona uma queda de imunidade em pacientes chagásicos na forma indeterminada da fase crônica. Os parasitos alojados nos tecidos passam para a circulação sistêmica, possibilitando, assim, sua eliminação pelo benznidazol e, conseqüentemente, a redução da concentração de parasitos na circulação sanguínea.

Pode contribuir para a terapêutica atual da doença de Chagas o desenvolvimento de dose fixa combinada por meio da associação do benznidazol com fármacos inibidores da biossíntese de esteróis, como o cetoconazol, fluconazol ou itraconazol, fármacos estes já comercializados no mercado nacional de forma isolada e aplicados com sucesso no tratamento de fungos. O *T. cruzi* requer esteróis específicos para a proliferação e a viabilidade de suas células em todos os estágios de seu ciclo, sendo extremamente susceptível a inibidores da biossíntese de esteróis.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por uma terapia medicamentosa adequada ao tratamento da doença de Chagas continua a ser um desafio para muitos pesquisadores desde a descoberta da moléstia em 1909. Quase um século se passou, diversas moléculas foram sintetizadas e estudadas, duas delas foram introduzidas na terapêutica, mas desde a década de 1980 apenas o benznidazol permanece disponível em território nacional.

Pesquisas promissoras apontam novas moléculas com atividade terapêutica anti-*Trypanosoma cruzi* e baixos efeitos tóxicos, entretanto ainda há um grande caminho a ser percorrido para que a comunidade científica e as indústrias farmacêuticas tornem disponíveis no mercado consumidor novos medicamentos seguros e eficazes. Cabe ainda ressaltar a possibilidade de uma melhor vetorização do princípio ativo atualmente utilizado no combate à doença de Chagas, o benznidazol, de modo que sejam oferecidas aos pacientes alternativas mais eficazes, seguras e adequadas ao tratamento da doença.

O Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) e o Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) vêm contribuindo para a pesquisa e o desenvolvimento de sistemas de vetorização, como dispersões sólidas, comprimido de liberação clássica e prolongada e suspensão à base de benznidazol, com o fim de ampliar as alternativas terapêuticas para o combate à doença de Chagas. Este é um grande passo para a melhora do tratamento, visto que as apresentações, em sua maioria, são inéditas e garantirão uma maior segurança à terapia já utilizada.

ABSTRACT

Delineation of therapeutic alternatives for Chagas disease treatment

Chagas disease global prevalence is estimated to be 9,8 million of infected people. The battle against this disease, which results from the infection by *Trypanosoma cruzi*, a parasite belonging to an exclusively American ecosystem, has already had an important success in the interruption of the vectorial and transfusional transmission of the disease in the majority of the Southern Cone endemic countries. However, these 9,8 million of infected people do not have an adequate medical treatment. The current therapeutic has the benznidazole as the choice drug in tablets of immediate release; such pharmaceutical form does not favor the administration in neonates, children and aged. Scientists worldwide have worked to develop new therapeutic alternatives for treatment, through the discovery of new essential biochemical targets in the parasite. Several chemotherapeutic agents have already been identified and continue to be tested, almost a century after the discovery of the disease, in 1909, by Carlos Chagas. This critical review approached the search for new chemotherapeutic agents and suggests that improved formulations of benznidazole may have therapeutic advantages, with potential important benefits for the affected population.

KEYWORDS: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. Chemotherapy. Benznidazole. Drug development. Specific treatment.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) e aos órgãos financiadores de pesquisa CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

1. Almeida-Leite CM, Galvão LMC, Afonso LCC, Cunha FQ, Arantes RME. Interferon- γ induced nitric oxide mediates *in vitro* neuronal damage by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Neurobiol Dis* 25: 170-178, 2007.
2. Aulton ME (ed). *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.
3. Barreto RFSM. Estudo do mecanismo de ação de derivados naftoimidazólicos de Beta-lapachona sobre *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro [Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular – IOC/FIOCRUZ], 2006.
4. Bernardes LSC, Kato MJ, Albuquerque S, Carvalho I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. *Bioorg Med Chem* 14: 7075-7082, 2006.
5. Bock M, Gonert R, Haberkorn A. Studies with Bay 2502 on animals. *Bol Chil Parasitol* 24: 13-19, 1969.
6. Brener Z. Terapêutica experimental da doença de Chagas. In: Cançado JR. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte: Imprensa Oficial de Minas Gerais, p. 510-16, 1968.

7. Cançado JR. Tratamento da doença de Chagas. In: Cançado JR. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte: Imprensa Oficial de Minas Gerais, p. 517-540, 1968.
8. Cárdenas RC, Gómez FE, Rodríguez AM, López PAR, Viera MH, Larios FR. Active Transmission of Human Chagas Disease in Colima México. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 9: 363-368, 2004.
10. Castro JA, De Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol* 25: 471-479, 2006.
11. Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des* 7: 1143-1156, 2001.
12. Ceballos LA, Cardinal MV, Vazquez-Prokopec GM, Lauricella MA, Orozco MM, Cortinas R, Schijman AG, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE. Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. *Acta Trop* 98: 286-296, 2006.
13. Chagas C. Nova trypanosomiase humana. *Gaceta Medica da Bahia* 40: 433-440, 1909.
14. Chung MC, Guido RV, Martinelli TF, Gonçalves MF, Polli MC, Botelho KC, Varanda EA, Colli W, Miranda MT, Ferreira EI. Synthesis and *in vitro* evaluation of potencial antichagasic hydroxymethyl nitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. *Bioorg Med Chem* 11: 4779-4783, 2003.
15. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (supl. III), 2005. 30 p.
16. Coura JR, Abreu LL, Willcox HPF, Petana W. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 139-144, 1997.
17. Coura JR, Castro SL. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24, 2002.
18. Crisante G, Rojas A, Teixeira MMG, Añez N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop* 98: 247-254, 2006.
19. Croft SL, Barret MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21: 508-512, 2005.
20. Croft SL. Pharmacological Approaches to Antitrypanosomal Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 215-220, 1999.
21. Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America. A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 603-612, 2002.
22. DNDi – *Drugs for Neglected Diseases Initiative*. Disponível em: <<http://www.dndi.org.br/>>, 2006.
23. Do Campo R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des* 7: 1157-1164, 2001.
24. Fairlamb AH. Future prospects for the chemotherapy of Chagas' disease. *Medicina* 59: 179-187, 1999.
25. Farias SRQ, Lavra ZM, Medeiros FPM, Rolim Neto, PJ . Uma nova proposta terapêutica para o tratamento da AIDS: da monoterapia à dose fixa combinada. *Revista Brasileira de Farmácia*, 87: 92-97, 2006.
26. Galvão C. Sistemática dos Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. *Entomol Vect* 10: 511-530, 2003.
27. Gaunt M, Miles M. The Ecotopes and Evolution of Triatomine Bugs (Triatominae) and their Associated Trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 557-565, 2000.
28. Gonzalez MS, Hamedí A, Albuquerque-Cunha JM, Nogueira NF, De Souza W, Ratcliffé NA, Azambuja P, Garcia ES, Mello CB. Antiserum against perimicrovillar membranes and midgut tissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*. 114: 297-304, 2006.
29. Guedes PMM, Fietto JLR, Lana M, Bahia MT. Advances in Chagas disease chemotherapy. *Anti-Infect Agents Med Chem* 5: 175-186, 2006.
30. Habib MJ. *Pharmaceutical solid dispersion technology*. Technomic Publishing Co. 2001. 97p.
31. Higashi KO, De Castro SL. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. *J Ethnopharmacol* 43: 149-155, 1994.

32. Kapoor N, Khandavalli SP, Anchagnula R. Simultaneous determination of lamivudine and stavudine in antiretroviral fixed dose combinations by first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 41: 761-765, 2006.
33. Lamas MC, Villagi L, Nocito I, Bassani G, Leonardi D, Pascutti F, Serra E, Salomón CJ. Development of parenteral formulations and evaluations of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *Int J Pharm* 307: 239-243, 2006.
34. Laurent C, Kouanfack C, Koulla-Shiro S, Nkoué N, Bourgeois A, Calmy A, Lactuock B, Nzeusseu V, Mougnotou R, Peytavin G. Effectiveness and safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine, and lamivudine in HIV-1-infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial. *The Lancet* 364: 29-34, 2004.
35. Lindenberg M, Koop S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm* 58: 265-278, 2004.
36. Lirussi D, Li J, Prieto JM, Gennari M, Buschiazoo H, Rios JL, Zaidenberg A. Inhibition of Trypanosoma cruzi by plant extracts used in Chinese medicine. *Fitoterapia* 75: 718-723, 2004.
37. Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PHM, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 74: 105-112, 2001.
38. Morell M, Thomas MC, Caballero T, Alonso C, López MC. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late Trypanosoma cruzi infection. *Vaccine* 24: 7046-7055, 2006.
39. Morello A, Lipchenca I, Cassels BK, Speisky H, Aldunate J, Repetto Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of Trypanosoma cruzi. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocr* 107: 367-371, 1994.
40. Morilla MJ, Montanari JA, Prieto MO, Lopez MO, Petray PB, Romero EL. Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. *Int J Pharm* 278: 311-318, 2004.
41. National Institutes of Health – NHI. Disponível em: www.nih.gov, 2006.
42. Nishioka SA. Benznidazol na quimioprofilaxia primária da reativação de doença de Chagas em chagásicos crônicos em uso de corticosteróides em doses imunodepressoras: há evidência suficiente para a recomendação do seu uso? *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 82-85, 2002.
43. Organização Mundial de Saúde. Control of Chagas disease. *Tech. Rep. Ser* 905: 1-109, 2002.
44. Organização Panamericana de Saúde - Organização Mundial de Saúde. Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas. Conclusiones de reunión de especialistas. OPC/HCP/HCT/140/99, Rio de Janeiro, 32 p., 1998. In: *Revista de Patologia Tropical* 28: 247-279, 1999.
45. Rassi A, Amato Neto VA, Siqueira AF, Ferriolli Filho F, Amato VS, Rassi Junior A. Efeito protetor do benznidazol contra a reativação parasitária em pacientes cronicamente infectados pelo Trypanosoma cruzi e tratados com corticóide em virtude de afecções associadas. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 475-482, 1999.
46. Rassi A, Luquetti AO, Rassi, JR A, Rassi GG, Rassi SG, Silva IG, Rassi AG. Specific treatment for Trypanosoma cruzi: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 76: 58-61, 2007.
47. Rassi A, Rassi Junior A & Rassi GG. Fase Aguda. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (Org.). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª. ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 2000. p 231-245.
48. Rassi Junior A, Marin-Neto JA. Cardiopatia chagásica crônica: estado da arte. *Rev Soc Cardiol São Paulo* 10: VI-XXXII, 2000.
49. Rassi Junior A, Rassi A. Cardiopatia Chagásica Crônica. In: Porto CC (Org.). *Doenças do Coração. Prevenção e Tratamento*. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., v. 1, p. 798-807, 1998.
50. Roche Farmacêutica Química. Disponível em: www.roche.com.br/Products/rochagan_PT.htm?WB_CMODE=PresentationUnpublished?setcategory=1, 2006.

51. Rodriguez JB. Specific molecular targets to control tropical diseases. *Curr Pharm Des* 7: 1105-1116, 2001.
52. Salmon-Chemin L, Lemaire A, De Freitas S, Deprez B, Sergheraert C, Davioud-Charvet E. Parallel synthesis of a library of 1,4-naphthoquinones and automated screening of potential inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem Lett* 10: 631-635, 2000.
53. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of chagas disease control. *Trends Parasitol* 22: 583-588, 2006.
54. Sigman L, Sánchez VM, Turjanski AG. Characterization of the farnesyl pyrophosphate synthase of *Trypanosoma cruzi* by homology modeling and molecular dynamics. *J Mol Graph Model* 25: 345-352, 2006.
55. Siles R, Chen SE, Zhou M, Pinney KG, Trawick ML. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potencial application in the treatment of Chagas' disease. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 4405-4409, 2006.
56. Soares Sobrinho JL. Sistemas de Vetorização de Fármaco para Comprimidos de Liberação Clássica e Prolongada a Base de Benznidazol. Recife [Dissertação De Mestrado em Ciências Farmacêuticas – UFPE], 2007.
57. Telleria J, Lafay B, Virreira M, Barnabé C, Tibayrebc M, Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp Parasitol* 114: 279-288, 2006.
58. Urbina JA, DoCampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19: 495-501, 2003.
59. Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, Romanha AJ. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents* 21:39-48, 2003.
60. Urbina JA. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des* 8: 287-295, 2002.
61. Urbina JA. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr Opin Infect Dis* 14: 733-741, 2001.
62. WebMedicos. Disponível em: www.webmedicos.com.br/detalhe_artigo.asp?Id=556&Tema=FARMACOLOGIA, 2006.
63. World Health Organization - WHO. Disponível em: www.who.int/en/, 2006.