



# Toxicidade de fármacos nitrofurânicos

Bosquesi, P.L.<sup>1</sup>; Almeida, A.E.<sup>1</sup>; Blau, L.<sup>1</sup>, Menegon, R.F.<sup>1</sup>; Santos, J.L.<sup>1</sup>; Chung, M.C.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Lapdesf, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

Recebido 10/02/2009 - Aceito 04/03/2009

## RESUMO

**Durante o planejamento estrutural de novos fármacos, é possível prever a influência de grupamentos específicos na atividade farmacológica. Entre estes, encontra-se o grupo nitro, que possui potencial atividade antimicrobiana, estando presente em diversos fármacos como o metronidazol, nitrofurazol, furazolidona, oxamniquina, cloranfenicol, entre outros. Também, a introdução do grupo nitro na molécula pode alterar as propriedades físico-químicas e eletrônicas da substância, estando presente em fármacos de outras classes terapêuticas como anti-úlceras, ansiolítico, antiinflamatório. Entretanto, restrições têm sido apontadas para o planejamento de novos fármacos contendo este grupo, devido à toxicidade relacionada. Este estudo trata-se da revisão sobre a toxicidade de compostos nitrofurânicos, bem como os possíveis mecanismos e a utilização do método de latência na diminuição desta toxicidade.**

*Palavras-chave:* nitrofuranos; toxicidade; mecanismos; pró-fármacos

## INTRODUÇÃO

O planejamento de novas substâncias com atividade terapêutica, envolve uma série de estratégias e conhecimento da influência da introdução de grupamentos químicos específicos nas propriedades físico-químicas e eletrônicas da molécula e conseqüentemente em sua atividade biológica (Wermuth, 2006).

O grupo nitro está presente em uma variedade de substâncias que apresentam atividade antimicrobiana e antiparasitária, como por exemplo: furazolidona (I) metronidazol(II)secnidazol(III),tinidazol(IV),cloranfenicol (V), nitrofurantoína (VI), nitrofurazol (VII, nitrofurazona, NF) - (atividade antimicrobiana); oxamniquina (VIII) - atividade esquistossomicida); benznidazol (IX, BZN), nifurtimox (X) (atividade antichagásica), como também em outras diversas

classes terapêuticas como: ranitidina (XI, anti-úlceras, anti-H<sub>2</sub>), nimesulida (XII, antiinflamatório), clonazepam (XIII, ansiolítico), conforme mostra a Figura 1.

A utilização do grupo nitro na obtenção de novas moléculas apresenta uma restrição devido ao aumento da potencialidade de toxicidade do mesmo. No entanto, é possível diminuir esta toxicidade utilizando a estratégia de latência, na obtenção de pró-fármacos conforme dados de nosso laboratório (Chung et al., 2005; Silva et al., 2005).

Este estudo é uma revisão da toxicidade de compostos nitrofurânicos, os prováveis mecanismos envolvidos, bem como os resultados obtidos para o hidroximetilnitrofurazol, um pró-fármaco de nitrofurazol, obtido pela estratégia de latência, com toxicidade diminuída.

## Compostos nitroheterocíclicos

Os primeiros compostos nitroheterocíclicos utilizados na quimioterapia foram os nitrofuranos. Três deles, o nitrofurazol (nitrofurazona, NF), a furazolidona e a nitrofurantoína, são utilizados no tratamento de vários tipos de infecções bacterianas por mais de 50 anos.

Alguns derivados de 5-nitrofurano, além de possuírem propriedades antibacterianas e antifúngicas, apresentam atividade antiprotozoária, como é o caso do nifurtimox, usado no tratamento da tripanossomíase e leishmaniose (Capobianco-Perez & Cordero de Troconis, 2001).

Entre as várias substâncias químicas mutagênicas existentes, os nitrocompostos são considerados um dos grupos mais importantes. Estudo de nosso grupo mostra que os compostos nitrofurânicos são potenciais agentes mutagênicos devido ao grupo nitro presente na molécula (Güido et al., 2001).

A mutagenicidade e a possível carcinogenicidade dos nitrofuranos devem-se, provavelmente, à presença de dois grupos potencialmente reativos: o nitro na posição 5 e os substituintes (R) na posição 2 do anel furânico, Figura 2 (McCalla, 1983; Kobierska-Szeliga & Czczot, 1994; Mecca et al., 2002; Hiraku et al., 2004).

\*Autor correspondente: Chung Man Chin - Departamento de Fármacos e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, UNESP - Rodovia Araraquara - Jaú, km 01 - Caixa Postal 502 - CEP 14801-902 - Araraquara - SP, Brasil - Telefone: +55-(16) 3301-6970 - Fax: +55-(16) 3301-6960 - e-mail: chungmc@fcfar.unesp.br

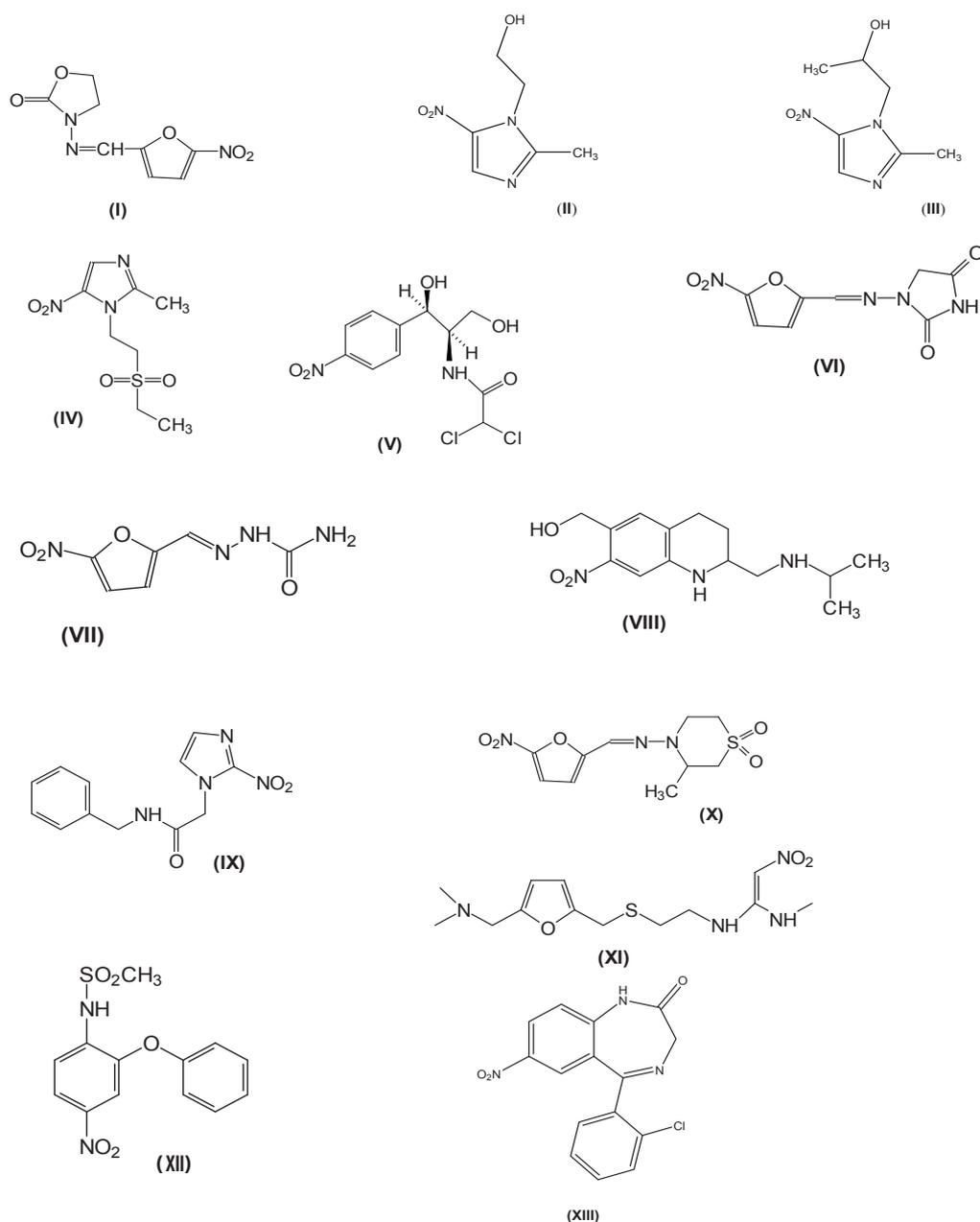


Figura 1. Estrutura química de fármacos que apresentam o grupo nitro. furazolidona **(I)** metronidazol **(II)** secnidazol **(III)**, tinidazol **(IV)**, cloranfenicol **(V)**, nitrofurantoína **(VI)**, nitrofuraz **(VII)**, oxamniquina **(VIII)**, benznidazol **(IX)**, nifurtimox **(X)**, ranitidina **(XI)**, nimesulida **(XII)**, clonazepam **(XIII)**.

O esquema apresentado na Figura 2 mostra os mecanismos, propostos na literatura, de toxicidade e mutagenicidade dos nitrofurânicos (McCalla, 1983; Mecca et al., 2002; Hiraku et al., 2004). Em sistemas bacterianos, o requisito básico para a ação mutagênica de compostos nitrofurânicos é a redução promovida por, no mínimo, três nitrorreductases. Estas reduções resultam de reações em cadeia, que levam à formação de espécies eletrofílicas que podem reagir com o DNA.

Alguns estudos afirmam que a redução do nitro é pré-requisito para a atividade biológica (Edwards, 1993; Kedderis & Miwa, 1988). A completa redução envolve a adição de seis elétrons para formar a amina

via o intermediário nitroso (2e-) e hidroxilamínico (4e-), entretanto alguns fármacos não procedem além da formação da hidroxilamina. A Figura 3 mostra a redução desses compostos (Tocher, 1997).

Estudo de relações quantitativas entre estrutura e atividade (QSAR) sobre 2-nitrocompostos aromáticos utilizados como agentes antibacterianos demonstraram que o aumento da densidade eletrônica no carbono da posição 2 do anel aromático, aumenta o efeito mutagênico. Possivelmente, a maior densidade eletrônica neste carbono deva estabilizar o anel furânico e aumentar a probabilidade para a reação com o DNA (Debnath et al., 1993).

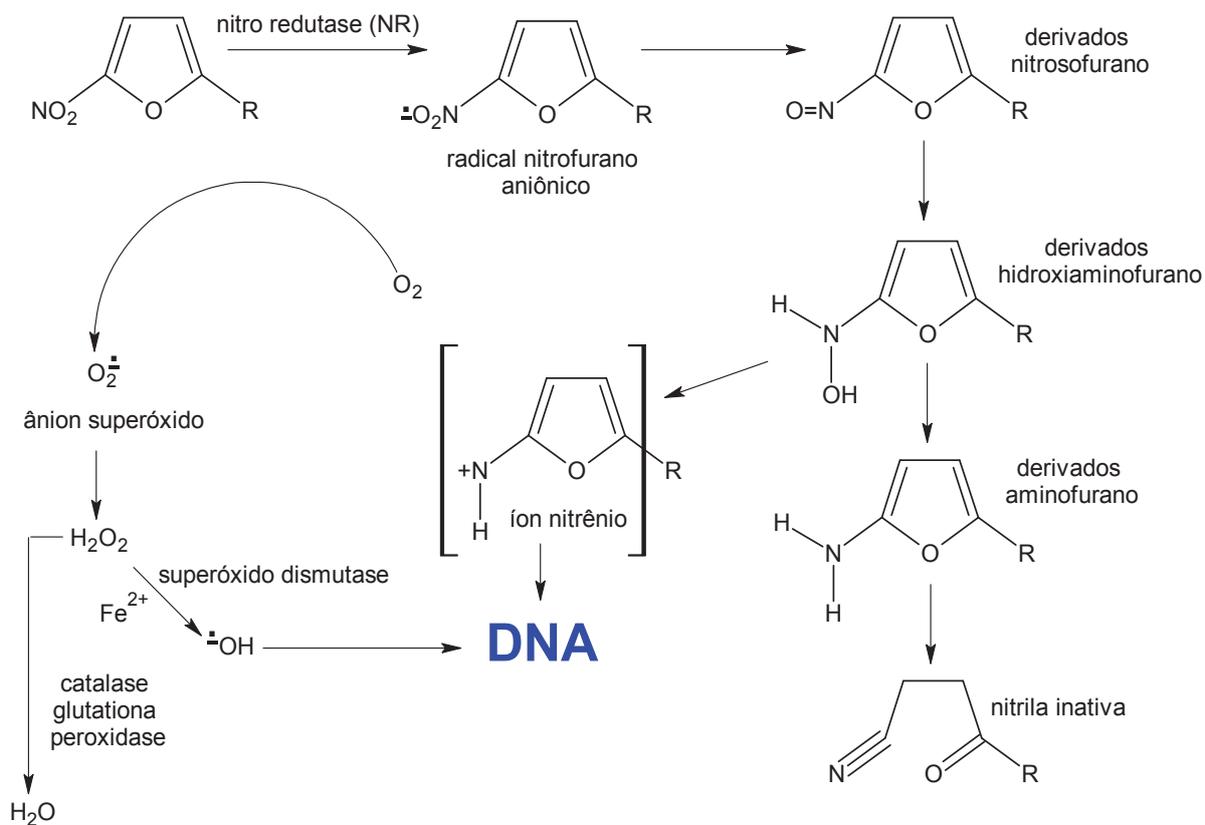


Figura 2. Possíveis mecanismos de mutagenicidade dos nitrofurânicos.

Fonte: Adaptado de McCalla, 1983; Mecca et al., 2002; Hiraku et al., 2004.

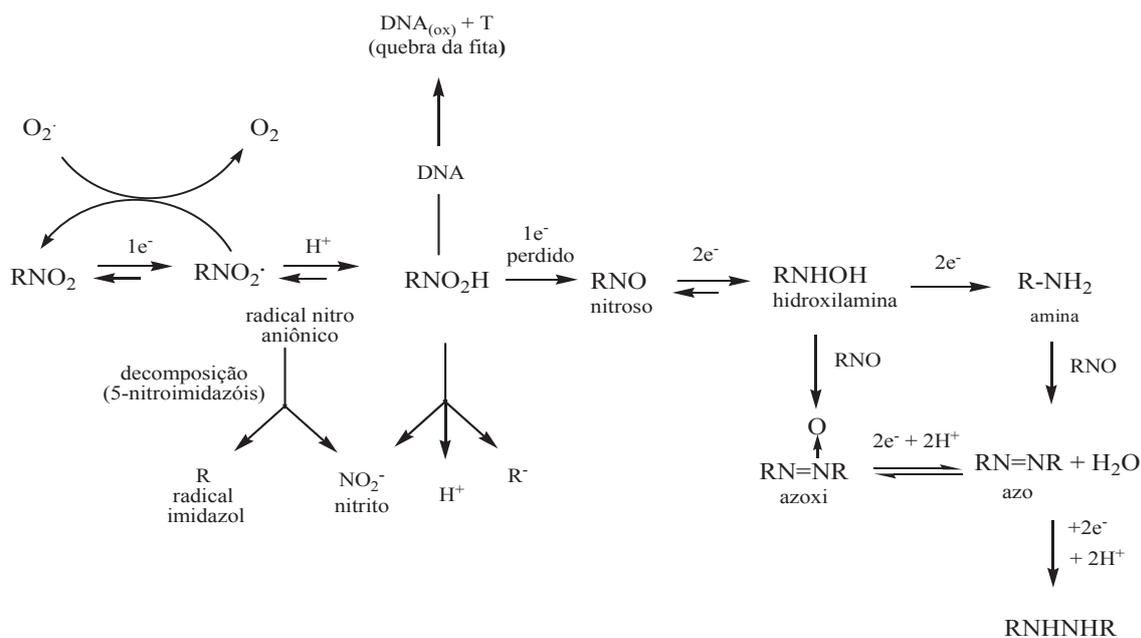


Figura 3. Ativação por redução de compostos nitroaromáticos (Tocher, 1997).

O alvo destes compostos é o DNA, a redução dos mesmos causa quebra e desestabilização da hélice (Edwards, 1993). O grau do dano é relacionado com a composição da fita, e é aumentado com a presença de Adenina + Timina no DNA. A identificação do agente causador do dano não está bem elucidada, já que os produtos finais da redução desses compostos são inativos, mas a redução dos mesmos na presença do DNA resulta em dano, sugerindo que esse é causado pelos pequenos intermediários formados pela adição de ao menos 4 elétrons (Tocher, 1997).

O fato de estes compostos terem sido utilizados largamente em animais para consumo humano, nos últimos anos, levou diferentes comitês internacionalmente reconhecidos, como o IARC (*International Agency for Research on Cancer*), a JEFCA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) e o SCAN (*Scientific Committee on Animal Nutrition*) a realizar avaliações à cerca dos riscos oferecidos pelos compostos nitrofurânicos (Ministério da Saúde, 2003).

A JEFCA considerou que o NF é um cancerígeno secundário e que a furazolidona possui efeitos carcinogênicos e genotóxicos. O IARC considerou que a furaltadona é um agente possivelmente carcinogênico para humanos e que a nitrofurantoina não é classificável relativamente à sua carcinogenicidade para humanos (Ministério da Saúde, 2003).

Neste sentido, pressupõe-se que o NF possui atividade carcinogênica devido à alteração no DNA (Figura 4). Adicionalmente, a atividade estrogênica do NF pode contribuir também para a carcinogênese, sabendo que o estrogênio pode causar câncer em órgãos reprodutivos de fêmeas, tais como mamas e útero (Hiraku et al., 2004).

É relatado que os metabólitos do estrogênio induzem ao dano oxidativo do DNA, considerando que o estrogênio causa proliferação celular por si próprio. Desta forma, o NF possui dois mecanismos distintos que contribuem para carcinogênese: o dano ao DNA causado pelos metabólitos gerados e aumento da proliferação celular (Hiraku et al., 2004).

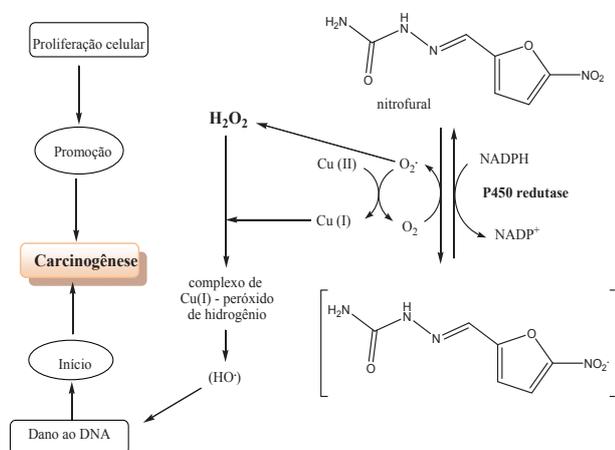


Figura 4. Mecanismo proposto de dano ao DNA e indução de carcinogênese pelo nitrofurural (Hiraku et al., 2004).

Entretanto, apesar dos relatos de toxicidade destes compostos, esforços tem sido realizados no sentido de diminuir este efeito deletério. Um destes exemplos foi observado em nossos estudos com o pró-fármaco hidroximetilnitrofurural, NFOH (Figura 5) um candidato a fármaco antichagásico, por nós sintetizado, obtido através da modificação molecular de nitrofurural (Chung, 1996). Outro estudo de nosso grupo mostrou que esta substância, era o intermediário de síntese para a obtenção de pró-fármacos recíprocos dipeptídicos derivados de primaquina e nitrofurural (Chung et al, 2003). Os resultados dos estudos de atividade biológica em culturas do epitélio renal LLC-MK<sub>2</sub> de macaco *Rhesus* infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, demonstraram atividade superior ao composto inicialmente proposto e também superior ao nitrofurural (fármaco matriz) e ao benzimidazol, fármaco utilizado na terapêutica. Devido, ainda, a presença do grupo nitro na molécula, a toxicidade (genotoxicidade) provocada no mesmo poderia ser impeditivo para o prosseguimento das pesquisas.

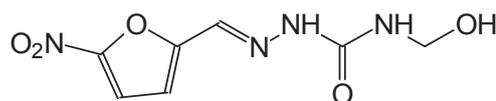


Figura 5. hidroximetilnitrofurural

### Estudo de genotoxicidade (mutagenicidade)

A avaliação da genotoxicidade pode ser realizada nos diferentes passos de interação do agente mutagênico com o DNA ou de seus efeitos. A capacidade do composto se ligar ao material genético pode ser avaliada pela observação de adutos no DNA. A capacidade de quebrar o DNA pode ser estimada por eluição alcalina ou pelo teste de Cometa e as mutações cromossômicas e/ou genômicas podem ser quantificadas pelo testes do micronúcleo ou aberrações cromossômicas (van Goethem et al., 1997).

A função primária dos testes de toxicologia genética é investigar, usando células ou organismos, o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas ou que possam ser transmitidas às futuras gerações (da Silva et al., 2003).

Na citogenética clássica, cromossomos são estudados diretamente por observação e contagem de aberrações cromossômicas na metáfase. Este estudo produz uma análise mais detalhada, mas a complexidade de enumerar aberrações cromossômicas na metáfase e a possível perda de cromossomos durante a preparação da metáfase, estimulou o desenvolvimento de um sistema mais simples de mensuração de danos cromossômicos (Fenech, 2000).

**Estudos de mutagenicidade de NFOH**

Nosso grupo (Guido et al., 2001) avaliou a mutagenicidade do NFOH, comparando-o com a molécula matriz, nitrofural, empregando ensaios de indução de mutações gênicas reversas (Teste de Ames) nas linhagens TA102 e TA98 de *Salmonella typhimurium* na ausência e presença da fração S9 de fígado de rato. Os resultados mostraram que o processo de latenciação diminuiu em quatro vezes a atividade mutagênica do NFOH, quando

comparado ao nitrofurânico matriz, NF, em testes com *S. typhimurium*, cepas TA 98 e T 102, como mostrado nas Figuras 6 e 7.

Entre os testes de avaliação de genotoxicidade preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, o teste de micronúcleo em sangue periférico de roedores *in vivo* é amplamente aceito e recomendado para a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (Choy, 2001; Ribeiro et al., 2003).

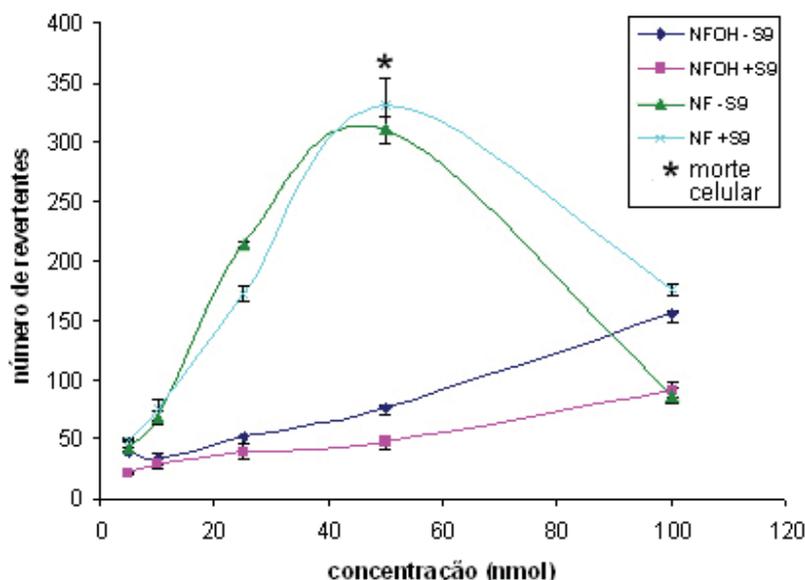


Figura 6. Atividade mutagênica (*S. typhimurium* cepa TA98) dos compostos NFOH e NF em ensaios com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. (Guido et al., 2001).

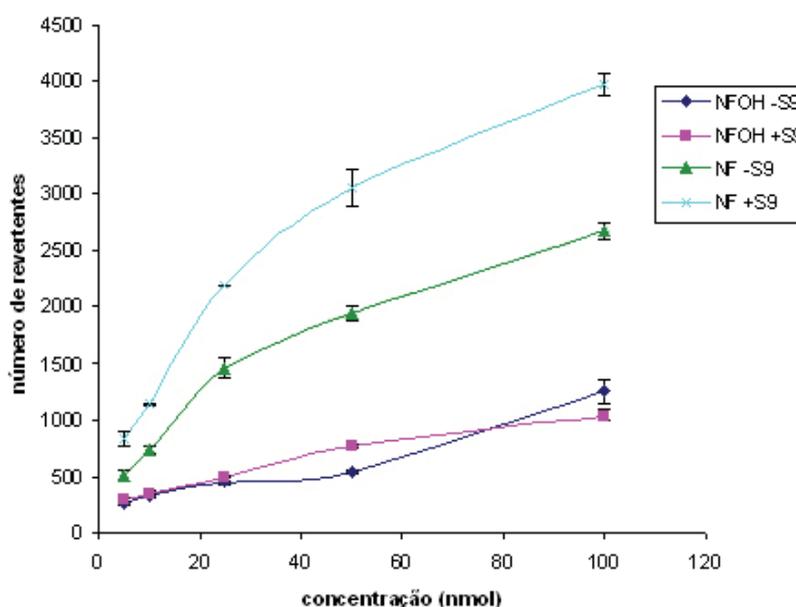


Figura 7. Atividade mutagênica (*S. Typhimurium* cepa TA102) dos compostos NFOH e NF em ensaios com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica (Guido et al., 2001).

O teste de micronúcleo permite identificar um aumento na frequência de mutação em células, que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos.

Segundo Surralles & Natarajan (1997), as principais vantagens da análise de células micronucleadas são a velocidade e a facilidade com que este tipo de estudo pode ser efetuado, especialmente quando é aplicado em roedores em estudos *in vivo*, além de permitir a interferência de processos de aneuploidia e clastogênese.

Os micronúcleos foram primeiramente descritos por Howell em 1891 com inclusões citoplasmáticas em células vermelhas do sangue de gatos anêmicos e foram chamados de “fragmentos do material nuclear”. Jolly observou essas mesmas estruturas em 1901 em seus estudos com eritrócitos de embriões de ratos e foram chamados de “corpúsculos intraglobulares” (Slesinski & Guzzie, 1988). Segundo Heddle et al. (1991) diferentes mecanismos podem estar envolvidos na formação dos micronúcleos, incluindo quebras cromossômicas (clastogênese) e rompimento das fibras do fuso mitótico (aneuploidogênese). Isso ocasiona a formação de um “pequeno núcleo” envolto por membrana (micronúcleo) isolado do núcleo principal mais corado similarmente a este devido ao seu conteúdo de DNA (Slesinski & Guzzie, 1988).

Os micronúcleos aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula. Os micronúcleos podem, também, ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da

célula, ou no próprio cromossomo. Eles aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular (Ribeiro et al., 2003).

Estudos de nosso grupo (Bosquesi et al., 2008) tiveram como objetivo avaliar o potencial mutagênico para os compostos NF e NFOH empregando-se o teste de micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos. Os resultados demonstraram que não houve significância estatística ( $P > 0,05$ ) entre o controle negativo, controle branco e os fármacos, sendo encontrado um resultado estatisticamente significativo ( $P < 0,001$ ) entre o controle positivo, com o controle negativo, controle branco e os fármacos NF, NFOH e benznidazol (Figura 8), demonstrando que os compostos não foram genotóxicos nas concentrações utilizadas entretanto, a frequência de células micronucleadas nos animais tratados com NFOH foi quatro vezes menor que nos animais tratados com NF sendo que este índice é menor ainda quando comparado ao BZD, fármaco utilizado atualmente na terapêutica.

### Toxicidade Aguda de NFOH

Trabalho realizado em nosso laboratório mostrou que os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda (14, 28 e 60 dias) para o derivado hidroximetilado de nitrofuril com camundongos e ratos, sugeriram baixa toxicidade deste, obtendo-se uma dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) maior em relação ao fármaco de partida, NF (556,3 mg/kg). Por via oral os resultados caracterizaram o NFOH como pouco tóxico, segundo a OMS com um valor de  $DL_{50}$  acima de 2000mg/kg (Melo, 2006).

Os resultados obtidos em todos os testes de toxicidade aguda com NF e NFOH em camundongos e ratos estão resumidos na Tabela 1.

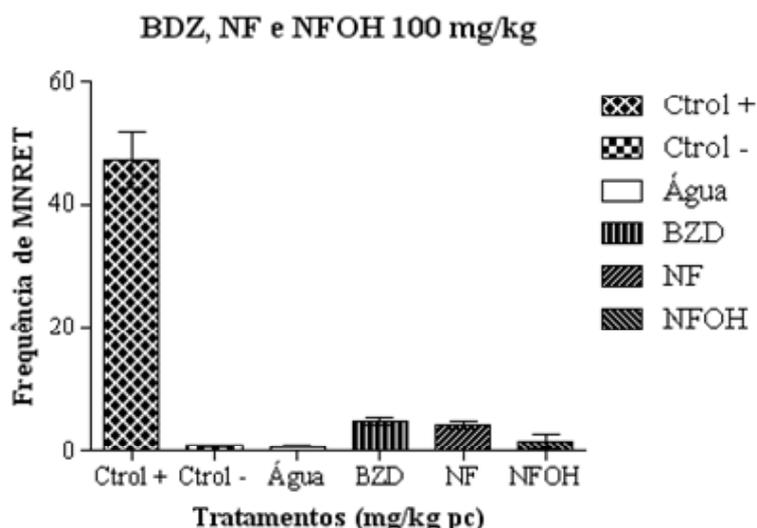


Figura 8. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 100 mg/kg de BZD, NF e NFOH.

Tabela 1 - Resultados do teste de toxicidade aguda dos fármacos NF e NFOH (Melo, 2006)

Animal	Via	Solvente	Fármaco	DL <sub>50</sub> (mg/kg)
Camundongo	i.p.	DMSO/H <sub>2</sub> O	NF	197,1
Camundongo	i.p.	DMSO/H <sub>2</sub> O	NFOH	327,0
Rato	v.o.	Goma arábica	NF	556,3
Rato	v.o.	Goma arábica	NFOH	>2000

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desta forma, é possível observar que apesar da literatura demonstrar a toxicidade de compostos nitrofurânicos, a utilização destes compostos na terapêutica ainda é presente e importante, muitas vezes, sendo eficaz em doenças negligenciadas, sem alternativas de tratamentos. E, ao invés de descartar a substância como molécula promissora devido à presença do grupo nitro e potencialidade de toxicidade, é possível, utilizando estratégias de modificação molecular, a diminuição destes efeitos, permitindo a sua utilização.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP e PADC-FCF pelo apoio financeiro

## ABSTRACT

### *Toxicity of nitrofurans drugs*

**During the structural designing of new drugs, it is possible predict the influence of specific chemical groups on pharmacological activity. Among these, the nitro group has potential antiparasitic activity, being present in many antimicrobial drugs, such as metronidazole, nitrofurazone, furazolidone, oxamniquine and chloramphenicol. Also, the introduction of the nitro group into a molecule can modify the physicochemical and electronic properties of the substance. Besides antimicrobial drugs, this group is also found in other drug classes, such as antiulcer, anti-inflammatory and anxiolytic. However, the use of the nitro group in drug design has encountered restrictions, due to the associated toxicity. This article is a review of the toxicity of nitrofurans compounds, as well the possible mechanisms involved and the strategy of latention by molecular modification to decrease their toxicity.**

*Keywords:* nitrofurans; toxicity; mechanism; prodrug

## REFERÊNCIAS

Bosquesi PL, Oliveira JRS, Varanda E, Almeida AE, Chung MC. Genotoxicity evaluation of the anti-chagasic drug candidate hydroxymethylnitrofurazone. In: *4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry*; 2008 Nov 9-13; Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil. CD-Rom., 2008

Capobianco-Perez M, Cordero de Troconis MI. Diseño racional de compuestos antibacterianos derivados del 5-nitrofurano usando modelado molecular. *Bol Soc Chil Quím* 2001; 46(2):113-9

Choy WN. Regulatory genetic toxicology tests. In: Choy WN, editor. *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2001. p.93-113.

Chung MC. *Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos derivados de nitrofurais e primaquina potencialmente antichagásicos*. [Tese] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; 1996.

Chung MC, Martinelli TF, Gonçalves MT, Guido RVC, Varanda EA, Polli MC, Botelho KC, Colli W, Miranda MTM, Ferreira EI. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. *Bioorg Méd Chem* 2003; 11: 4779-80.

Chung MC, Silva ATA, Castro LF, Guido RVC, Nassute JC, Ferreira EI. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Rev Bras Cienc Farm* 2005; 41(2):155-80.

da Silva J, Heuser V, Andrade V. Biomonitoramento Ambiental. In: da Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. *Genética toxicológica*, Porto Alegre: Alcance; 2003. p.167-78

Debnath AK, Hansch C, Kim KH, Martin YC. Mechanistic interpretation of the genotoxicity of nitrofurans (antibacterial agents) using quantitative structure-activity relationships and comparative molecular field analysis. *J Med Chem* 1993; 36(8):1007-16.

Edwards DI. Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31(1):9-20.

Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; 455:81-95.

Guido RVC, Ferreira EI, Nassute JC, Varanda EA, Chung MC. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofurais. *Rev Bras Cienc Farm* 2001; 22:319-33.

Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P, MacGregor JT. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen* 1991; 18(4):277-91.

- Hiraku Y, Sekine A, Nabeshi H, Modorikawa K, Murata M, Kumagai Y, Kawanishi S. Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA. *Cancer Lett* 2004; 215(2):141-50.
- Kedderis GL, Miwa GT. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. *Drug Metab Rev* 1988; 19:33-62.
- Kobierska-Szeliga M, Czczot H. Characterization of the genotoxic properties of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone. *Acta Biochim Pol* 1994, 41(1):1-5.
- McCalla DR. Mutagenicity of nitrofurans derivatives: review. *Environ Mutagen* 1983; 5(5):745-65.
- Mecca MM, Diaz EG, Castro JA. Nifurtimox biotransformation to reactive metabolites or nitrite in liver subcellular fractions and model systems. *Toxicol Lett* 2002; 136(1):1-8.
- Melo MFF. *Preparação e determinação da atividade toxicológica do pró-fármaco hidroximetilnitrofurural, potencialmente antichagásico*. [Dissertação] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêutica, UNESP; 2006.
- Ministério Da Saúde. Aspectos toxicológicos dos nitrofuranos e eventuais risco para a saúde humana. Lisboa: Direcção-Geral da Saúde; 2003. p.1-9.
- Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese ambiental*. Canoas: ULBRA; 2003. p.173-98
- Slesinski RS, Guzzie PJ. Review of recent advances in the development and application of the micronucleus test. In: Ballantyne B. *Perspectives in basic and applied toxicology*. London: John Wright; 1988.
- Silva ATA, Chung MC, Castro LF, Guido RVC, Ferreira EI. Advances in Prodrug Design. *Mini Rev Med Chem* 2005; 5(5):893-914.
- Surrallés J, Natarajan AT. Human lymphocytes Micronucleus Assay in Europe. An international survey. *Mutat Res* 1997; 392(1-2):165-74.
- Tocher JH. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *Gen Pharmacol* 1997; 28(4):485-7.
- Van Goethem F, Lison D, Kirsch-Volders M. Comparative evaluation of the in vitro Micronucleus Test and the Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis Assay for the detection of DNA damaging agents: Genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat Res* 1997; 392(1-2):31-43.
- Wermuth CG. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses. In: Wermuth CG, editor. *The practice of medicinal chemistry*. London: Academic; 2006. p.81.