

## Ciclização intramolecular: uma estratégia promissora no desenvolvimento de pró-fármacos

Cledir Santos\*

Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco

*Muitos fármacos estão associados a vários efeitos adversos e limitada biodisponibilidade. A resolução destes problemas continua sendo um alvo importante para a comunidade científica. O desenvolvimento de pró-fármacos que conduzam a uma liberação controlada in vivo é um caminho atrativo para resolver estes problemas. Um pró-fármaco clássico é molécula inativa, em que o princípio ativo é ligado covalentemente a uma unidade transportadora, de modo que o fármaco pode ser liberado através de uma reação química ou enzimática. Um sistema novo e interessante de pró-fármaco, que tem sido apresentado para fármacos possuidores de grupos amino, álcool e tiol, é aquele no qual o princípio ativo é liberado através de uma ciclização intramolecular. Neste caso, o processo de ciclização, dependendo da cadeia da unidade transportadora e do próprio fármaco, pode controlar a velocidade de liberação do princípio ativo. Desta forma, este trabalho apresenta uma revisão do desenvolvimento de pró-fármacos baseados na liberação do princípio ativo através de uma ciclização intramolecular.*

### Unitermos

- Pró-fármaco
- Ciclização intramolecular
- Fármaco/liberação controlada

\*Correspondência:

C. Santos

Departamento de Química  
Fundamental

Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof Luiz Freire, s/n°. CDU

50740540 – Recife – PE, Brasil

E-mail: cledirs@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

Muitos fármacos que apresentam elevada atividade contra várias doenças estão relacionados com problemas que os tornam limitados ou inviáveis como sistemas terapêuticos eficazes (Guettari *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2005). Solubilidade, estabilidade, absorção, distribuição, toxicidade e biodisponibilidade são aspectos fundamentais a serem levados em consideração quando da administração de um fármaco (Lynx *et al.*, 2006; Otto, 2004; Vennerstrom *et al.*, 1999; Thomsen *et al.*, 2004). Um exemplo comum de fármacos que estão relacionados com vários problemas de natureza terapêutica é encontrado nos análogos das purinas e pirimidinas. Os fármacos contidos nestas classes de compostos são conhecidos pelas suas baixas biodisponibilidades

orais (Thomsen *et al.*, 2003). O aciclovir, por exemplo, é um análogo purínico que apresenta uma biodisponibilidade oral de cerca de 20% em adultos (Steingrimsdottir *et al.*, 2000). Já a fluorouracila, que é um análogo pirimidínico, apresenta uma biodisponibilidade oral que varia entre indivíduos numa escala de 0-80% (Guo *et al.*, 1995; Heyden *et al.*, 1999; Zinutti *et al.*, 1998). Além da reduzida biodisponibilidade destes fármacos, problemas associados à elevada toxicidade e baixa solubilidade, tanto em meio aquoso quanto em meio lipofílico, são um verdadeiro entrave nas suas aplicações terapêuticas (De Vruh *et al.*, 1998; Han *et al.*, 1998; Zambonin *et al.*, 1998).

Um medicamento acabado é fruto de décadas de pesquisa química, farmacêutica e clínica. No entanto, muitas vezes subsistem problemas como os anteriormente menci-

onados. Uma estratégia largamente utilizada para solucionar problemas causados pela utilização de determinados fármacos tem sido o desenvolvimento de pró-fármacos. O termo “pró-fármaco” foi estabelecido por Adrien Albert em 1958 (Albert, 1958), justamente para designar compostos que sofrem biotransformação antes de exercerem a sua atividade farmacológica, comportando-se como agentes terapêuticos inativos *per se*, mas que são transformados no organismo para gerar um ou mais metabolitos ativos. Contudo, somente após 1970, quando foi possível investigar o destino dos fármacos no organismo de modo a compreender melhor a absorção, o metabolismo, a distribuição e a excreção, é que a utilização de pró-fármacos, como sistemas de liberação do princípio ativo, tomou grande impulso (Chung, Ferreira, 1999). Nas últimas décadas, um elevado número de trabalhos tem contribuído para o desenvolvimento de uma larga variedade de pró-fármacos, conduzindo, em muitos casos, a melhorias significativas nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos parentais (Bundgaard, 1991; Siccardi *et al.*, 2004; Sriram *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 1999).

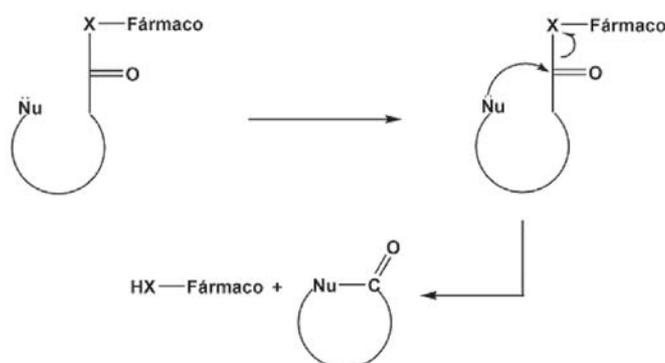
Atualmente, os pró-fármacos podem ser classificados segundo dois critérios (Ettmayer *et al.*, 2004):

1. Pela classe química:
  - a) pró-fármacos clássicos;
  - b) bioprecursores;
  - c) sistema químico planejado para liberação do fármaco no local de ação;
  - d) pró-fármacos macromoleculares;
  - e) conjugados fármaco-anticorpo.
2. Pelo mecanismo de ativação:
  - a) enzimático;
  - b) não-enzimático ou químico.

Apesar de, até há relativamente pouco tempo, a utilização de pró-fármacos ativados pela via química se apresentar como um campo pouco explorado, nos últimos anos tem atraído um elevado número de adeptos (Saari *et al.*, 1990; Shan *et al.*, 1997; Testa, Mayer, 1998). A crescente busca deste tipo de pró-fármacos é explicada pelo fato de, nos casos de ativação pela via enzimática, a liberação do fármaco estar sujeita à variabilidade da atividade enzimática entre espécies ou entre indivíduos de mesma espécie. Essa variabilidade produz grandes diferenças na velocidade de liberação do princípio ativo, de indivíduo para indivíduo (Saari *et al.*, 1990; Shan *et al.*, 1997), comprometendo a previsibilidade destes parâmetros e tornando o pró-fármaco um sistema pouco atrativo para liberação do princípio ativo *in vivo*.

Hoje, conta-se com um largo número de modelos de derivados de fármacos ativados quimicamente, nos quais a liberação do princípio ativo é uma função da estabilidade química da ligação fármaco-transportador (Andersen *et al.*, 2006; Steffansen *et al.*, 2005; Friedrichsen *et al.*, 2001; Testa, Mayer, 1998) em determinado local de ação terapêutica.

Dentre os vários mecanismos de ativação química de pró-fármacos já disponíveis, o que se apresenta como um exemplo promissor é aquele em que o fármaco é liberado através de uma ciclização intramolecular que, contudo, é ainda pouco explorada (Shan *et al.*, 1997; Testa, Mayer, 1998). De um modo geral, um pró-fármaco ativado por ciclização intramolecular possui um grupo nucleófilo capaz de atacar intramolecularmente um grupo eletrófilo, conduzindo à ciclização do sistema transportador e à quebra da ligação entre este e o princípio ativo como uma dependência do pH e da temperatura do meio, (Fredholt *et al.*, 1995; Matsumoto *et al.*, 2001 a; Thomsen, Bundgaard, 1993), como exemplificado no Esquema 1.



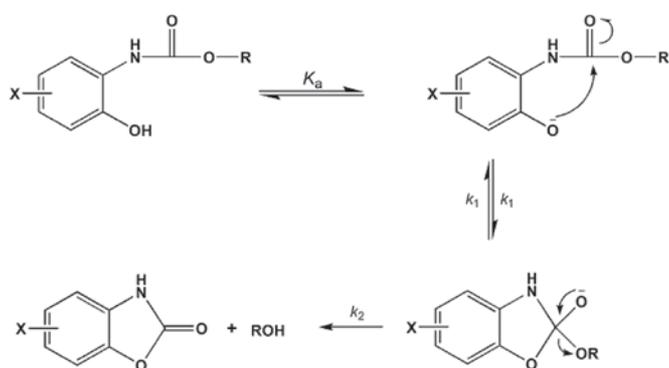
**ESQUEMA 1** - Ativação de um pró-fármaco por ciclização intramolecular promovida por ataque de um grupo nucleófilo (Nu) do transportador a um grupo eletrófilo (carbonila) presente na ligação fármaco-transportador ( $X = -NH-$ ,  $-O-$  ou  $-S-$ ).

### Os íons fenolato e alcoolato como agentes nucleofílicos

Os grupos fenolato e alcoolato têm surgido como importantes nucleófilos no desenvolvimento de pró-fármacos ativados por ciclização intramolecular (Bundgaard *et al.*, 1986; Larsen *et al.*, 2004; Vigroux *et al.*, 1995). No entanto, são escassos os dados da literatura acerca da ativação de pró-fármacos pelo uso desta estratégia em particular. Dentre alguns exemplos já conhecidos de derivados de fármacos ativáveis por esse mecanismo, podem-se destacar os obtidos de acordo com o modelo pro-

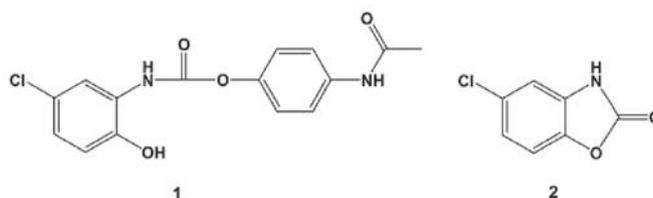
posto por Vigroux *et al.* (1995). Este modelo fundamenta-se no desenvolvimento de potenciais pró-fármacos baseados em derivados fenólicos e alcoólicos de carbamatos.

Uma larga variedade desses compostos foi analisada quanto à sua estabilidade química e enzimática, conduzindo a resultados promissores no sentido da obtenção de pró-fármacos ativáveis por ciclização intramolecular e enzimaticamente estáveis, com a possibilidade de modular as propriedades estereoeletrônicas dos substituintes do anel aromático (Vigroux *et al.*, 1995). Assim, a liberação do fármaco, a partir deste tipo de derivado, pode ocorrer através de uma ciclização intramolecular pelo ataque nucleofílico do íon fenolato sobre o grupo carbonílico, como apresentado no Esquema 2.

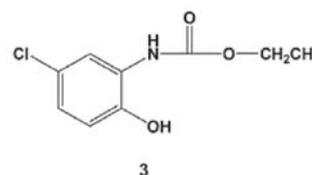


**ESQUEMA 2** - Liberação de um fármaco alcóólico ou fenólico (ROH) por ciclização intramolecular a partir de derivados propostos por Vigroux *et al.* (1995) (X = Cl ou grupo benzila).

A utilização deste tipo de sistema transportador pode representar uma vantagem adicional frente a outros tipos conhecidos, pois dependendo das posições adotadas pelos grupos substituintes do anel aromático, o produto de ciclização, por si, pode possuir atividade farmacológica. Assim, a sua utilização como sistema de liberação do fármaco pode constituir um caso de “pró-fármaco mútuo”. O termo “pró-fármaco mútuo” descreve a associação, numa única molécula, de dois fármacos normalmente com efeito sinérgico, ligados um ao outro através de uma ligação covalente (Carvalho *et al.*, 2000). Um exemplo de pró-fármaco mútuo do paracetamol (1) foi observado no caso em que foi adicionado um átomo de cloro na posição 5 do anel aromático do transportador, conforme descrito no Esquema 2. Para este caso, a liberação quantitativa do paracetamol em pH 7,4 e 37 °C foi atribuída a uma ciclização intramolecular, conseqüente à formação também quantitativa do 5-clorobenzo[*d*]-oxazolidin-2-ona, que é um relaxante músculo-esquelético (2).

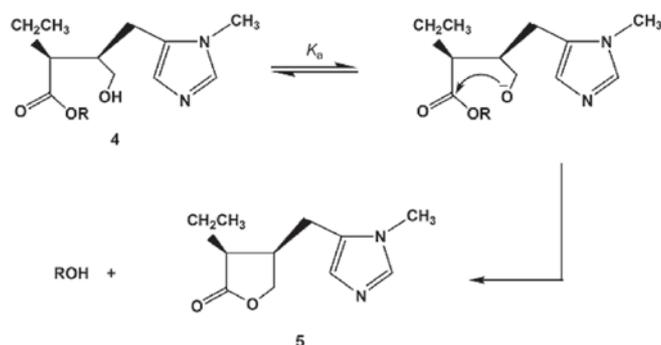


De um modo geral, os resultados deste trabalho indicaram que a reatividade dos compostos concebidos a partir deste modelo foi fortemente influenciada pelo valor do  $pK_a$  do grupo abandonador. Para o composto 1, por exemplo, que tem como grupo abandonador o paracetamol ( $pK_a = 9,51$ ) (Dechtlaruk *et al.*, 1976) obteve-se um tempo de meia-vida de cerca de 7,1 segundos, a 37 °C e pH 7,4. Por outro lado, para o composto 3, que tem o etanol ( $pK_a = 16,0$ ) (Michigan State University, 2007) como grupo abandonador, obteve-se um tempo de meia-vida da ordem de 290 dias, nas mesmas condições de pH e temperatura.



Um modelo de pró-fármacos ativados intramolecularmente graças ao caráter nucleofílico do grupo alcoolato é encontrado no sistema transportador apresentado por Bundgaard *et al.* (1986) (4, Esquema 3). Este sistema foi desenvolvido com o objetivo de melhorar a baixa biodisponibilidade ocular (1-3%) da pilocarpina (5), um fármaco largamente utilizado para controlar a elevada pressão intraocular associada ao glaucoma. Através deste modelo, o fármaco (5) é gerado por uma ciclização intramolecular com concomitante liberação da unidade transportadora, como apresentado pelo Esquema 3.

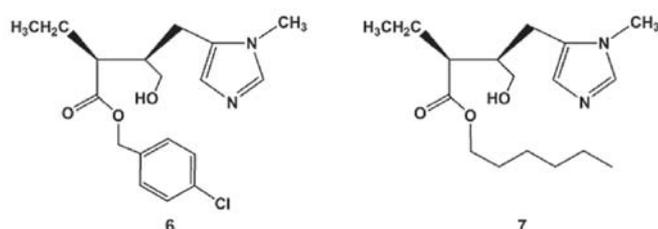
Uma larga variedade de ésteres alquílicos e aralquílicos (4) derivados do ácido pilocárpico foram sintetizados e avaliados como sistemas passíveis de sofrer ciclização intramolecular conducente à liberação do princípio ativo (5). A reatividade dos compostos obtidos foi analisada em diversos tampões aquosos, a 37 °C, numa extensa escala de pH (Bundgaard *et al.*, 1986). A análise detalhada dos produtos de hidrólise nessas condições indicou que todos os substratos sofreram ciclização intramolecular com formação quantitativa do princípio ativo. Em relação ao mecanismo de ciclização intramolecular dos diferentes ésteres do ácido pilocárpico, foi observado que a reação ocorreu através de um pré-equilíbrio de ionização do grupo hidroxila (Esquema 3), seguido pelo ataque nucleofílico do íon alcoolato – formado no



**ESQUEMA 3** - Modelo de pró-fármaco (4) proposto por Bundgaard *et al.* (1986) para a liberação de pilocarpina (5) e do sistema transportador ROH (derivados alquílicos e aralquílicos do ácido pilocárpico).

referido equilíbrio – sobre o grupo éster. A análise dos dados obtidos neste trabalho sugere que o aparecimento deste pré-equilíbrio foi devido à ocorrência de aparente catálise pelo íon hidróxido, pois a velocidade de ciclização intramolecular aumentou proporcionalmente com a atividade deste íon na escala de pH estudada.

A ciclização intramolecular dos compostos analisados foi também uma função do efeito estérico e polar das cadeias alcoólicas dos ésteres, sublinhando a versatilidade do modelo apresentado. Assim, estes compostos surgem como promissores pró-fármacos para o transporte e liberação controlada do princípio ativo. Esta afirmação pode ser justificada pela análise da variação dos tempos de meia-vida obtidos para o mais instável e para o mais estável dos compostos, que foram os que possuíam como substituintes os grupos *p*-clorobenzila (6,  $t_{1/2} = 30$  minutos) e *n*-hexila (7,  $t_{1/2} = 1105$  minutos), quando analisados em tampão aquoso a 37 °C e pH 7,4. Outro fator relevante na análise desses resultados reside no fato de que todos os ésteres sintetizados se apresentaram visivelmente mais lipofílicos que o próprio fármaco. De modo geral, estes dados sugerem que os ésteres do ácido pilocárpico são fortes candidatos a pró-fármacos da pilocarpina e que este modelo de pró-fármaco pode ser otimizado e expandido para o transporte e liberação de outros fármacos por ciclização intramolecular ao princípio ativo ou a um derivado cíclico do sistema transportador, neste caso com concomitante liberação do princípio ativo.



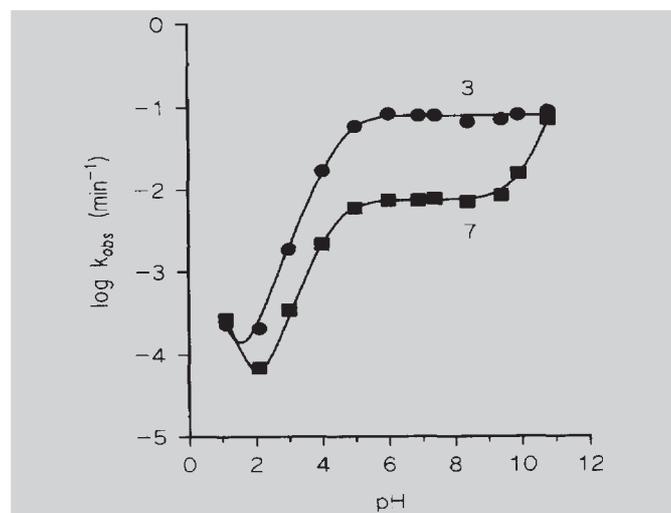
## O íon carboxilato como agente nucleofílico

O grupo carboxilato também tem sido estudado como um agente nucleofílico no desenvolvimento de pró-fármacos ativados por ciclização intramolecular (Fredholt *et al.*, 1995; Kovach *et al.*, 1981). Assim como para o caso dos potenciais pró-fármacos ativados pelo ataque do íon alcoolato ou fenolato sobre a ligação éster, os dados da literatura referentes aos modelos de potenciais pró-fármacos ativados pelo ataque nucleofílico do íon carboxilato sobre a ligação éster também são escassos. Fredholt *et al.* (1995) desenvolveram um modelo de potenciais pró-fármacos de fármacos fenólicos, ativados por ciclização intramolecular, com a finalidade de proteger o princípio ativo do efeito de metabolismo pré-sistêmico, que promove a eliminação do fármaco antes de promover a sua atividade biológica, o que ocorre para um largo número de fármacos fenólicos administrados pela via oral. Assim, vários derivados resultantes da ligação de diferentes ácidos dicarboxílicos ao paracetamol e ao fenol foram sintetizados e avaliados quanto à sua estabilidade *in vitro* e quanto ao mecanismo de liberação do resíduo fenólico. Na Tabela I apresentam-se os vários derivados de ambos os fenóis, obtidos pelos autores acima referidos.

**TABELA I** - Derivados do paracetamol (8-12) e do fenol (13-16) propostos por Fredholt *et al.* (1995)

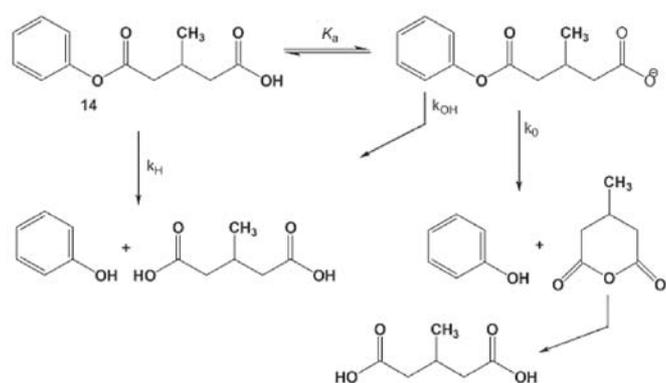
Composto	R	Composto	R
8	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	13	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH
9	-COCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> COOH	14	-COCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> COOH
10	-COCH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	15	-COCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> COOH
11	-COCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> COOH	16	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH
12	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH		

A reatividade destes compostos foi analisada em vários tampões, a 37 °C, numa larga escala de pH, onde se observou que a liberação, tanto do paracetamol quanto do fenol, foi quantitativa para todos os valores de pH estudados. Os perfis de pH-velocidade para a degradação dos derivados 10 e 14, apresentados na Figura 1, mostram que a máxima estabilidade destes compostos foi observada na região de pH entre 2 e 5. Esta evidência experimental é devida ao fato da extensão de ionização dos grupos carboxílicos ser baixa nessa região de pH tornando-os, assim, fracos agentes nucleofílicos (Peterson lab, 2007).



**FIGURA 1** - Perfis de pH-velocidade para a degradação dos compostos **10** (●) e **14** (■) em meio aquoso a 37 °C.

Segundo os autores, a liberação do paracetamol e do fenol, a partir dos derivados em questão, ocorreu por ciclicação intramolecular devido ao ataque do grupo carboxilato sobre a ligação éster. No entanto, os autores concluíram que, paralelamente à ciclicação intramolecular, ocorreu hidrólise ácida ou básica da ligação éster, conduzindo à formação do respectivo ácido dicarboxílico e do fenol, como apresentado no Esquema 4 para a degradação do composto **14**. Neste esquema, observa-se que o ataque nucleofílico intramolecular resultou na formação do fenol e do respectivo anidrido, que é posteriormente degradado ao correspondente ácido dicarboxílico.



**ESQUEMA 4** - Diferentes vias de liberação do fenol a partir do seu derivado **14**.

A análise da reatividade de todos os compostos a pH 7,4 e 37 °C mostrou que, nessas condições, a ciclicação intramolecular foi a reação que mais contribuiu para a liberação das unidades fenólicas. A observação dos tempos de meia-vida obtidos para a degradação de cada derivado

indicou que a reatividade dos compostos **8-16** foi uma função de três fatores: 1) tamanho da cadeia principal dos ácidos dicarboxílicos; 2) número de substituintes presentes nessa cadeia e 3) valor do  $pK_a$  do grupo fenólico.

Para os derivados do paracetamol que possuíam como unidade transportadora o ácido butanodióico (**12**), a velocidade de reação foi cerca de 133 vezes superior àquela observada quando a unidade transportadora era o ácido pentanodióico (**8**). O mesmo fato foi observado para ambos os derivados homólogos do fenol, com uma diferença de reatividade em torno de 151 vezes. A elevada reatividade dos compostos que têm o ácido butanodióico como unidade transportadora, frente aos que têm o ácido pentanodióico, é atribuída à formação de anéis de quatro membros que, neste caso, são mais reativos (Bruice *et al.*, 1960).

A diferença estrutural entre o derivado **8** e o derivado **9** está na presença de um grupo metila lateral existente neste último. Esta alteração estrutural gera uma diferença de reatividade de 3,8 vezes, ou seja, o derivado ramificado (**9**) é cerca de 3,8 vezes mais reativo que o não ramificado (**8**). Por outro lado, quando existem dois grupos metila laterais (**10**), a reatividade é aumentada em cerca de 18 vezes relativamente ao composto não ramificado (**8**). Acredita-se que a elevada reatividade destes compostos ramificados é devida à ocorrência de rotâmeros estáveis que conduzem a uma orientação favorável para a ciclicação intramolecular (Fredholt *et al.*, 1995).

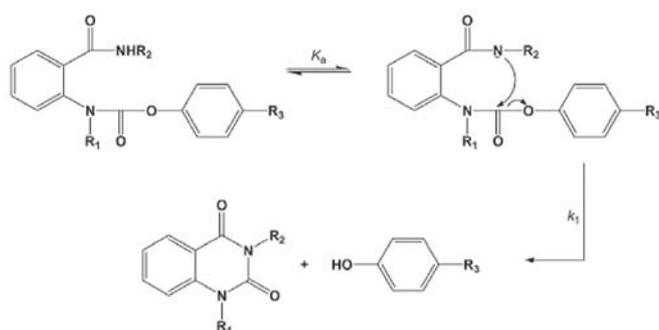
Todos os compostos também foram avaliados quanto às suas estabilidades enzimáticas em plasma humano a 40%, homogenato de fígado de rato a 20% e homogenato de fígado de porco a 20%, em todos os casos com ensaios realizados a 37 °C e pH 7,4. Os resultados obtidos mostraram que os ésteres de paracetamol se apresentaram estáveis quando analisados em plasma humano. No entanto, para os ésteres de fenol, quando estudados em plasma humano, observou-se uma ligeira influência catalítica das enzimas plasmáticas sobre os compostos **13**, **15** e **16**. Por outro lado, para o composto **14**, não se observou catálise enzimática.

Segundo os autores, com exceção do composto **10**, todos os demais compostos sofreram acentuada degradação enzimática quando analisados em homogenato de fígado de rato e de porco. Assim, observou-se que a degradação destes compostos ocorreu através de uma ciclicação intramolecular em tampão aquoso e em plasma humano, sendo que, neste último caso, se observa catálise enzimática pouco significativa. Já para os ensaios em homogenatos de fígado, observa-se que tais compostos são extensamente degradados pela via enzimática. Para o composto **10**, que se apresentou como uma exceção, o tempo de meia-vida

obtido em tampão aquoso, plasma humano e homogenatos de fígado foi o mesmo. O diferente comportamento deste composto foi atribuído à presença da carga negativa na sua estrutura ao pH fisiológico – pois ésteres contendo cargas negativas próximas da ligação éster são frequentemente pobres substratos para esterases (Nielsen, Bundgaard, 1987) – juntamente com o maior impedimento estérico na cadeia lateral do sistema transportador.

### O grupo amida como agente nucleofílico

Com o objetivo de proteger fármacos fenólicos do efeito de primeira passagem, Fredholt e Bundgaard (1993) desenvolveram um sistema de potenciais pró-fármacos ativados pelo ataque nucleofílico do grupo amida – que em valores de pH mais elevados se encontra na forma de íon amidato – sobre a carbonila do grupo carbamato, que une o sistema transportador ao fármaco (Esquema 5).

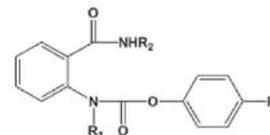


**ESQUEMA 5** - Modelo de potencial pró-fármaco ativado por ciclização intramolecular a uma quinazolidinona, com concomitante liberação do fármaco fenólico, proposto por Fredholt e Bundgaard (1993).

De acordo com este modelo, uma larga variedade de compostos foi sintetizada e avaliada quanto à sua estabilidade *in vitro*. Os resultados dos estudos para a degradação de todos os compostos em tampão aquoso e em plasma humano a 40%, ambos em pH 7,4 e 37 °C, são apresentados na Tabela II.

Pelos dados apresentados nesta Tabela, pode-se observar que a degradação dos compostos **17-33** foi influenciada fortemente pela natureza do grupo  $R_2$ . Dentre os compostos mais estáveis à hidrólise química, pode-se contar os derivados **24** a **26**. A elevada estabilidade destes três compostos – comparativamente aos demais derivados que possuíam um grupo metila ou etila na mesma posição – pode ser devida ao efeito estérico causado pelas suas cadeias mais volumosas. Por outro lado, a elevada reatividade de compostos tais como **27** e **28** pode ser atribuída ao efeito polar dos grupos éster e amida desses compostos, respec-

**TABELA II** - Compostos sintetizados por Fredholt e Bundgaard (1993) e respectivos tempos de meia-vida em tampão aquoso e plasma humano a 40%, ambos a 37 °C e pH 7,4



Composto	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$t_{1/2}/\text{min}$ Solução tampão pH 7,4	$t_{1/2}/\text{min}$ Plasma humano a 40%
17	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	485	125 (65) <sup>a</sup>
18	-CH <sub>3</sub>	-H	-Cl	260	20 <sup>a</sup>
19	-CH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	520	44 <sup>a</sup>
20	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	120	70 (55) <sup>a</sup>
21	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-Cl	60	25
22	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	110	55
23	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	610	440
24	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	1500	nd
25	-CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	13000	nd
26	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	1800	580
27	-CH <sub>3</sub>	-CHCOOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	11	13
28	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	-H	10	5
29	-CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> )CONH <sub>2</sub>	-H	625	360
30	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	165	85
31	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	145	85
32	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	-H	12	5
33	-H	H	-H	9	5

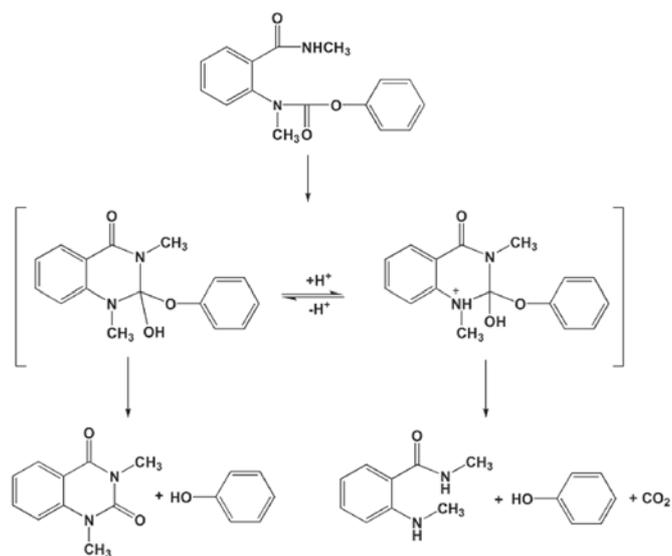
<sup>a</sup> Os dados entre parênteses ou simplesmente marcados com o expoente “a” indicam os valores obtidos em plasma humano a 80%; nd: valores não determinados.

tivamente, que poderão favorecer a desprotonação do nitrogênio amidico, convertendo este num nucleófilo mais eficaz (amidato), facilitando a ciclização intramolecular. Quanto à estabilidade enzimática, observa-se que todos os compostos foram sensíveis à hidrólise pelas enzimas plasmáticas, o que sugere que estes derivados são substratos das hidrolases do plasma humano.

A reatividade do derivado **20** foi avaliada em tampão aquoso numa escala de pH variando entre 6,5 e 10. Os resultados obtidos revelaram que este composto liberou o fenol quantitativamente através de uma ciclização intramolecular catalizada pelo íon hidróxido, por meio de um pré-equilíbrio de ionização do grupo *o*-amido, como descrito no Esquema 5. Por outro lado, a análise dos produtos de hidrólise do mesmo derivado, numa escala de pH variando entre 1 e 6, mostrou que a liberação do fenol ocorreu pela ciclização a uma quinazolidinona e pela formação

da respectiva benzamida (sistema transportador não ciclizado), como apresentado no Esquema 6.

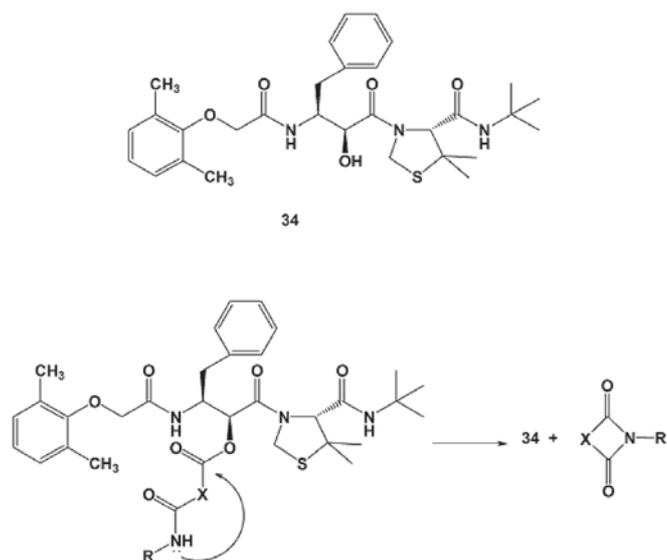
Os dados experimentais mostraram, ainda, que a diminuição do pH conduziu a uma diminuição da concentração da quinazolidinona formada, apontando para a liberação do fenol por um mecanismo alternativo à ciclização. Esse mecanismo não pode ser atribuído à simples clivagem do carbamato por catálise ácida, uma vez que a degradação do derivado **20** é independente do pH, no intervalo de pH entre 1 e 4,5. A variação da formação dos produtos pode, antes, ser atribuída à formação de um intermediário tetraédrico por um equilíbrio ácido-base, num passo limitante da velocidade da reação, para formar o fenol, a quinazolidinona e a respectiva benzamida, como apresentado no Esquema 6.



**ESQUEMA 6** - Caminhos de liberação do fenol a partir do derivado **20** numa escala de pH variando entre 1 e 6, segundo Fredholt e Bundgaard (1993).

Com o objetivo de aumentar a solubilidade em água de um inibidor da protease do VIH, o KNI-727 (**34**), diferentes trabalhos foram desenvolvidos utilizando-se o grupo amida como agente nucleofílico no desenvolvimento de pró-fármacos (Matsumoto *et al.*, 2001, a,b), Tamamura *et al.* (1998)). Esses trabalhos apresentam um modelo de potenciadores pró-fármacos ativados, em condições fisiológicas, pelo ataque nucleofílico do grupo amida à ligação éster que une o sistema transportador ao fármaco, como apresentado pelo Esquema 7.

Seguindo este modelo, um conjunto de derivados de **34** foi sintetizado (Tabela III) e analisado quanto à reatividade em solução aquosa de tampão fosfato isotônico, a 37 °C e pH 7,4.



**ESQUEMA 7** - Liberação do princípio ativo KNI-727 (**34**) a partir do modelo de Matsumoto *et al.* (2001a), através de uma ciclização intramolecular conseqüente à formação de uma imida, em que X =  $-(CH_2)_n-$  e R é a parte hidrofílica do sistema transportador e varia entre ácidos carboxílicos alifáticos, amidas não-substituídas, cloretos de amônio derivados de aminas primárias e terciárias ou, ainda, o grupo fenila.

**TABELA III** - Derivados de KNI-727 sintetizados por Matsumoto *et al.* (2001a) e respectivos tempos de meia-vida em tampão fosfato isotônico a 37 °C e pH 7,4

Composto	X	R	$t_{1/2}$ /min
<b>35</b>	$-(CH_2)_2-$	$-(CH_2)_2NH_2$	21,0
<b>36</b>	$-(CH_2)_3-$	$-(CH_2)_2NH_2$	1680,0
<b>37</b>	$-CH_2C(CH_3)_2$	$-(CH_2)_2NH_2$	5,0
<b>38</b>	$-(CH_2)_2-$	$-CH_2COOH$	1122
<b>39</b>	$-(CH_2)_2-$	$-(CH_2)_2COOH$	1008

Pela análise dos produtos de hidrólise, foi possível confirmar que a saída do grupo abandonador ocorreu de forma quantitativa, através de uma ciclização intramolecular conseqüente à formação da respectiva imida, como único caminho de liberação do princípio ativo. Nessas condições de análise, a reatividade de todos os compostos foi afetada, quer pela estrutura do espaçador (X no Esquema 7), quer pela estrutura da porção hidrofílica (R no Esquema 7). Assim, os tempos de meia-vida obtidos para degradação dos derivados de **34**, nessas condições, variaram entre 5 e 1680 minutos. O tempo de meia-vida obtido para degradação do composto **35**, por exemplo, foi de 21 minutos (Tabela III). Por outro lado, o tempo de meia-vida

obtido para a degradação do derivado **36** foi de cerca de 28 horas. Esta disparidade na reatividade desses compostos foi atribuída à baixa energia para a reação de ciclização de **35** para formar uma imida de cinco membros, quando comparado à ciclização de **36**, que produz uma imida de seis membros. Para o derivado **37** o tempo de meia-vida obtido foi de 5 minutos. Segundo os autores, a rápida velocidade de degradação deste derivado foi devida ao grupo metila geminal que, através de diversas limitações conformacionais no sistema transportador, produziu uma acentuada aceleração da velocidade de ciclização intramolecular.

Como referido anteriormente, a velocidade de degradação dos compostos também foi afetada pela porção hidrofílica (R). De fato, os compostos **38** e **39**, que possuíam um grupo carboxílico em R, por exemplo, apresentaram uma drástica redução na velocidade de liberação do princípio ativo. Este comportamento foi devido ao caráter elétron-atraente do grupo carboxílico, tornando o nitrogênio da ligação amida um fraco nucleófilo. Como era de se esperar, este efeito indutivo elétron-atraente foi menos acentuado no composto **39**, onde o grupo carboxílico está separado do nucleófilo por dois grupos metileno.

O estudo da reatividade de **35** em diferentes valores de pH e a 37 °C indicou que a velocidade de liberação do princípio ativo também depende do pH do meio. Em pH

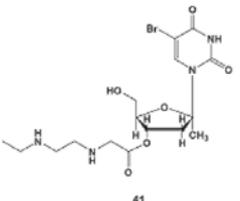
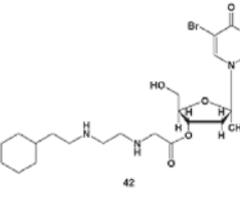
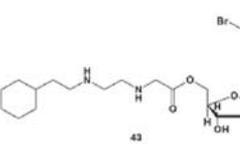
7,4, por exemplo, a velocidade de liberação do fármaco foi de 21 minutos, ao passo que em pH 2,0, **35** foi estável pelo menos durante 48 horas.

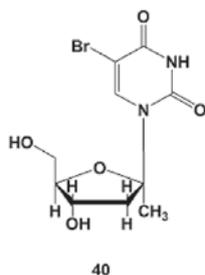
A degradação dos derivados de **34** também foi estudada na presença de carboxiesterase. No entanto, os tempos de meia-vida e o perfil de liberação do princípio ativo obtidos para a degradação dos compostos nesse meio foram semelhantes aos obtidos em tampão fosfato isotônico, sugerindo que estes compostos não são substratos para as enzimas em questão.

### O grupo amino como agente nucleofílico

O grupo amina também tem sido utilizado como um agente nucleofílico no desenvolvimento de potenciais pró-fármacos ativados pela via intramolecular. Saari *et al.* (1990) desenvolveram um modelo de potenciais pró-fármacos ativados graças à capacidade nucleofílica do referido grupo, com o objetivo de evitar a necessidade de liberação pela via enzimática. Assim, sintetizaram ésteres da 5-bromo-2'-desoxiuridina (**40**) e avaliaram as respectivas reatividades *in vitro*. Os resultados mostraram que a degradação dos derivados de **40** depende tanto da estrutura do sistema transportador, quanto do pH do meio, como apresentado para os compostos **41-43** na Tabela IV.

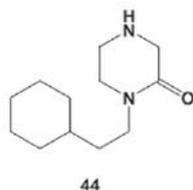
**TABELA IV** - Reatividade dos compostos sintetizados por Saari *et al.* (1990) em diferentes condições de análise

Composto	$t_{1/2}/\text{min}$ (37 °C)			
	pH 7,4	pH 6,8	pH 2,5	Plasma, pH 7,4 rato humano
	23,0	39,2	Estáveis durante 24 horas	47,3 70,0
	29,7	45,8		5,3 47,3
	26,7	41,9		0,36 26,7



Observa-se, pela análise desta tabela, que a reatividade dos derivados **41-43** aumentou com o aumento do pH. Essa evidência experimental pode ser explicada pelo fato do grupo amino se encontrar protonado em meio ácido, tornando-se um fraco nucleófilo. Um outro fator que influenciou a reatividade destes compostos foi a cadeia do sistema transportador. Observa-se que, em diferentes valores de pH, o composto **42** se apresenta mais estável que o composto **41**, possivelmente devido ao efeito estérico do grupo ciclo-hexila de **42** que causa diminuição da velocidade de ciclização do seu sistema transportador.

A análise dos produtos de degradação de **43** em pH 7,4 e 37 °C revelou que a liberação de **40** ocorre através de uma ciclização intramolecular conseqüente à respectiva piperazinona **44**, com um rendimento de 95,2%. Por outro lado, os resultados obtidos pela degradação de **42** e **43** em plasma de rato mostraram que estes compostos são bons substratos para as esterases aí presentes. No entanto, os mesmos compostos não se apresentam como substratos para as enzimas do plasma humano.



## CONCLUSÕES

O desenvolvimento de pró-fármacos mostra-se como uma estratégia muito útil, quando se pretende melhorar as qualidades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco. Em particular, a utilização de pró-fármacos ativados pela via intramolecular é uma estratégia que conduz à liberação do princípio ativo independentemente da atividade enzimática nos organismos animais, pois a liberação do fármaco ocorre quimicamente através do ataque de um grupo nucleofílico sobre um grupo eletrofílico, de modo a produzir uma estrutura cíclica (geralmente derivada do sistema transportador) e uma unidade parental (geralmente, o próprio princípio ativo). Este tipo de estratégia

mostra-se como um meio útil de controlar a liberação do princípio ativo pela modulação química da estrutura do sistema transportador. Assim, a ciclização intramolecular apresenta-se como um excelente meio para a liberação, de forma controlada, de uma larga variedade de fármacos.

Os fármacos são compostos que contam, de um modo geral, com diferentes grupos funcionais na sua estrutura molecular. No desenvolvimento de pró-fármacos ativados pela via intramolecular, a escolha do grupo funcional no qual ocorrerá a derivatização é uma tarefa de grande importância. A velocidade de liberação do fármaco a partir de um sistema transportador apresenta-se, para além de outros fatores, como uma função do  $pK_a$  do grupo abandonador (geralmente, o princípio ativo). Além disso, muitas vezes a derivatização em determinado grupo funcional pode evitar transformações metabólicas indesejáveis envolvendo este grupo. Muito importante, também, é a escolha da unidade transportadora. Esta unidade, quando ligada ao fármaco deve obedecer a alguns requisitos, tais como: elevada estabilidade frente a enzimas dos organismos animais, de modo a não comprometer o processo e, com isso, a velocidade de liberação do princípio ativo, e elevada solubilidade no suco gástrico. O desenvolvimento de modelos de pró-fármacos com essas características poderá conduzir à obtenção de um tipo de pró-fármaco ideal, genericamente aplicável a diferentes fármacos.

## ABSTRACT

### Intramolecular cyclization: a promising strategy in the prodrug conception

*Many drugs used for the treatment of common diseases are associated with various adverse effects and limited bioavailability. The suppression of such problems continues to be a very important target for scientists. The development of prodrugs for controlled release in vivo is an attractive way to overcome these problems. Classical in prodrug is an inactive molecule which the parent drug is covalently bonded to a carrier unit, and which can liberate the drug through chemical or enzymatic pathways. A new and interesting prodrug system for amine, alcohol, and thiol drugs takes advantage of several easy intramolecular cyclization reactions. So, the cyclization process can control the release rate of the parent drug. In this paper is a review about the prodrug strategies based on intramolecular cyclization reactions is presented.*

**UNITERMS:** Prodrugs. Intramolecular cyclization. Drugs/controlled release.

## AGRADECIMENTOS

Aos Professores Paula Gomes, do Centro de Investigação em Química da Universidade, do Porto e Rui Moreira do Centro de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Lisboa (Portugal), pelas ricas discussões desenvolvidas no contexto dos Pró-fármacos ativados por ciclização intramolecular, e às Professoras Madalena Areias, do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco e Elisângela Mendonça da Universidade Estadual da Paraíba pela forte contribuição na revisão do texto após tradução para o português brasileiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, A. Chemical aspects of selective toxicity. *Nature*, v.182, p.421-422, 1958.
- ANDERSEN, R.; NIELSEN, C.; BEGTRUP, M.; STEEN, F.; BRODIN, J.; FROKJAER, S.; STEFFANSEN, B. *In vitro* evaluation of N-methyl amide tripeptidomimetics as substrates for the human intestinal di-/tri-peptide transporter hPEPT1. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.28, p.325-335, 2006.
- BUNDGAARD, H. Novel Chemical approaches in prodrug design. *Drugs Future.*, v.16, p.443-458, 1991.
- BUNDGAARD, H.; FALCH, E.; LARSEN, C.; MIKKELSON, T. Pilocarpine prodrugs I. Synthesis, physicochemical properties and kinetics of lactonization of pilocarpic acid esters. *J. Pharm. Sci.*, v.75, p.36-43, 1986.
- BRUICE, T. C.; PANDIT, U. K. Intramolecular models depicting the kinetic importance of "fit" in enzymatic catalysis. *PNAS*, v.46, n.4, p.402-404, 1960.
- CARVALHO, E.; FRANCISCO, A.; ILEY, J.; ROSA, E. Triazene drug metabolites. Part 17: synthesis and plasma hydrolysis of acyloxymethyl carbamate derivatives of antitumour triazenes. *Bioorg. Med. Chem.*, v.8, p.1719-1725, 2000.
- CHUNG, M.; FERREIRA, E. O processo da latenciação no planejamento de fármacos. *Quim. Nova*, v.22, p.75-84, 1999.
- DECHTLARUK, W.; JOHNSON, G.; SOLOMON, H. Gas-chromatographic method for acetaminophen (*N*-acetyl-*p*-aminophenol) based on sequential alkylation. *Clin. Chem.*, v.22, p.879-883, 1976.
- DE VRUEH, R. L. A.; SMITH, P. L.; LEE, C. P. Transport of L-Valine-Acyclovir Via the Oligopeptide Transporter In The Human Intestinal Cell Line, Caco-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.286, p.1166-1170, 1998.
- ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.*, v.47, p.2393-2404, 2004.
- FREDHOLT, K.; BUNDGAARD, H. Cyclization-activated phenyl carbamate prodrug forms for protecting phenols against first-pass metabolism. *Int. J. Pharm.*, v.91, p.39-49, 1993.
- FREDHOLT, K.; MORK, N.; BEGTRUP, M. Hemiesters of aliphatic dicarboxylic acids as cyclization-activated prodrug forms for protecting phenols against first-pass metabolism. *Int. J. Pharm.*, v.123, p.209-216, 1995.
- FRIEDRICHSEN, G.; JAKOBSEN, P.; TAUB M.; BEGTRUP, M. Application of enzymatically stable dipeptides for enhancement of intestinal permeability: synthesis and in vitro evaluation of dipeptide-coupled compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, v.9, p.2625-2632, 2001.
- GUETTARI, N.; LOUBIÈRE, L.; BRISSON, E.; KLATZMANN, D. Use of Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase to Improve the Antiviral Activity of Zidovudine *Virology*, v.235, p.398-405, 1997.
- GUO, X.; TUNG, M. L.; CHEN, H. X.; CHANG, C. N.; ZHU, J. L.; CHANG, C. P.; PIZZORNO, G.; LIN, T. S.; CHENGT, Y. 5-fluoro-2-pyrimidinone, a liver aldehyde oxidase-activated prodrug of 5-fluorouracil. *C. Biochem. Pharmacol.*, v.49, p.1111-1116, 1995.
- HAN, H. K.; VRUEH, R. L. A.; RHIE, J. K.; COVITZ, K. M. Y.; SMITH, P. L.; LEE, C. P.; OH, D. M.; SADÉE, W.; AMIDON, G. 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *L. Pharm. Res.* v.15, p.1154-1159, 1998.
- HEYDEN, S.; HGHLEY, M.; BRUIJN, E.; TJADEN, U.; REEUWIJK, H.; SLOOTEN, H.; OOSTEROM, A.; MAES, R. Pharmacokinetics and bioavailability of oral 5'-deoxy-5-fluorouridine in cancer patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v.47, p.351-356, 1999.

- KOVACH, I.; PITMAN, I.; HIGUCHI, T. Amino acid esters of phenols as prodrugs: Synthesis and stability of glycine, *b* $\delta$ -aspartic acid, and *a* $\delta$ -aspartic acid esters of p-acetamidophenol. *J. Pharm. Sci.*, v.70, p.881-885, 1981.
- LARSEN, S.; ANKERSEN, M.; LARSEN, C. Kinetics of degradation and oil solubility of ester prodrugs of a model dipeptide (Gly-Phe). *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.22, p.399-408, 2004.
- LYNX, M.; MCKEE, E. 32 -Azido-32 -deoxythymidine (AZT) is a competitive inhibitor of thymidine phosphorylation in isolated rat heart and liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, v.72, p.239-243, 2006.
- MATSUMOTO, H.; SOHMA, Y.; KIMURA, T.; HAYASHI, Y.; KISO, Y. Controlled drug release: new water-soluble prodrugs of an HIV protease inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.11, p.605-609, 2001a.
- MATSUMOTO, H.; KIMURA, T.; HAMAWAKI, T.; KUMAGAI, A.; GOTO, T.; SANO, K.; HAYASHI, Y.; KISO, Y. Design, synthesis, and biological evaluation of anti-HIV double-drugs: conjugates of HIV protease inhibitors with a reverse transcriptase inhibitor through spontaneously cleavable linkers. *Bioorg. Med. Chem.*, v.9, p.1589-1600, 2001b.
- MICHIGAN STATE UNIVERSITY: IONIZATION CONSTANTS OF HETEROATOM ORGANIC ACIDS. Disponível em: <<http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/acidity2.htm>>. Acesso em: 01 out. 2007
- NIELSEN, N.; BUNDGAARD, H. Prodrugs as drug delivery systems. 68. Chemical and plasma-catalyzed hydrolysis of various esters of benzoic acid: a reference system for designing prodrug esters of carboxylic acid agents. *Int. J. Pharm.*, v.39, p.75-85, 1987.
- OTTO, M. New nucleoside reverse transcriptase inhibitors for the treatment of HIV infections. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v.4, p.431-436, 2004.
- PETERSON LAB – PENN STATE DEPARTMENT OF CHEMISTRY. Disponível em: <[http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa\\_compilation.pdf](http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa_compilation.pdf)>. Acesso em: 01 out. 2007.
- SAARI, W.; SCHWERING, J.; LYLE, P.; SMITH, S.; ENGENLHARDT, E. Cyclization-activated prodrugs. Basic esters of 5-bromo-2'-deoxyuridine. *J. Med. Chem.*, v.33, p.2590-2595, 1990.
- SHAN, D.; NICOLAOU, M. G.; BORCHARDT, R. T.; WANG, B. Prodrug strategies based on intramolecular cyclization reactions. *J. Pharm. Sci.*, v.86, p.765-767, 1997.
- SICCARDI, D.; GUMBLETON, M.; OMIDI, Y.; MCGUIGAN, C. Stereospecific chemical and enzymatic stability of phosphoramidate triester prodrugs of d4T *in vitro*. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.22, p.25-31, 2004.
- SONG, X.; LORENZI, P. L.; LANDOWSKI, C. P.; VIG, B. S.; HILFINGER, J. M. AND AMIDON, G. Amino Acid Ester Prodrugs of the Anticancer Agent Gemcitabine: Synthesis, Bioconversion, Metabolic Bioevasion, and hPEPT1-Mediated Transport. *Mol. Pharm.*, v.2, p.157-167, 2005.
- SRIRAM, D.; YOGEE SWARI, P.; SRICHAKRAVARTHY, N.; BAL, T. Synthesis of stavudine amino acid ester prodrugs with broad-spectrum chemotherapeutic properties for the effective treatment of HIV/AIDS. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.14, p.1085-1087, 2004.
- STEINGRIMSDOTTIR, H.; GRUBER, A.; PALM, C.; GRIMFORS, G.; KALIN, M.; EKSBERG, S. Bioavailability of aciclovir after oral administration of aciclovir and its prodrug valaciclovir to patients with leukopenia after chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.207-209, 2000.
- STEFFANSEN, B.; NIELSEN, C.; FROKJAER, S. Delivery aspects of small peptides and substrates for peptide transporters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.60, p.241-245, 2005.
- TAMAMURA, H.; ISHIHARA, T.; OYAKE, H.; IMAI, M.; OTAKA, A.; IBUKA, T.; ARAKAKI, R.; NAKASHIMA, H.; MURAKAMI, T.; WAKI, M.; MATSUMOTO, A.; YAMAMOTO, N.; FUJII, N. Convenient one-pot synthesis of cystine-containing peptides using the trimethylsilyl chloride–dimethyl sulfoxide/trifluoroacetic acid system and its application to the synthesis of bifunctional anti-HIV compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, v.1, p.495-500, 1998.

- TESTA, B.; MAYER, J. Design of intramolecularly activated prodrugs. *Drug Metab. Rev.*, v.30, p.787-807, 1998.
- THOMSEN, K.; BUNDGAARD, H. Cyclization-activated phenyl carbamate prodrug forms for protecting phenols against first-pass metabolism. *Int. J. Pharm.*, v.91, p.39-49, 1993.
- THOMSEN, A.; CHRISTENSEN, M.; BAGGER, M.; STEFFANSEN, S. Acyclovir prodrug for the intestinal di/tri-peptide transporter PEPT1: comparison of in vivo bioavailability in rats and transport in Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.23, p.319-325, 2004.
- THOMSEN, A. E.; FRIEDRICHSEN, G. M.; SORENSEN, A. H.; ANDERSEN, R.; NIELSEN, C. U.; BRODIN, B.; BEGTRUP, M.; FROKJAER, S.; STEFFANSEN, B. Prodrugs of purine and pyrimidine analogues for the intestinal di/tri-peptide transporter PepT1: affinity for hPepT1 in Caco-2 cells, drug release in aqueous media and in vitro metabolism. *J. Control. Release*, v.86, p.279-292, 2003.
- VENNERSTROM, J.; NUZUM, E.; MILLER, R.; DORN, A.; GERENA, L.; DANDE, P.; WILLIAM, E. RIDLEY, R.; MILHOUS, W. 8-Aminoquinolines Active against Blood Stage *Plasmodium falciparum* In Vitro Inhibit Hematin Polymerization. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.43, p.598-602, 1999.
- VIGROUX, A.; BERGON, M.; ZEEDE, C. Based on Ring-Opened Derivatives of Active Benzoxazolones and Oxazolidones as Mutual Prodrugs of Acetaminophen. *J. Med. Chem.*, v.38, p.3983-3994, 1995.
- ZAMBONIN, C. G.; ARESTA, A.; GRANO, M. *In vitro* toxicity of N3-methyl-5'-deoxy-5-fluorouridine, a novel metabolite of doxifluridine: a bioanalytical investigation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.17, p.11-16, 1998.
- ZHENG, A.; WANG, W.; ZHANG, H.; WANG, B. Two new improved approaches to the synthesis of coumarin-based prodrugs. *Tetrahedron*, v.55, p.4237-4254, 1999.
- ZINUTTI, C.; HEYOB, M. B.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. In-vivo evaluation of sustained release microspheres of 5-FU in rabbits. *Int. J. Pharm.*, v.166, p.231-234, 1998.

Recebido para publicação em 21 de novembro de 2007

Aceito para publicação em 13 de março de 2008