
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fármacos

Os fármacos utilizados foram fornecidos pelo Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da UFMG.

3.1.2 Preparo da Suspensão das substâncias para utilização nos estudos pré-clínicos

Os análogos do metronidazol (MTZ), mesilado e iodado, por serem insolúveis na água, foram administrados na forma farmacêutica de suspensão. Foi utilizada uma base para suspensões, de nome comercial Polvix[®] do fabricante Galena de composição a base de sorbitol, celulose microcristalina, CMC, lauril sulfato de sódio e metil parabeno. A incorporação das substâncias ao Polvix[®] era feita no momento da administração.

O cálculo da dose foi preconizado em mg da substância por kg de peso corporal dos animais, observando-se o limite de 1mL/100g de peso corporal, conforme preconizado pela OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*), protocolo número 407.

3.2 Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Nos estudos toxicológicos agudo foram utilizados ratos Wistar, com peso inicial de (200 g \pm 20%), fêmeas. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos com cinco animais cada. Foram acomodados em gaiolas metálicas em sala experimental com temperatura controlada entre 23 ± 2 °C, umidade relativa entre 50 a 60%, ciclo claro-escuro de 12 h (07:00-19:00). Água filtrada e ração em *pellet* disponíveis *ad libitum* exceto por um período de jejum, somente de ração, de 12 h que antecederam a administração oral e por um período de 4 h após este procedimento.

Nos estudos de toxicidade sub agudo foram utilizados ratos Wistar, com peso inicial aproximadamente entre 170 e 200g machos e fêmeas. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em grupos com cinco animais cada, separados por sexo. Foram acomodados em caixas plásticas (40 x 50 x 20) em sala experimental com temperatura controlada entre 23 ± 2 °C, umidade relativa entre 50 a 60%, ciclo claro-escuro de 12 h (07:00-19:00). Ração em *pellet* e água filtrada disponíveis *ad libitum*.

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com manuais de ética em experimentação animal (Zimmermann, 1983; OECD 420, 2001; Griffin G et. al., 2002).

3.3 Estudos toxicológicos

3.3.1 Estudo toxicológico agudo

A avaliação da toxicidade oral aguda foi conduzida a partir do protocolo de doses fixas nº 420 da OECD, com a escolha da dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg, para o análogo iodado e da dose de 2000 mg/kg para o análogo mesilado. Foram utilizadas 10 fêmeas, separadas aleatoriamente em dois grupos com cinco animais (5 do grupo controle e 5 do grupo tratado) para cada fármaco. Os animais foram climatizados por um período de 5 dias, às condições laboratoriais descritas anteriormente. A administração foi através de gavagem, após esse procedimento, os animais foram observados cuidadosamente nos primeiros 30 min, mantendo-se especial atenção nas primeiras 4 h e de hora em hora até completar 8 horas após a administração. Após este período, os animais foram avaliados por 14 dias, uma vez ao dia, sempre às 15 h.

Durante os 14 dias, foram avaliados os seguintes parâmetros: locomoção, comportamento, respiração, alterações na pele e pêlos, olhos, tremores, salivação, diarreia, letargia, sonolência, número de mortes e a forma de sua ocorrência. Os animais foram pesados semanalmente e sacrificados no 15º dia por decapitação.

Foram retiradas as seguintes vísceras para as análises macroscópicas e histopatológicas: coração, fígado, pâncreas, supra-renais, rins, baço, estômago e pulmões. Os órgãos foram pesados, examinados macroscopicamente quanto a presença de áreas sugestivas de alterações, foram feitos cortes de aproximadamente 0,5 cm de cada órgão, exceto pâncreas e aparelho reprodutor. Os órgãos foram fixados em solução de formol a 10% e foram realizados exames histopatológicos, após fixação dos cortes em parafina e posteriormente feitos cortes de 0,5 µm, com fixação em lâminas e corados pelo método da hematoxilina eosina.

Grupo tratado foi avaliado em relação ao grupo controle.

3.3.2 Estudo toxicológico sub agudo

3.3.2.1 Tratamento dos animais

Esse estudo foi realizado baseado no protocolo de Doses Repetidas 28 dias nº 407 da OECD. Foram utilizados 10 ratos (5 machos e 5 fêmeas), para cada grupo. Neste estudo foram avaliados três produtos, o MTZ, o análogo iodado e o análogo mesilado. Para o análogo iodado e o MTZ, foram escolhidos três níveis de dose, 200, 400 e 600 mg/kg de peso corporal. As doses foram escolhidas observados os estudos de toxicidade aguda, sendo que, segundo o protocolo seguido nesse experimento, a dose máxima deve ser selecionada com a finalidade de provocar toxicidade, mas não a morte ou sofrimento intenso do animal e as outras doses devem ser selecionadas em uma seqüência decrescente sendo que a diferença ótima entre elas não deverá ser superior a 4 vezes. A administração foi através de gavagem, diariamente, sempre às 15 h, por um período de 28 dias. Os animais foram sacrificados no 29º dia por decapitação.

Para o análogo mesilado foi escolhida uma única dose de 1000 mg/kg, dose limite aplicada neste teste, uma vez que, de acordo com os resultados dos testes agudos, não seria esperado o aparecimento de sinais de toxicidade em doses menores. A dose foi administrada, por gavagem, também por um período de 28 dias. Os animais foram sacrificados no 29º dia por decapitação.

O grupo controle recebeu apenas o veículo e foram manuseados de forma idêntica aos outros animais.

3.3.2.2 Evolução ponderal e parâmetros comportamentais

Os animais foram observados diariamente, uma hora após a administração, e foram avaliados parâmetros como alterações na pele, pêlos e mucosas; olhos; sistema autonômico (lacrimejamento, piloereção, tamanho da pupila, padrão respiratório); locomoção e comportamento estereotipado; especial atenção para sintomas tais como: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia e coma. Semanalmente os animais foram submetidos à exames clínicos mais criteriosos, incluindo reatividade aos estímulos sensoriais, estímulo nervoso (dor), força de agarrar e tônus muscular. Ainda semanalmente, foram pesados e o consumo de ração foi medido.

3.3.2.3 Análises laboratoriais

O sangue dos animais foi coletado para exames hematológicos e de bioquímica sérica. As análises bioquímicas foram realizadas por métodos colorimétricos, enzimáticos, enzimáticos colorimétricos ou cinética - UV de acordo com kit's padronizados da Analiza® e Bioclin®. Através dos quais foram analisados os seguintes parâmetros no soro, coletado em tubo vacutainer® tampa vermelha: uréia, creatinina, lípides totais (colesterol e triglicérides), aspartato aminotransferase – AST, alanina aminotransferase - ALT, gama glutamil transferase – Gama-GT, fosfatase alcalina, ácido úrico, proteínas totais, albumina, amilase, bilirrubina total e direta e glicose, a qual foi dosada imediatamente após a coleta devido sua baixa estabilidade no soro e à escassez de sangue para se coletar o plasma fluoretado.

As análises hematológicas foram realizadas no sangue total coletado em funil de vidro e tubo vacutainer® tampa roxa heparinizados onde foi realizado o hemograma completo, sendo o eritrograma, contagem global de leucócitos e contagem de plaquetas automatizados.

Grupo teste foi avaliado em relação ao grupo controle.

3.3.2.4 Avaliação histopatológica

Foram retirados os órgãos para necrópsia através de exame macroscópico e histopatológico (BRITO,1994; MURALIDHARA *et al.*, 1999; GAMEZ *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2001; AL-HABORI *et al.*, 2002). Foram retiradas as seguintes vísceras para as análises macroscópicas e histopatológicas: coração, fígado, pâncreas, supra-renais, rins, baço, estômago, pulmões, timo, intestino e aparelho reprodutor. Os órgãos foram pesados, examinados macroscopicamente quanto a presença de áreas sugestivas de alterações, foram feitos cortes de aproximadamente 0,5 cm de cada órgão, exceto pâncreas, e aparelho reprodutor. Os órgão foram conservados em solução de formol a 10% e foram realizados exames histopatológicos, após fixação dos cortes em parafina e posteriormente feitos cortes de 0,5 µm, com fixação em lâminas e corados pelo método da hematoxilina eosina.

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada utilizando o teste paramétrico de análise de variância, seguida pelo teste de “Duncan”, para avaliar se houve diferença significativa entre os grupos. Adotou-se o nível de significância de $p \leq 0,05$ (SAMPAIO, 1998).