

### 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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  $23 \pm 2$  °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  $23 \pm 2$  °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).